

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***BOTRYOTİNİA FUCKELİANA*'NİN POTANSİYEL ALERJEN
PROTEİNLERİNİN EKSTRAKSİYONU VE SAFLAŞTIRILMASI**

**BIYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

MUSTAFA KÖROĞLU

OCAK 2022

OCAK 2022

Yüksek Lisans Tezi - Biyoloji

MUSTAFA KÖROĞLU

***BOTRYOTINIA FUCKELIANA*'NIN POTANSİYEL ALERJEN
PROTEİNLERİNİN EKSTRAKSİYONU VE SAFLAŞTIRILMASI**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

Mustafa Köroğlu

Ocak 2022



©2022[Mustafa Koroğlu]

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilmek suretiyle tezde yer aldığını beyan ederim.

Mustafa KÖROĞLU

ABSTRACT

EXTRACTION AND PURIFICATION OF THE POTENTIAL ALLERGEN PROTEINS FROM *BOTRYOTINIA FUCKELIANA*

KÖROĞLU, Mustafa

M.Sc. in Biology

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

January 2022

45 pages

Allergy is a disease in which the immune system produces an inflammatory response to a harmless antigen. Any antigen that causes an allergy is called an allergen. Allergens can be inhaled or swallowed or come into contact with the skin. According to the data of the World Allergy Organization (WAO), the prevalence of allergies varies between 10-40% in different countries. Pollen, mold, animal hair, dust mite, drugs and foods are the most common allergens. Common fungi in nature have the potential to produce allergenic proteins. *B. fuckeliana* Persian. It is a cosmopolitan necrotrophic pathogen that infects more than 200 plant species in temperate and subtropical climates, some of which are of high economic importance (eg grapes, strawberries, solanaceous vegetables). Since the prevalence of *B. fuckeliana* spores and skin test reactivity are important, further characterization of these allergens should be explored. *B. fuckeliana* was used in our study. *Botryotinia fuckeliana* produced in our laboratory was collected and allergen fungal protein was extracted with 2 different extraction methods. Protein samples were prepared from the prepared mushroom extracts and the total concentration of potential allergen proteins was determined by BCA method. According to the data obtained, it was determined that the protein concentration of the mushroom extracts formed with chloroform-methanol was higher than that formed with ethanol.

Key Words: *Botryotinia fuckeliana*, Alerji, Alerjen Protein, BCA

ÖZET

***BOTRYOTİNİA FUCKELİANA*'NIN POTANSİYEL ALERJEN PROTEİNLERİNİN EKSTRAKSİYONU VE SAFLAŞTIRILMASI**

KÖROĞLU, Mustafa
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji
Danışman: Prof. Dr. İbrahim Halil KILIÇ
Ocak 2022
45 sayfa

Alerji, bağışıklık sisteminin zararsız bir antijene iltihaplı bir yanıt verdiği bir hastalıktır. Alerjiye neden olan herhangi bir antijene, alerjen denir. Alerjenler solunabilir veya yutulabilir veya ciltle temas edebilir. Dünya Alerji Örgütü'nün (WAO) verilerine göre farklı ülkelerde alerji prevalansı % 10-40 arasında değişiyor. Polen, küf, hayvan kılı, ev tozu akarı, ilaçlar ve besinler en yaygın alerjen maddelerdir. Doğadaki yaygın mantarlar, alerjenik proteinler üretme potansiyeline sahiptir. *B. fuckeliana* Pers. Ilıman ve subtropikal iklimlerde 200'den fazla bitki türünü enfekte eden kozmopolit bir nekrotrofik patojendir, bazıları yüksek ekonomik öneme sahiptir (ör. üzüm, çilek, solanlı sebze). *B. fuckeliana* sporlarının yaygınlığı ve deri testi reaktivitesi önemli olduğundan, bu alerjenlerin daha fazla karakterizasyonu incelenmelidir. Çalışmamızda *B. fuckeliana* kullanılmıştır. Laboratuvarımızda üretilen *Botryotinia fuckeliana* toplanmış ve alerjen mantar proteini 2 farklı ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiştir. Hazırlanan mantar özlerinden protein örnekleri hazırlanarak, potansiyel alerjen proteinlerinin toplam konsantrasyonu BCA yöntemi ile belirlendi. Elde edilen verilere göre kloroform-metanol ile oluşturulan mantar ekstratlarının protein konsantrasyonunun etanol ile oluşturulandan daha yüksek olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Botryotinia fuckeliana*, Alerji, Alerjen Protein, BCA



“Canum aileme”

TEŞEKKÜR

Bu alıŐma sűresince tűm bilgilerini benimle paylaŐmaktan kaçınmayan, her tűrlű konuda desteęini benden esirgemeyen ve tezimde bűyűk emeęi olan, Gaziantep Ŭniversitesi űęretim űyelerinden danıŐman hocam, sayın Prof. Dr. İbrahim Halil Kılıç'a ve teorikte ve pratikte her zaman bize desteklerini sunan Gaziantep Ŭniversitesi űęretim űyelerinden Doç. Dr. IŐık Didem KARAGÖZ'e sonsuz minnet ve teŐekkűrlerimi sunarım.

Örneklerin toplanmasında, preparasyonunda ve teŐhislerinde desteklerini benden esirgemeyen deęerli arkadaŐım Yűk. Biyo. Bekir ÇAKMAK'a ve laboratuvar ortamında tűm bilgi birikimini aktaran Yűk. Biyo BaŐak SİMİTIOęLU'na çok teŐekkűr ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ABSTRACT	vi
ÖZET	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
SEMBOLLER LİSTESİ	xiii
KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
BÖLÜM I: GİRİŞ	1
BÖLÜM II: GENEL BİLGİLER	4
2.1. Alerji.....	4
2.2. Alerjinin Semptomları	4
2.3. Besin Alerjisi	5
2.4. Mevsimsel Alerjiler	6
2.5. Derideki Alerjiler	6
2.6. Alerji Nedenleri	7
2.6.1. Alerji Mekanizmaları	8
2.7. Alerji Tanı Yöntemleri	8
2.7.1. Deri Prick Testi	8
2.7.2. İntradermal Test	9
2.7.3. Kan Testleri (Spesifik IgE)	10
2.7.4. Total IgE Testleri	10
2.7.4. Provakasyon Testleri.....	10
2.8. Mantarlar Alemi	11
2.8.1. Mantarların Sınıflandırılması	14
2.8.2. Mantarlarda Üreme	15
2.8.3. Alerjik Hastalıklarda Mantarların Rollerini	22
2.8.4. Solunum Sistemine Etkileri	23
2.8.5. Mantar Maruziyetine Duyarlılık Reaksiyonları	24

2.9. <i>B. fuckeliana</i> Hakkında Genel Bilgiler.....	25
2.9.1. <i>B. fuckeliana</i> Alerji İlişkisi	26
BÖLÜM III: MATERYAL METOD	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Kullanılan Materyaller	27
3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	27
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar.....	28
3.1.4. Kullanılan Besiyerleri	28
3.2. Metod.....	28
3.2.1. <i>Botryotinia Fuckeliana</i> Ekstraktlarının Hazırlanması	28
3.2.2. <i>B. fuckeliana</i> Ekstrelerinin Hazırlanması	29
3.2.3. <i>B. fuckeliana</i> Etanol Ekstresi	29
3.2.4. <i>B. fuckeliana</i> Kloroform-Metanol Ekstresi.....	30
3.2.5. <i>B. fuckeliana</i> Etken Maddelerinin Ekstre Edilmesi	31
3.2.6. Toplam Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	32
BÖLÜM IV: BULGULAR	34
4.1 Bulgular	34
4.2 Protein Konsantrasyonları	35
BÖLÜM V: TARTIŞMA VE SONUÇ	38
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ.....	45

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Sıklıklar karşılaşılan alerjik mantarların yaygınlıkları	26
Tablo 4.1 <i>B. fuckeliana</i> protein konsantrasyon değerleri	37



ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1	Deri prick testi örneği 9
Şekil 2.2	İntradermal test örneği 10
Şekil 2.3	Mantarlarda hif yapısı ve emeçler 13
Şekil 2.4	Spordan jerm tüpü oluşumu 16
Şekil 2.5	Bir sporangiumdan sporların salınması 17
Şekil 2.6	Arthrospor oluşumu 17
Şekil 2.7	Konidiosporlar 18
Şekil 2.8	A) Mikrokonidium, B) Makrokonidium 19
Şekil 2.9	Çeşitli aseksüel sporlar 19
Şekil 2.10	<i>Rhizopus nigricans</i> 'ta sporangiofer sporangiumlar 20
Şekil 2.11	Karyogami 21
Şekil 2.12	Askospor formasyon aşamaları 21
Şekil 2.13	Basidiospor formasyon aşamaları 22
Şekil 2.14	Sporalagnia mantarlarında oogonium ve oospor oluşumu 23
Şekil 2.15	Polen ve spor büyüklüğüne bağlı olarak gelişen rahatsızlıklar 25
Şekil 2.16	Tüm mantarların yüzdesinde <i>B. Fuckeliana</i> prevalansı 27
Şekil 3.1	<i>B. fuckeliana</i> 'nın PDA besiyerindeki hif yapısı 30
Şekil 3.2	Kurutmaya bırakılan miseller 31
Şekil 3.3	<i>B. fuckeliana</i> ekstrelerinin liyofilizasyonu 32
Şekil 3.4	Diyaliz Aşaması 33
Şekil 3.5	BCA çalışma diyagramı 33
Şekil 4.1	<i>B. Fuckeliana</i> mikroskop altındaki görüntüleri 34
Şekil 4.2	<i>B. fuckeliana</i> 'nın mikroskop altında görüntüleri 35
Şekil 4.3	Protein standart grafiği 36
Şekil 4.4	<i>B. fuckeliana</i> protein konsantrasyon grafiği 37

SEMBOLLER LİSTESİ

μg	Mikrogram
μm	Mikrometre
μl	Mikrolitre
$^{\circ}\text{C}$	Derece santigrat
Cu	Bakır
ml	Mililitre
nm	Nanometre
g	Gram
mg	Miligram

KISALTMALAR LİSTESİ

IgE	Immunoglobulin E
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
BSA	Bovine Serum Albumin
RAST	Radioallergosorbent Test
BCA	Bikinkoninik Asit
PDA	Potato Dextrose Agar
SDS	Sodyum Deodesil Sülfat

BÖLÜM I

GİRİŞ

Alerjiler, bir kişinin bağışıklık sistemi genellikle zararsız olan maddelere aşırı tepki verdiğiğinde gelişir. Bir kişi bir alerjene ilk kez maruz kaldığında, genellikle bir reaksiyon yaşamazlar. Bağışıklık sisteminin maddeye karşı bir duyarlılık oluşturması genellikle zaman alır. Zamanla, bağışıklık sistemi alerjeni tanımayı ve hatırlamayı öğrenir. Bunu yaparken, maruziyet meydana geldiğinde ona saldırmak için antikolar üretmeye başlar. Bu birikime duyarlılık denir. Alerjik hastalıklar genellikle deriyi ve sinüsler, akciğerler ve bağırsaklar gibi mukozal dokuları etkiler [1].

Dünya Alerji Örgütü verilerine göre farklı ülkelerde alerji prevalansı %10-40 arasında değişmektedir. Alerjik hastalıklara mevsimsel veya yıl boyunca rastlamak mümkündür. Mevsimsel alerjik reaksiyonlara mantar sporları, polenler, böcek öldürücüler, ev içi ve dışı küf mantarları, ev tozu ve yıl boyunca devam eden hayvan tüyleri neden olur [2].

Son yıllarda dünyada oldukça popüler olan aeromikoloji alanında birçok araştırma yapılmakta, ülkemizde ve yurtdışında birçok şehrin spor takvimleri yayımlanmakta, atmosferik spor konsantrasyonları çeşitli kanallar aracılığıyla kamuoyuna duyurulmaktadır [3].

Mantarlarla insanların etkileşimi çok eski yıllara dayanmakla birlikte mikroskopun icadı ile bilim insanları mantarlar morfolojik yapıları ve gelişimleri konusunda daha çok bilgi edinmişlerdir. İlk mantar sınıflandırılması Gaspard Bauhin tarafından 1560-1624 yılları arasında yapılmıştır. Daha sonraki yıllarda Joseph Pitton de Tournefort mantar cinslerini tanımlamış ve Pier Antonio Micheli mantarları mikroskop ile incelemiş ve elde ettiği sonuçları “Nova Plantarum Genera” adlı yapıtında vermiştir [4]. Dünyada çok geniş alana yayılan mantarlarla alakalı en önemli problem mantarların adlandırılması olmuştur. Havada taşınan mantar sporları, polen tanelerinden çok daha büyük konsantrasyonlarda ve yaygın olarak meydana gelir.

Havadaki mantar sporları üzerindeki immünoglobulin E'ye özgü antijenler (alerjenler), duyarlılaştırılmış atopik deneklerde tip I hipersensitivite (alerjik) solunum reaksiyonlarına neden olarak rinit ve/veya astıma neden olur. Mantarlara karşı solunum yolu alerjisinin prevalansı kesin olarak bilinmemekle birlikte, atopik (alerjiye yatkın) bireylerin %20 ila %30'u veya genel popülasyonun %6'sına kadar olduğu tahmin edilmektedir [4].

Mantarlar ekosistemde saprofit olarak görev aldıkları gibi bazı canlılar üzerinde parazit olarak yaşamlarını sürdürebilmektedir. Atmosferde çok sayıda mantarların üreme yapıları olan spor bulunmaktadır. Mantarlar nemli ortamları severler ve yağmur yağdığı zamanlarda atmosferdeki spor sayısı artış göstermektedir. Bu mantar sporları insanlarda ve hayvanlarda alerjik reaksiyonlara sebep olmaktadır [3-4]

Mantar alerjisinin teşhisi ve immünoterapisi, uygun mantarın ilgili alerjen(ler)ini içeren iyi karakterize edilmiş veya standartlaştırılmış ekstraktlar gerektirir. Mantar ekstraktları karmaşık karışımlar olduğundan ve çeşitli mantarlar alerjenik olduğundan standart ekstraktların üretimi zordur [5].

Alerjisi olan kişilerin vücudu yabancı antijenlerle karşılaşması ile genellikle IgE(Immünoglobulin E) ve mast hücrelerinin etkisi ile damarlarda ve düz kaslarda tepki oluşturmaktadır. Bu tepkileri oluşturan kişilere atopik adı verilmektedir [5].

IgE(Immünoglobulin E) oluşumuna neden olan maddelere alerjen madde adı verilir. Alerjenler major alerjen (çok sayıda hastada duyarlılığa sebep olan) ve minor alerjen (az sayıda hastada duyarlılığa sebep olan) olarak etki ettiği hasta sayısına göre sınıflandırılabilir. Major alerjenlere mantarlar, polenler, ev tozu akarları, hayvan tüyleri, gıdalar, böcekler ve ilaçlar örnek verilebilir [5].

Bu güne kadar tanımlanan alerjen sayısı 20.000 civarında olup atopik bireylerin vücutları alerjen maddeleri tehlike olarak tanımlayıp aşırı tepki oluşturmaktadır. Bu tepkiler deride kızarıklık, hapşırma yada öksürük gibi hayati tehlikesi olmayan tepkiler olabildiği gibi bazen de öldürücü olabilmektedir [5].

200'den fazla bitki türüne saldıran hava kaynaklı nekrotrofik bir mantar olan *Botryotinia fuckeliana*, sebzeler, süs bitkileri, soğanlar ve meyveler dahil olmak üzere ekonomik açıdan önemli birçok mahsulde gri küf hastalığına neden olur [7]. Alerjik mantarlar olan *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* ve *Mucor* türleri doğada

yaygın olarak bulunmaktadır. Ülkemizde solunum yolu alerjisi olan 614 hastada *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum*, *Mucor*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus niger* ve *Alternaria tenuis*'a karşı alerjik reaksiyon geliştiği bildirilmiştir [5].

Alerji ve astımla bağlantılı olarak, araştırılan tipik mantar türleri *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus* ve *Penicillium*'dur, çünkü muhtemelen bunlar ortam havasında çok sıklıkla en yaygın türlerdir. Bununla birlikte, tür çeşitliliği, hem en yaygın 2-4 cins içinde hem de daha az yaygın olan cinslerde oldukça yüksek olabilir. İç mekanlarda mantar bileşimi araştırılırken 359 tür içeren 100 cins gözlemlenmiştir [6]. Ayrıca, en az 80 cins mantar türünün alerjenik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Ortam havasında bulunan bu mantarlardan biri *Botryotinia fuckeliana*'dır.

Ülkemizde alerjik hastalıkların tanımlanmasında kullanılan mevcut testlerin tamamı yurt dışı menşeli olup ithal edilmektedir. Biz çalışmamızda *Botryotinia fuckeliana* alerjen proteinlerini saflaştırıp alerji tanı yöntemlerinde kullanılacak alerjenler üretmeyi hedefledik. Bu amaçla laboratuvarında SDA (Sabouraud Dekstroz Agar) ortamında kültüre edilerek çoğaltılan *Botryotinia fuckeliana*'nın protein miktarı BCA (Bikinkoninik Asit) yöntemi ile belirlenmiştir.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

2.1. Alerji

Alerji, vücudunuz için tipik olarak zararlı olmayan yabancı bir maddeye karşı bir bağışıklık sisteminin oluşturduğu tepkiye verilen addır. Bu yabancı maddelere alerjen denir. Belirli besin kaynaklarını, çiçeklerden salınan polenleri veya evde beslenen hayvanların tüylerini içerebilirler [8].

Bağışıklık sisteminiz, bize zarar verebilecek patojenlere karşı savaşarak bizi sağlıklı tutmakla görevlidir. Bu görevi, vücudunuz için tehlike arzedecek her şeye karşı saldırı gerçekleştirerek yapar. Alerjene bağlı olarak, bu yanıt iltihaplanma, hapşırma veya bir dizi başka semptom içerebilir [8].

Bağışıklık sistemi normalde ortama uyum sağlar. Örneğin, vücut herhangi bir evcil hayvan kepeği ile karşılaştığında, bunun zararsız olduğunu anlamalıdır. Tehlikeli alerjisi olan insanlarda, bağışıklık sistemi onu vücuda karşı tehdit niteliği taşıyan bir dış istilacı olarak algılar ve ona saldırır [8].

2.2. Alerjinin Semptomları

İlgili maddeye bağlı olarak alerji semptomları solunum yollarını, sinüsleri ve burun pasajlarını, deriniyi ve sindirim sistemini etkileyebilir. Alerjik reaksiyonlar hafif ile şiddetli arasında değişebilir. Bazı ciddi vakalarda alerjiler, anafilaksi olarak bilinen hayatı tehdit eden bir reaksiyonu tetikleyebilir [9].

- Alerjik rinit olarak da adlandırılan saman nezlesi şunlara neden olabilir:
- Hapşırma
- Burunda, gözlerde veya ağzın çatısında kaşınma
- Burun akıntısı, tıkalı burun
- Sulu, kırmızı veya şişmiş gözler (konjonktivit)

Bir gıda alerjisi şunlara neden olabilir:

- Ağızda karıncalanma
- Dudakların, dilin, yüzün veya boğazın şişmesi
- Kurdeşen
- Anafilaksi

Böcek sokması alerjisi şunlara neden olabilir:

- Sokma yerinde geniş bir şişlik (ödem) alanı
- Vücudun her yerinde kaşıntı veya kurdeşen
- Öksürük, göğüste sıkışma, hırıltı veya nefes darlığı
- Anafilaksi

Bir ilaç alerjisi şunlara neden olabilir:

- Kurdeşen
- Kaşınan cilt
- Döküntü
- Yüzün şişmesi
- Hırıltı
- Anafilaksi

Egzama olarak da adlandırılan alerjik bir cilt durumu olan atopik dermatit, aşağıdakilere neden olabilir:

- Kaşıntı
- Kızarmak

2.3. Besin Alerjisi

Besin alerjisi, belirli bir gıdayı tükettikten hemen sonra oluşabilen bir bağışıklık sistemi reaksiyonudur. Alerjiye sebep olan gıdaların ufak bir miktarı bile sindirim sorunlarına, kurdeşene veya şişmiş hava yolları gibi belirti ve semptomları ortaya çıkarabilir. Bazı insanlarda, bir gıda alerjisi ciddi semptomlara ve hatta anafilaksi olarak bilinen hayatı tehdit eden bir reaksiyona neden olabilir [8-9] Gıda alerjisi, 3 yaşın altındaki çocukların tahmini yüzde 6 ila 8'ini ve yetişkinlerin yüzde 3'üne

kadarını etkiler. Tedavisi olmasa da, bazı çocuklar yaşlandıkça gıda alerjilerini aşar [9-10]

Bir besin alerjisini, besin intoleransı olarak ve toplumda çok daha yaygın olarak görülen bir reaksiyonla karıştırmak kolaydır. Günlük hayatı etkilese bile, gıda intoleransı, bağışıklık sistemini içermeyen daha az ciddi bir durumdur [9-10]

2.4. Mevsimsel Alerjiler

Belirli bir mevsimde ortaya çıkan bir alerji (alerjik rinit) daha yaygın olarak saman nezlesi olarak bilinir. Amerikan Alerji, Astım ve İmmünoloji Akademisi'ne göre, Amerikalıların yaklaşık yüzde 8'i bunu yaşıyor [10].

Saman nezlesi, bağışıklık sisteminiz polen gibi bir açık hava alerjenine aşırı tepki verdiğinde ortaya çıkar. Alerjen, alerjik yanıtı tetikleyen bir şeydir. En yaygın alerjenler ağaçlar, otlar ve yabancı otlar gibi rüzgarla polenlenen bitkilerden gelen polenlerdir. Böceklerle tozlanan bitkilerden gelen polenler havada uzun süre kalamayacak kadar ağırdır ve alerjik reaksiyonu tetikleme olasılıkları daha düşüktür [8-10].

Saman nezlesi, adını saman kesme mevsiminden alır. Tarihsel olarak, bu aktivite yaz aylarında meydana geldi, aynı zamanda birçok insan semptomlar yaşadı. Mevsimsel alerjiler kış aylarında daha az görülür, ancak yıl boyunca alerjik rinit yaşamak mümkündür. Farklı bitkiler, kendi polenlerini yılın farklı zamanlarında yayarlar. Alerji tetikleyicilerinize ve yaşadığınız yere bağlı olarak, birden fazla mevsimde saman nezlesi yaşayabilirsiniz. Küf veya evcil hayvan kepeği gibi iç mekan alerjenlerine de tepki verebilirsiniz [8-9-10].

2.5. Derideki Alerjiler

Deri alerjileri, bir alerjinin belirtisi veya belirtisi olabilir. Ayrıca bir alerjene maruz kalmanın doğrudan sonucu olabilirler.

Örneğin, alerjiniz olan bir yemeği yemek birkaç belirtiyeye neden olabilir. Ağzınızda ve boğazınızda karıncalanma hissedebilirsiniz. Ayrıca kızarıklık gelişebilir [10]. Ancak kontakt dermatit, cildinizin bir alerjenle doğrudan temas etmesinin sonucudur. Bu, temizlik ürünü veya bitki gibi alerjiniz olan bir şeye dokunursanız olabilir. Cilt alerjisi türleri şunları içerir:

- Döküntüler; Cilt bölgeleri tahriş olur, kızarıır veya şişer ve ağrılı veya kaşıntılı olabilir.
- Egzama; Cilt lekeleri iltihaplanır ve kaşınabilir ve kanayabilir.
- Kontakt dermatit; Bir alerjenle temastan hemen sonra kırmızı, kaşıntılı cilt lekeleri oluşur.
- Boğaz ağrısı; Farenks veya boğaz tahriş olmuş veya iltihaplanmıştır.
- Kurdeşer; Derinin yüzeyinde çeşitli boyut ve şekillerde kırmızı, kaşıntılı ve kabarık kenarlar oluşur.
- Şişmiş gözler; Gözler sulu veya kaşıntılı olabilir ve “kabarık” görünebilir.
- Kaşıntı; Deride tahriş veya iltihaplanma var.
- Yanma; Cilt iltihabı ciltte rahatsızlığa ve batma hissine yol açar.

2.6. Alerji Nedenleri

Araştırmacılar, normalde zararsız bir yabancı madde vücuda girdiğinde bağışıklık sisteminin neden alerjik reaksiyona neden olduğundan tam olarak emin değiller. Alerjilerin genetik bir bileşeni vardır. Bu, ebeveynlerin onları çocuklarına aktarabileceği anlamına gelir. Bununla birlikte, yalnızca alerjik reaksiyona genel bir yatkınlık genetikdir. Spesifik alerjiler aktarılmaz. Örneğin, annenizin kabuklu deniz ürünlerine alerjisi varsa, sizin de öyle olacağınız anlamına gelmez [11].

Yaygın Alerjen Tipleri:

- Hayvansal Ürünler: Bunlara evcil hayvan kepeği, toz akarı atıkları ve hamamböceği dahildir.
- İlaçlar: Penisilin ve sülfü ilaçları yaygın tetikleyicilerdir.
- Besinler: Buğday, fındık, süt, kabuklu deniz ürünleri ve yumurta alerjileri yaygındır.
- Böcek Sokmaları: Bunlara arılar, eşekarısı ve sivrisinekler dahildir.
- Küfler: Küften havadaki sporlar bir reaksiyonu tetikleyebilir.

- Bitkiler: Otlardan, yabani otlardan ve ağaçlardan gelen polenler ile zehirli sarmaşık ve zehirli meşe gibi bitkilerden gelen reçineler çok yaygın bitki alerjenleridir.
- Diğer Alerjenler: Lateks eldivenlerde ve prezervatiflerde sıklıkla bulunan lateks ve nikel gibi metaller de yaygın alerjenlerdir.

Saman nezlesi olarak da bilinen mevsimsel alerjiler, en yaygın alerjilerden bazılarıdır. Bunlara bitkiler tarafından salınan polenler neden olur [11].

2.6.1. Alerji Mekanizmaları

Alerjik hastalıklar yol açan alerjen maddeler hasta bireylerin vücudunda IgE üretilmesi sonucunda inflomasyona neden olurlar. Farklı alerjik hastalıklarda benzer inflomasyonlar görülebilir [12]. Atopik bireylerde meydana gelen inflomasyonlar lenfositler, mast hücreleri, bazofiller, eozinofiller ve nötrofillertarafından üretilen sitokinler, kemokinler , reaktif oksijen ürünlerinin ve lipit mediatörlerinin salgılanması sonucunda ortaya çıkmaktadır. Mast hücrelerinin hareketliliği, bazofil, eozinofil ve nötrofillerin bölgeye hareket etmeleri ve IgE' ye bağlı olarak alerjik inflomasyonlar, spesifik olarak üretilen T lenfositleri tarafından kontrol edilir [13].

2.7. Alerji Tanı Yöntemleri

2.7.1. Deri Prick Testi

Deri prick testi, birçok yaygın alerji türünü doğrulayabilir. Bazı durumlarda cilt testleri, alerjenleri doğrulamanın en doğru ve en ucuz yolu olabilir. Delinme/kazıma testi için, doktor veya hemşire olası alerjenden küçük bir damlayı deriye bırakır. Daha sonra damlanın içinden bir iğne ile cildinizi hafifçe delerler veya çizerler. Maddeye duyarlıysanız, test bölgesinde 15 dakika içinde kızarıklık, şişme ve kaşıntı meydana gelir. Ayrıca kovana benzeyen bir "kabarcık" veya yükseltilmiş, yuvarlak bir alan da görebilirsiniz. Genellikle, kabarıklık ne kadar büyükse, alerjene karşı alerjiniz o kadar yüksek olur [14-15].

Bilinmesi Gerekenler:

- Pozitif bir cilt testi sonucu tek başına bir alerjiyi teşhis etmez.
- Pozitif bir cilt testi, alerjik reaksiyonun şiddetini öngörmez.

- Negatif bir cilt testi genellikle alerjiniz olmadığı anlamına gelir.



Şekil 2.1 Deri prick testi örneği [14].

2.7.2. İntradermal Test

İntradermal (deri altı) testte, doktor veya hemşire cildin dış tabakasına az miktarda alerjen enjekte eder. Doktor, deri prik testi gibi sonuçlar için belirli bir süre sonra cildinizi kontrol eder. Doktorlar, cilt prick testi sonuçları negatifse ancak yine de alerjiniz olduğundan şüpheleniyorlarsa bu testi kullanabilirler. Bir doktor bu testi ilaç veya zehir alerjisini teşhis etmek için kullanabilir. Şu anda, gıda alerjisi için intradermal deri testi için çok az endikasyon vardır [16].



Şekil 2.2 İntradermal test örneği [14].

2.7.3. Kan Testleri (Spesifik IgE)

Bir cilt rahatsızlığınız varsa veya cilt testini engelleyen ilaç kullanıyorsanız, alerjen kan testleri kullanılabilir. Deri testini tolere edemeyen çocuklar için de kullanılabilirler.

Doktorunuz bir kan örneği alacak ve bir laboratuvara gönderecektir. Laboratuvar alerjeni kan örneğinize ekler ve ardından kanınızın alerjenlere saldırmak için ürettiği antikor miktarını ölçer. Bu test, Spesifik IgE (sIgE) Kan Testi olarak adlandırılır (önceden ve yaygın olarak RAST veya ImmunoCAP testi olarak anılırdı). Bu test, yanlış pozitif sonuç oranlarının yüksek olması nedeniyle iyi bir tarama testi değildir. Birisi için alerjinin ne kadar şiddetli olduğunu belirleyebilecek bir test yoktur [17-18].

2.7.4. Total IgE Testleri

IgE yüksekliğinin alerjik hastalıklar dışında birçok klinik tabloda da görülmesi, semptomlardan sorumlu alerjenin belirlenmesinde diğer alerji testleri ile birlikte değerlendirilmesini gerektirmektedir [18].

2.7.4. Provakasyon Testleri

Nazal provokasyon testi, konjunktiva provokasyon testi, oral provokasyon testi ve bronşial provokasyon testi olmak üzere dörde ayrılır [18].

2.7.4.1. Nazal Provakasyon Testleri

Alerjenler ayrı ayrı ve tek tek belirli aralıklarla spey yada enjektör yardımıyla nazal mukozaya aktarılır. Duyarlı olunan alerjenlerde alerjik reaksiyonlar (aksırma, burun akıntısı, öksürük vb.) gözlem yoluyla tespit edilir [18].

2.7.4.2. Konjunktiva Provakasyon Testi

Kuru veya sıvı haldeki alerjenler ayrı ayrı ve tek tek belirli aralıklarla gözde, sklerayı kaplayan ince şeffaf yapıdaki konjunktiva adı verilen zara uygulanır. Duyarlı olunan alerjenlerdeki bulgular (kaşıntı, gözyaşı, kızarıklık) gözlenir [18].

2.7.4.3. Oral Provakasyon Testi

Oral provokasyon testi, besin yükleme testi olarak adlandırılır. Besin ve ilaç alerjilerinin tespit edilmesinde altın standart kabul edilir. Teste başlanmadan önce şüpheli besinlerin veya ilaçların belirli bir süre tüketilmemesi gerekir.

Provokasyon yapılacak şüpheli besin veya ilaçlar en düşük dozdan başlanarak tek tek artan miktarda oral yolla verilerek bulgular (baş ağrısı, mide bulantısı) gözlenir [17-18].

2.7.4.4. Bronşial Provokasyon Testi

Bronşial provokasyon testi, inhalan alerjenlere karşı duyarlılığı tespit etmede kullanılır. Provokasyon yapılacak madde gaz formunda düşük dozdan başlanarak tek tek artan miktarda hastaya solunum yoluyla verilir. Bronşların daralması sonucunda öksürük, nefes darlığı gibi bulgular gözlenerek değerlendirme yapılır. [17-18].

2.8. Mantarlar Alemi

Mantarlar bilim adamları tarafında uzun bir süre bitkiler aleminde mycota bölümünde sınıflandırmış daha sonra ise protista aleminde sınıflandırmışlardır. Ancak beslenme tipleri, sindirim şekilleri, hücre yapıları, üre ve büyüme şekillerindeki farklılıklardan dolayı 1969 yılında Robert Whittaker tarafından ayrı bir alem olarak kabul edilmişlerdir [15].

Mantarlar ökaryotik hücre yapısına sahip olmaları nedeniyle bakterilerde, heterotrof beslenmeleri, kloroplast bulundurmamaları, hücre duvarlarının kitin yapıda olması ve depo polisakkarit olarak glikojen taşımaları nedeniyle bitkilerden, hücre duvarı bulundurmaları, saprofit beslenen türlerinin olması ve besinlerini absorpsiyonla almaları nedeniyle hayvanlardan farklı bir alemde yer almışlardır [15].

Mantarlar doğada çok sayıda bulunur ve oldukça geniş alanlara yayılmışlardır. Ekmek, portakal, domates, salça, peynir gibi besinlerin açıkta bırakıldığında üzerinde gelişen küf mantarları bize mantar sporlarının atmosferde ne kadar geniş alana yayıldığını ispatlamaktadır [15].

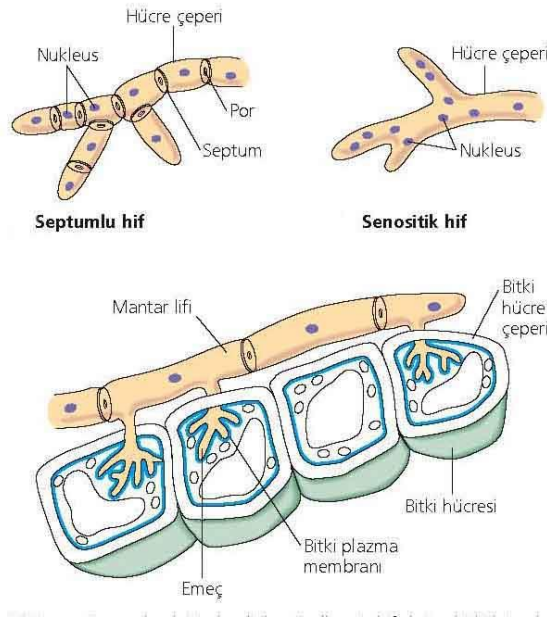
Mantarlar heterotrof canlılardır. Ayırıştırıcı veya parazit olarak beslenirler. Ayırıştırıcı mantarlar hücre içerisinde ürettikleri sindirim enzimlerini hücre dışına salgılayarak üzerinde yaşadıkları ölmüş bitki ve hayvanların üzerinde veya bunların atıkları olan polimer maddeleri monomerlerine kadar parçalar bu sayede organik maddeleri inorganik maddelere dönüştürerek madde döngüsüne katkıda bulunur [19]

Ayırıştırıcı mantarlar ekosistemin denge kalmasında görev alan önemli canlılardır. Parazit mantarlar ise simbiyotik birliktelik kurdukları, üzerinde yaşadıkları bitki veya hayvanlardan sağlarlar. Bu simbiyotik birliktelikte mantarlar parazit canlı olarak

adlandırılır, üzerinde yaşadığı canlıya ise konak adı verilir. Mantar besin ihtiyacını konak canlıdan sağlar, kendisi bu birliktelikten fayda görürken konak canlı bu birliktelikten zarar görür [19-20]. Mantarların simbiyotik birlikteliğine bir diğer örnekte mutualist yaşam verilebilir. Mutualizmde farklı türdeki organizmalar birbirlerine fayda sağlayarak birlikte yaşarlar. Mutualist mantarlara liken ve mikoriza birliktelikleri örnek verilebilir. Mikoriza mantarları bitki köklerinde yaşarlar ve bitki köklerinin bir uzantısı gibi bitkiye su ve mineral sağlayarak bitkiye fayda sağlarlar. Bu birliktelikten bitki de mantara fotosentez sonucu ürettiği organik besinlerden vererek mantara katkı sağlar. Liken birlikteliği ise mantarlar ve algler arasında gerçekleşen simbiyotik birlikteliktir. Bu birliktelikte mantar fotosentez için gerekli olan su ve diğer inorganik besinlerin topraktan alınmasını sağlarken alg fotosentez sonucu ürettiği organik besinlerden vererek mantara katkı sağlar [19-20].

Bir hücreli mantarlar olan mayalar hariç mantarlarda hif adı verilen hücre duvarıyla sarılmış uzun ipliksi bir yapı bulunur. Hiflerin bölmeli olan kısımlarına septum(septa) adı verilir. Mantar hifleri septalı yada septasız olabilir. Bölmeli hiflere septumlu hif, bölmesiz hiflere senositik hif adı verilir [21].

Hiflerden emeç adı verilen uzantılar oluşur bu uzantılarla mantar konak canlıya tutunur ve besin ihtiyacını emeçleri sayesinde konak canlıdan karşılamış olur [21].



Şekil 2.3 Mantarlarda hif yapısı ve emeçler [15].

Mantarların yapısı aşağıdaki noktalarda açıklanabilir:

- Maya hücreleri hariç hemen hemen tüm mantarlar filamentli bir yapıya sahiptir.
- Tek hücreli veya çok hücreli organizma olabilirler.
- Mantarlar, hif olarak bilinen uzun iplikli yapılardan oluşur. Bu hifler birlikte miselyum adı verilen ağ benzeri bir yapı oluşturur.
- Mantarlar, kitin ve polisakkaritlerden oluşan bir hücre duvarına sahiptir.
- Hücre duvarı, hücre zarı, sitoplazma, hücre organelleri ve çekirdekler gibi diğer hücre parçalarına farklılaşan protoplast içerir.
- Çekirdek, kromatin ipliklerle yoğun, berraktır. Çekirdek bir nükleer zar ile çevrilidir.

Mantarların Özellikleri:

- Mantarlar ökaryotik, damarsız, hareketsiz ve heterotrofik organizmalardır.
- Tek hücreli veya filamentli olabilirler.
- Sporlar yoluyla çoğalırlar.
- Mantarlar, neslin değişmesi olgusunu sergiler.
- Mantarlarda klorofil yoktur ve bu nedenle fotosentez yapamazlar.
- Mantarlar besinlerini nişasta şeklinde depolar.
- Kitinin biyosentezi mantarlarda meydana gelir.
- Mantarların çekirdekleri çok küçüktür.
- Mantarların embriyonik aşaması yoktur. Sporlardan gelişirler.
- Üreme şekli eşeyli veya eşeysizdir.
- Bazı mantarlar parazitiktir ve konakçıyı enfekte edebilir.

- Mantarlar, mantarlarda cinsel üremeye yol açan feromon adı verilen bir kimyasal üretir.
- Örnekler arasında mantarlar, küfler, maya sayılabilir [19-20-21].

2.8.1. Mantarların Sınıflandırılması

Mantarlar alemi farklı modlara göre sınıflandırılır. Mantarların farklı sınıflandırması aşağıdaki gibidir:

1. Beslenme şekline göre: Beslenme temelinde, mantarlar alemi 3 gruba ayrılabilir.

- Saprotik - Mantarlar besinlerini ölü organik maddelerle beslenerek elde ederler. Örnekler: Rhizopus, Penicillium ve Aspergillus.
- Parazitik – Mantarlar beslenmelerini diğer canlı organizmalar (bitkiler veya hayvanlar) üzerinde yaşayarak elde ederler ve konakçılarından besinleri emerler. Örnekler: Taphrina ve Puccinia.
- Simbiyotik - Bu mantarlar, her ikisinin de karşılıklı olarak yararlandığı diğer türlerle birbirine bağlı bir ilişki ilişkisi kurarak yaşar. Örnekler: Likenler ve mikoriza. Likenler, algler ve mantarlar arasındaki simbiyotik birlikteliktir. Burada hem alglerden hem de mantarlardan karşılıklı olarak yararlanır, çünkü mantarlar algler için barınak sağlar ve ters alg sentezinde mantarlar için karbonhidratlar sağlar.

2. Spor Oluşumuna Göre: Mantarlar alemi, sporların oluşumuna göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılır:

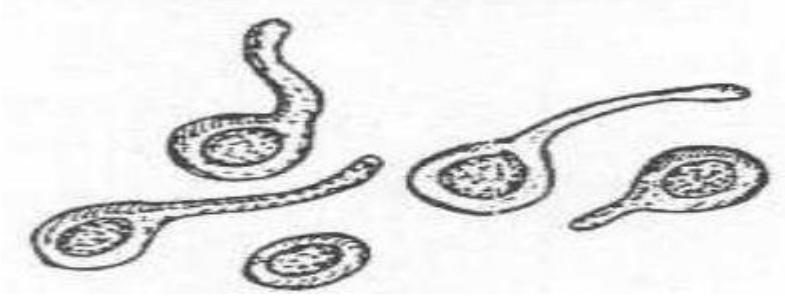
- Zigomycetes - Bunlar iki farklı hücrenin birleşmesi ile oluşur. Cinsel sporlar zigosporlar olarak bilinirken, aseksüel sporlar sporangiosporlar olarak bilinir. Hücre septa içermez.
- Ascomycetes - Ayrıca kese mantarları olarak da adlandırılırlar. Koprofil, ayrıştırıcı, parazit veya saprotik olabilirler. Cinsel sporlara askospor denir. Eşeysiz üreme, konidiosporlar tarafından gerçekleşir. Örnek – Saccharomyces

- Basidiomycetes – Mantarlar en yaygın bulunan basidiomycetes'tir ve çoğunlukla parazit olarak yaşarlar. Eşeyli üreme, basidiosporlar tarafından gerçekleşir. Eşeysiz üreme, konidia, tomurcuklanma veya parçalanma ile gerçekleşir. Örnek – Agaricus
- Deuteromycetes – Diğer mantarlar gibi düzenli üreme döngüsünü takip etmedikleri için kusurlu mantarlar olarak adlandırılırlar. Cinsel olarak üremezler. Eşeysiz üreme konidia ile gerçekleşir. Örnek – Trikotoderma [19-20-21].

2.8.2. Mantarlarda Üreme

Mantarlar eşeyli ve/veya eşeysiz olarak çoğalırlar. Bazı mantarlar hem eşeyli hem de eşeysiz olarak ürerken, bazı mantarlar ise sadece eşeysiz (mitoz yoluyla) çoğalır.

Hem eşeyli hem de eşeysiz üremede mantarlar, ana organizmadan ya rüzgarla süzülerek ya da bir hayvan vasıtası ile dağılan sporlar üretir. Mantar sporları bitki tohumlarından daha küçük ve hafiftir. Dev kabarık mantarlar patlayarak açılır ve trilyonlarca sporu serbest bırakır. Serbest bırakılan çok sayıda spor, büyümeyi destekleyecek bir ortama ulaşma fırsatı yakalar [22-23].



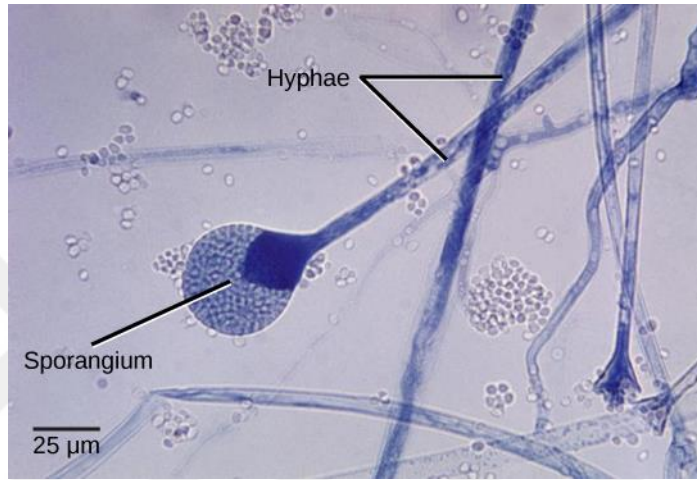
Şekil 2.4 Spordan, jerm tüpü oluşumu.

2.8.2.1. Aseksüel Sporlar

Mantarlar parçalanarak, tomurcuklanarak veya spor üreterek eşeysiz olarak çoğalırlar. Hif parçaları yeni koloniler üretebilir. Misel parçalanması, bir mantar miselyumunun parçalara ayrıldığı ve her bir bileşenin ayrı bir miselyuma dönüştüğünde meydana gelir. Mayada bulunan somatik hücreler tomurcukları oluşturur. Tomurcuklanma sırasında (bir tür sitokinez), hücrenin yanında bir şişkinlik oluşur, çekirdek mitotik olarak bölünür ve tomurcuk sonunda kendini ana hücreden ayırır. Eşeysiz üremenin en yaygın şekli, yalnızca bir dişi mantarla tarafından (mitoz yoluyla) üretilen ve genetik olarak o mantarla aynı olan aseksüel sporların oluşumu yoluyla gerçekleşir. Sporlar, mantarların dağılımlarını genişletmesine ve yeni

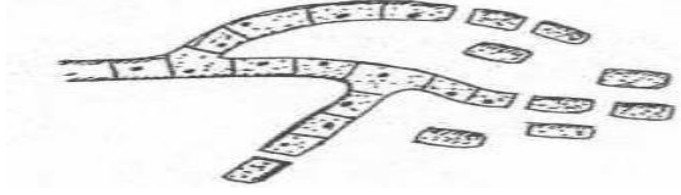
ortamları kolonize etmesine izin verir. Ana tallustan, sporangium adı verilen özel bir üreme kesesinin dışında veya içinde salınabilirler [22-23].

Birçok aseksüel spor türü vardır. Konidiosporlar, doğrudan hifin ucundan veya yanından salınan tek hücreli veya çok hücreli sporlardır. Diğer aseksüel sporlar, spor olarak salınan hücreleri oluşturmak için bir hifin parçalanmasından kaynaklanır; bunlardan bazıları parçayı çevreleyen kalın bir duvara sahiptir. Diğerleri vejetatif ana hücreden tomurcuklanır. Sporangiosporlar bir sporangiumda üretilir [22-23].



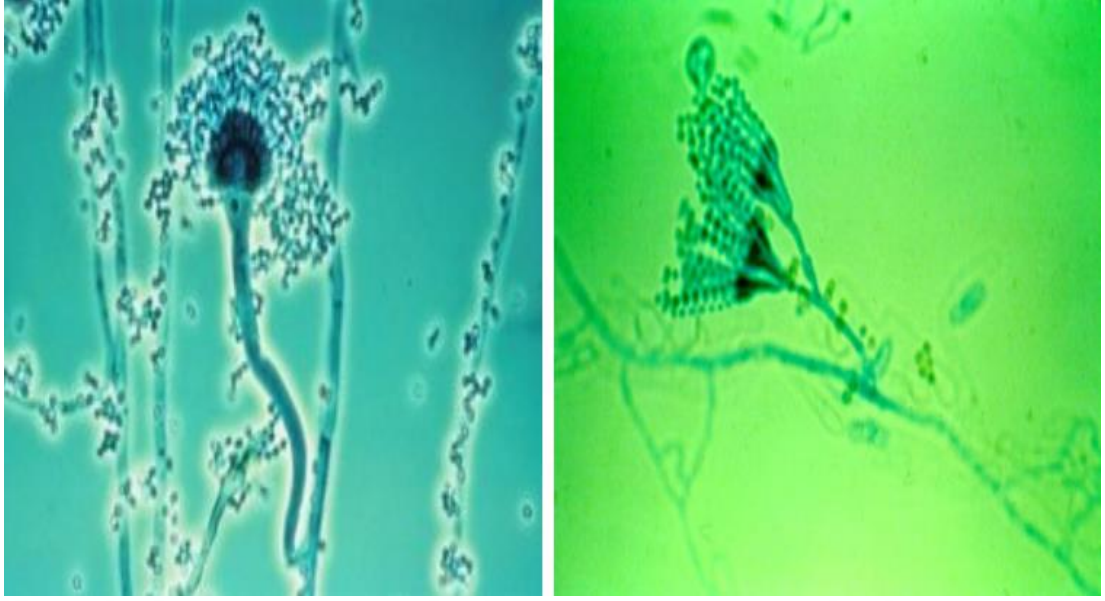
Şekil 2.5 Bir sporangiumdan sporların salınması [15].

1. Arthrosporlar: Arthrosporlar, mantar misellerinin parçalanması veya dezartikülasyonu ile oluşan çok ilkel bir spor türüdür. Geotricum ve Trichosporon cinsleri gibi birçok maya benzeri mantar arthrosporlar oluşturur. Bu organizmalar, kesin tanımlama için bir dizi biyokimyasal test gerektirir. Birçok mikrofungus (örneğin dermatofitler), morfolojik olarak farklı sporların yanı sıra arthrosporlar da dahil olmak üzere birden fazla spor türü oluşturur. Diğer mikrofunguslar yalnızca arthrosporlar oluştururlar, ancak benzersiz olan mekanizmalara veya diğer yapısal morfolojilere sahiptirler. Basidiomycetlerin (mantarların) çoğu, misel fazlarının bir parçası olarak arthrosporlar oluşturur; bu arthrosporlar ayırt edici değildir ve çoğunlukla tanımlamada yardımcı değildir. Hava miselleri ve birçok arthrospor ile izole edilen koloniler, büyük olasılıkla mantarlardan filizlenen basidiosporların sonucudur[22-23].

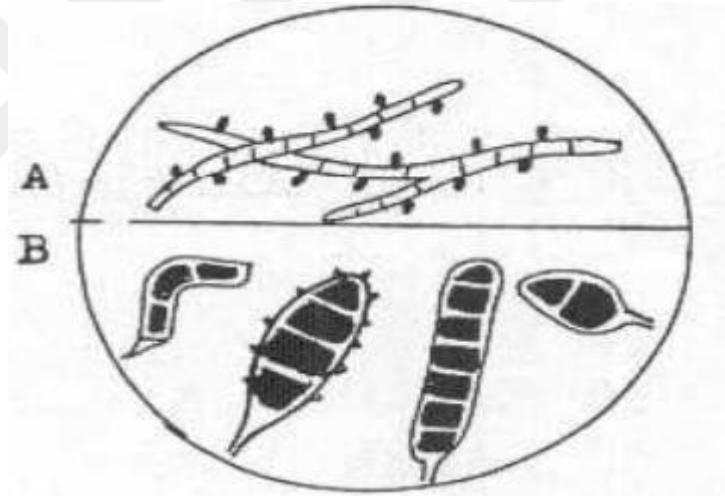


Şekil 2.6 Arthrospor oluşumu [22].

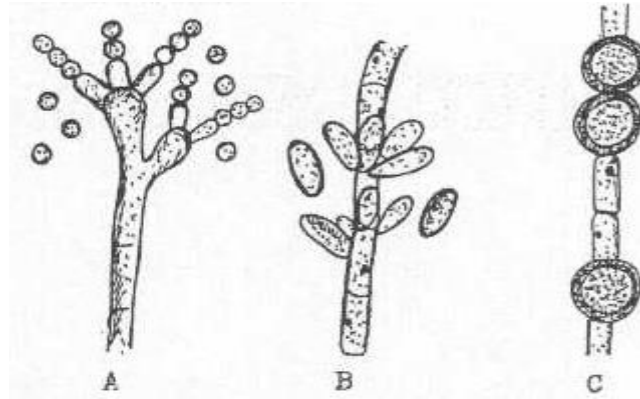
2. Blastosporlar: İpliksi Ascomycetes mantarlarında, mayalarda ve maya benzeri koloni oluşturan mantarlar, minik tomurcuklar ile farklı yerlerde hif oluşturlar . Genellikle birden fazla küçük tomurcuklar (blastosporlar) gelişir ve büyür. Daha sonra bağımsız hale gelir ve olgunlaşırlar [22-24].
3. Klamidiosporlar: Hiflerdeki bazı hücreler büyür, gelişir, kenar (hücre duvarı) kalınlaşır ve protoplazma, klamidiosporları oluşturmak üzere konsantre hale gelir. Kalın hücre duvarı ile çevrili sporlar çevreye karşı dayanıklıdır (mekanik, fiziksel ve kimyasal faktörler). Hiflerin ortasında, klamidiosporlar oluşabilir [22-24].
4. Konidiosporlar: İpliksi Ascomycetes ve birkaç Deuteromycetes (Fungi imperfecti) mantarlarda görülürler. Sporlar (conidia), özel üreme organlarının yanında ve sonunda ortaya çıkar. Bu hifler, hava hiflerinin değiştirilmesi ve farklılaşmasıyla oluşur. Bazı sporlar doğrudan verimli hiflerde oluşur. Kısa bir sterigmata (Sporotrichum) üzerinde başka sporlar da oluşabilir. Dermatofitlerde (Microsporum, Trichopyton) aynı hif üzerinde 2 farklı conidium bulunur. Tek hücre tipleri hiflerin farklı yerlerinde lokalize olup küçük, oval, küresel şekilli olabilir (mikrokonidyum). Çok hücreli hücre tipleri aynı zamanda limon veya puro şeklinde olan büyük sporlardır (makrokonidium) ve bu sporlar birden fazla hücreye ayrılır. Conidiumlar küresel, yuvarlak, mekik veya şişe gibi şekilli, büyük veya küçük boyutludur. Boyut, şekil, diziliş ve diğer morfolojik özellikler Konidiosporların özellikleri mantar türlerini ayırt etmek için kullanılır (Aspergillus, Penicillium ve Hormodendrum) [22-24].



Şekil 2.7 Konidiosporlar [15].

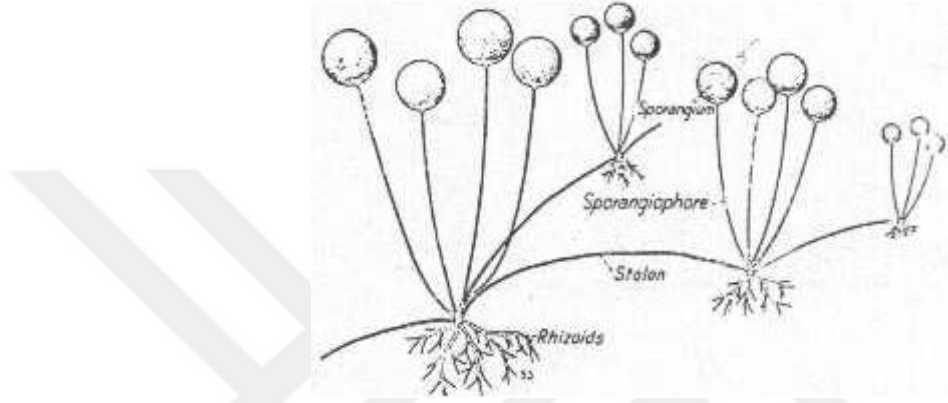


Şekil 2.8 A) Mikrokonidium, B) Makrokonidium [22].



Şekil 2.9 Çeşitli aseksüel sporlar. A) Konidiospor B) Blastospor C) Klamidiospor [22].

5. Sporangiosporlar: Phycomycetes mantarlarında gözlenir. Bu sporlar (sporangiospore) büyük ve küresel şekilli özel hiflerin sonunda yerleşmiştir. Sporlar genellikle dehidre şekilde ve kenarları kalındır. Kolumella desteklemek için sporangiumların dibinde bulunur. Bu sporangiumlar patladığında sporlar ortaya çıkar. En uygun çevresel koşullar kendi mantar türlerini oluşturmak için bu sporların çimlenmesine yol açar [22-24].

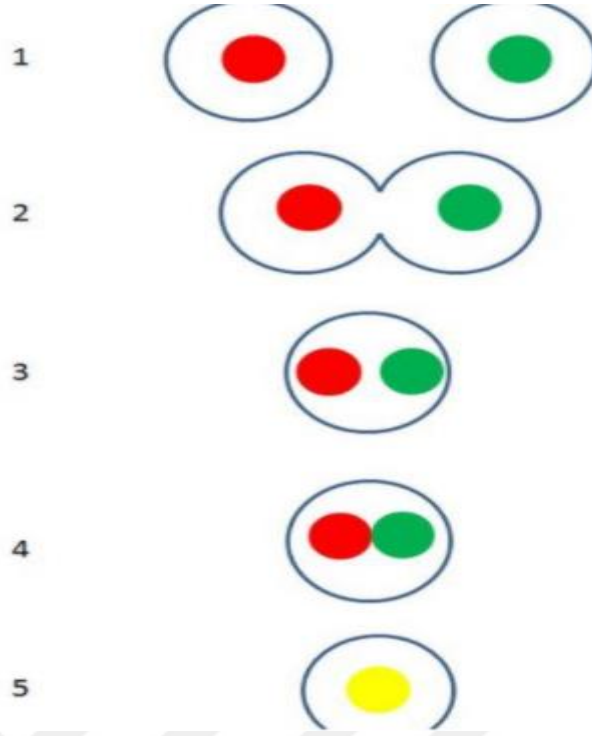


Şekil 2.10 *Rhizopus nigricans* 'da sporangiofor ve sporangiumlar [22].

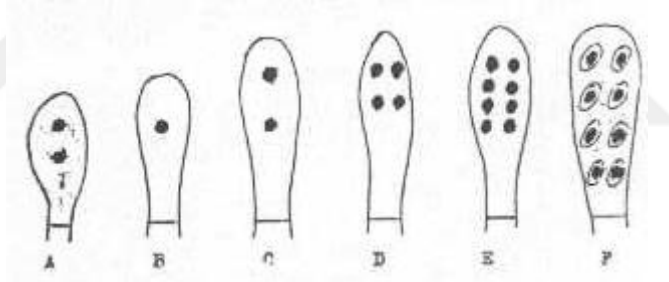
2.8.2.2. Seksüel Sporlar

Eşeyli üreme, bir mantar popülasyonuna genetik çeşitlilik getirir. Mantarlarda, cinsel üreme genellikle olumsuz çevresel koşullara tepki olarak meydana gelir. İki çiftleşme tipi üretilir. Aynı miselyumda her iki çiftleşme türü de bulunduğu buda homotalik denir. Heterotalik misel, cinsel olarak üremek için iki farklı, ancak uyumlu misel gerektirir [22-23].

Mantarlar cinsel üremesinde birçok varyasyon olmasına rağmen, hepsi aşağıdaki üç şamayı içerir. İlk olarak, plazmogami sırasında (sitoplazmanın birleşmesi), iki haploid hücre birleşir ve iki haploid çekirdeğin tek bir hücrede bir arada bulunduğu dikaryotik bir aşamaya yol açar. Karyogami (nükleer birleşme) sırasında, haploid çekirdekler diploid bir zigot çekirdeği oluşturmak için birleşir. Son olarak, mayoz bölünme, içinde farklı çiftleşme türlerinde gametlerin üretildiği gametangia (tekil, gametangium) organlarında gerçekleşir. Bu aşamada sporlar çevreye yayılır [22-23].



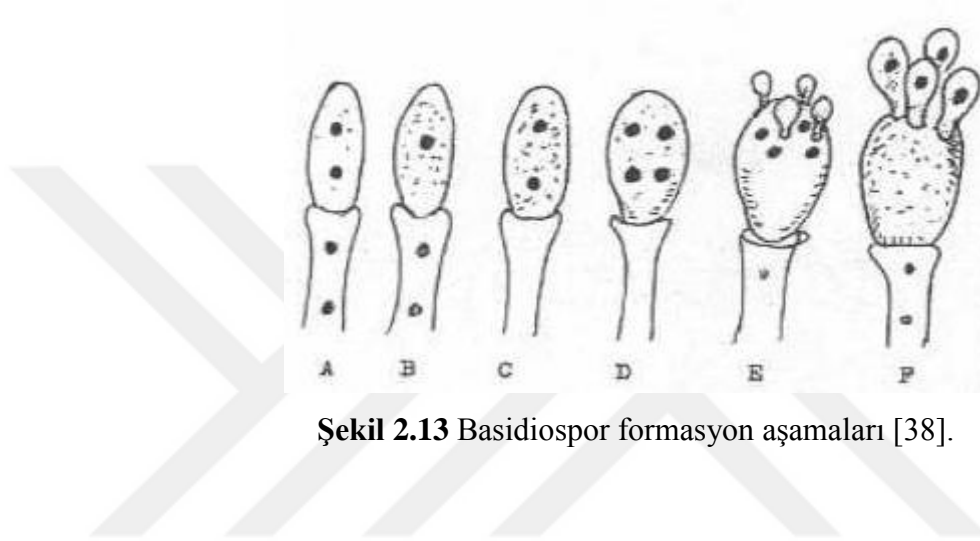
Şekil 2.11 Karyogami [25].



Şekil 2.12 Askospor formasyon aşamaları [22].

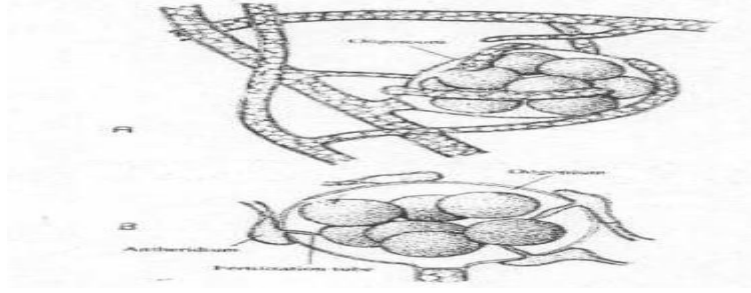
Basidiosporlar : Basidiumun her hücresinde sterigma üzerinde basidiosporlar oluşur. Sporlar, olgunlukta sterigmadan birkaç santimetre uzakta aktif olarak boşaltılır Basidiosporlar küçük, $7,6 \times 6 \mu\text{m}$ (D. L. Uzun, kişisel iletişim), hiyalin ve oval şekillidir. Teliospor nemlendikten sonra 20-25 dakika içinde gelişebilir ve salınırlar [123]. Ancak bazı canlı teliosporlar 3-6 gün veya daha uzun süre çimlenmeyebilir [1232]. Alternatif ıslatma ve kurutma, dondurma ve çözme teliospor çimlenmesini indüklemeye yardımcı olabilir. Basidiosporlar, alternatif konakçıya, duyarlı Berberis ve Mahonia türlerine rüzgarla taşınır, ancak nadiren kaynaktan 180 ila 270 m'den daha fazla uzakta enfeksiyona neden olur. Basidiosporlar kısa ömürlüdür, ideal koşullar altında sadece birkaç saat hayatta kalırlar. Bu nedenle, basidiosporlar, bir

enfeksiyonun geliştiği ve doğrudan epidermal hücre duvarına nüfuz ettiği bir terminal apressorium'lu bir germ tüpü üreterek hızla filizlenir. Meyvelerde, gövdelerde ve diğer bitki yüzeylerinde enfeksiyonlar meydana gelmesine rağmen, enfeksiyonların çoğu üst yaprak yüzeyinde meydana gelir. Duyarlı çeşitlerin yaprakları, yaprak tomurcuğu açıldıktan yaklaşık 2½ hafta sonra penetrasyona dirençli hale gelir [22-23].



Şekil 2.13 Basidiospor formasyon aşamaları [38].

Phycomcetes mantarlarında basidiospor tarafından etkilenmesinden yaklaşık 5 gün sonra, piknia gelişiminin ilk belirtileri görünür hale gelir (Cotter,1932). Etkilenmeden 7-14 gün sonra, küçük, 1,6 x 3,6 µm (D. L. Long, kişisel iletişim), haploid, tek hücreli pikniyosporlar piknial açıklıkta viskoz bir sıvı oluşur. Pikniyospor gamet olarak işlev görür ve diğer gamet olarak işlev gören alıcı hifa ile birleşir. Döllenmeyi gerçekleştirmek için pikniyosporlar farklı bir çiftleşme tipindeki bir piknianın alıcı hifasına aktarılmalıdır. Pikniyosporların bu transferi, muhtemelen sporların süspansiyon halinde olduğu sıvıya çekilen böcekler tarafından gerçekleştirilir [22-23].



Şekil 2.14 Saprolegnia mantarlarında oogonium ve oospor oluşumu [22].

Saprolegnia mantarlarında, aynı mantar üzerindeki gametlerden erkek gamet filamentöz yapıdadır ve başka bir hifadan merkez alır. Oval biçimdeki oogoniumu uzanır ve fertilizasyon tüpü yardımıyla birleşme gerçekleşir ve böylece oosporlar oluşur. Saprolegnia mantar türlerinde gametler aynı mantar üzerindeki hifalardan kaynaklanmasına (homotallik) karşın, bazı mantarlarda, gametler farklı mantarlara ait hifalar üzerinde bulunurlar (heterotallik) [22-23].

2.8.3. Alerjik Hastalıklarda Mantarların Rollerini

Biyoaerosolün büyük kısmı mantarlardır, özellikle yaygın aeroalerjenlere ait olan filamentli mantarlardır. Dış ortamda alerjenik mantarlar *Cladosporium*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Aspergillus* ve *Penicillium* cinslerini içerir. Toprak, en yoğun mantarların bitki ve hayvan kalıntılarını kullandığı yerdir. Birçok tür, çeşitli türlerin özel patojenleridir. Ekinler, süs bitkileri, meyve ve sebzeler. Bazı ekonomik açıdan önemli bitkilerin hastalıklarına neden olurlar. En iyi 6-35°C sıcaklıkta gelişirler ve yüksek neme ihtiyaç duyarlar (%70'in üzerinde) [26].

İç mekanların hava boşluğunda yıl boyunca mantarlarının alerjenleri bulunur. Bazılarında havadaki sporların sayısı metreküp başına 250000'i geçebilir. Gelişimleri, ışığa, rüzgar geçirmezliğe, zayıf sınırlı havalandırma koşullarına ve yüksek neme göre artabilir İnsanlar havuzlarda ve saunalarda da alerjenlere maruz kalmaktadır. Küf oluşumu genellikle ıslak odalarda bulunur. Duvar kağıdı veya fayanslar arasındaki haçlarda bulunabilirler. Karakteristik mantarların uçucu metabolitlerinin neden olduğu küf kokusu havaya salınması, önemli bir istilanın kanıtıdır [26]. Potansiyel iç mekan kirliliği kaynakları arasında yemek pişirme, sigara içme, vakumlama veya süpürme gibi ev işleri de yer alır. *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Scopulariopsis* ve *Penicillium* cinslerinin mantar sporları

biyoaerosolün bir kısmı bakkaliye, çiçek, toz, halı, ahşap malzeme ve mobilyalardan salınabilir [22].

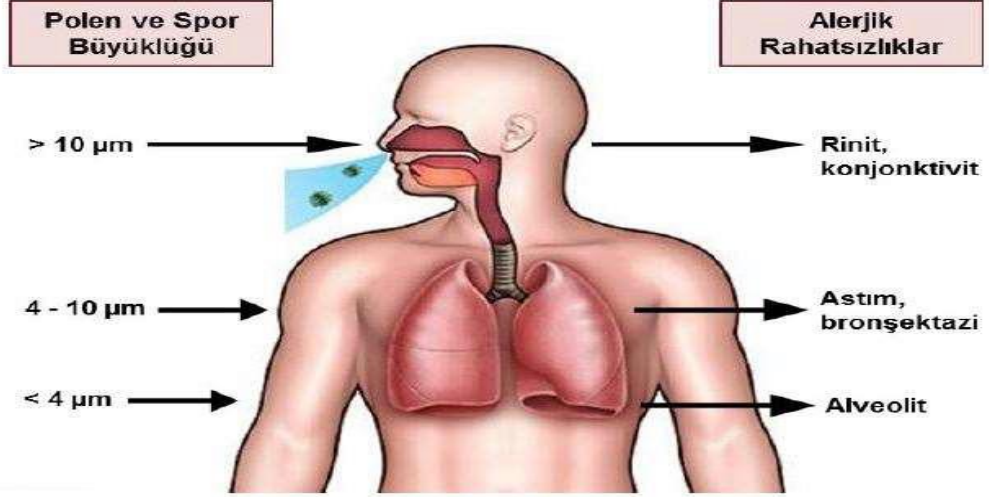
Evde bitkilerin bulunması, örneğin *Aspergillus* gibi havadaki mantar konsantrasyonunu da artırabilir. Sporlar genellikle saksı bitkilerinin toprağında bulunur. Küflere sadece konutlarda rastlanmaz. Bazı meslekler yüksek düzeyde küf sporlarına maruz kalır. Gıda endüstrisi çalışanları (örneğin fırıncılar, değirmenciler, gıda endüstrisindeki işçiler) küflü ortamda çalışmaya maruz kalabilen insanlar arasında yer alır. Küflerle temasa maruz kalan profesyonel gruplar şunları içerir: çiftçiler, bahçıvanlar, atık işleyen işçiler ve kereste fabrikası işçileri [22-27].

Gelişmiş ülkelerde genel popülasyonun yaklaşık %2-6'sının mantarlara alerjisi olduğu tahmin edilmektedir. En çok *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Fusarium* cinslerine duyarlılık saptanır. Alerjik mantarlara genellikle tip I aşırı duyarlılık olarak görünür. Atopik duyarlılık durumunda, astım, rinit veya konjonktivit olarak kendini gösterir. Bazen *Candida* ve *Aspergillus*'tan tip II aşırı duyarlılık reaksiyonuna sebep olabilir. hücre duvarının mannan-polisakkaritine yanıt *Candida* ve *Aspergillus*'tan. Tip III aşırı duyarlılığın örneği ise, alerjik alveolit ve bronkopulmoner aspergillozdur [22-27].

2.8.4. Solunum Sistemine Etkileri

Mantar ürünlerine maruz kalma önemli ölçüde açık havada gerçekleşse de, belirli koşullar altında iç mekanlarda da ortaya çıkabilir. Genellikle rutubetli evlerde mantar metabolitleri, özellikle proteazlar ve uçucu organik bileşenler aracılığıyla alerjik reaksiyonlara benzer doğal bir doku tepkisi oluşabilir. Bu aero-irritan etkilerin spesifik IgE duyarlılaşması veya diğer nedenlerin sebep olup olmadığı net değildir [28].

Parçalanmamış polen tanecikleri burun mukozasında kalma eğilimindeyken mantar sporları alt solunum yollarına ulaşarak kronik pulmoner inflamasyon ve astımı tetiklemesi olasıdır [29].



Şekil 2.15 Polen ve spor büyüklüğüne bağlı olarak gelişen rahatsızlıklar. [30].

2.8.5. Mantar Maruziyetine Duyarlılık Reaksiyonları

Mantarlar insanlarda birçok farklı alerjik hastalıklara neden olabilir (Tablo2.1). Duyarlı kişilerde mantar sporları, vejetatif hücreleri ve metabolitleri aşırı duyarlılık reaksiyonlarına yol açmabilmektedir [29].

Tablo 2.1 Sıklıkla karşılaşılan alerjenik mantarların, yaygınlıkları ve habitatları

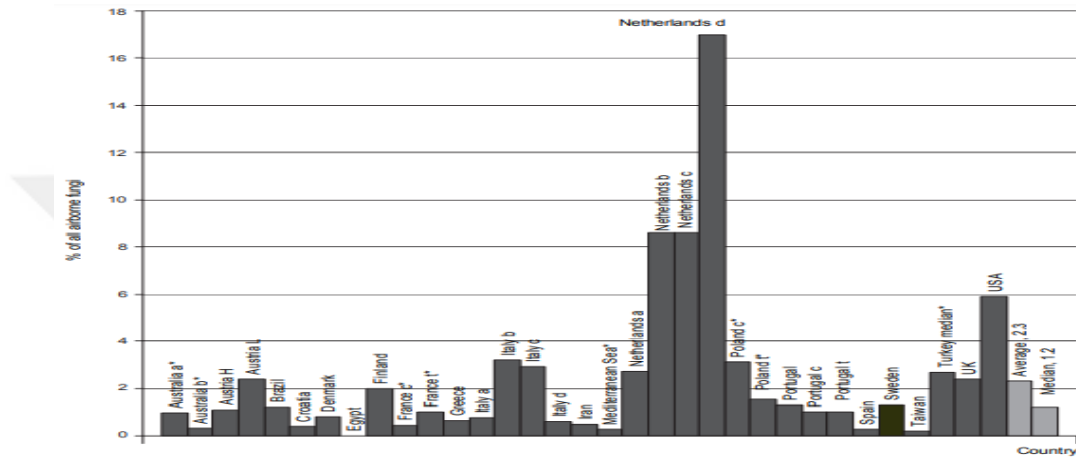
Aşırı Duyarlılık Hastalığı	Mantarlar (Cins ve/veya Türleri)
Alerjik Rinit ve Astım	<i>Agaricus, Alternaria, Aspergillus, Aureobasidium, Bipolaris, Botrytis, Chaetomium, Cladosporium, Curvularia, Drechslera, Epicoccum, Fusarium, Ganoderma, Mucor, Penicillium, Phoma, Stemphylium, Trichophyton</i>
Alerjik Bronkopulmoner Mikozlar	<i>Aspergillus fumigatus, Bipolaris, Candida albicans, Curvularia, Geotrichum</i>
Alerjik Mantar Sinüziti	<i>Alternaria, Aspergillus, Bipolaris, Curvularia, Cladosporium, Drechslera, Fusarium, Penicillium</i>
Atopik Dermatit	<i>Candida albicans, Cryptococcus diffluens, Cryptococcus liquefaciens, Malassezia (Pityrosporum)</i>
Aşırı Duyarlılık Pnömoniti (Ekstrinsik Alerjik Alveolit)	<i>Alternaria, Aspergillus, Aureobasidium pullulans, Botrytis cinerea, Cryptostroma corticale, Mucor stolonifer, Penicillium, Rhodotorula, Trichosporon, various basidiomycetes (Lentinula edodes, Pleurotus pulmonarius)</i>
Dermatofitoz	<i>Trichophyton, Epidermophyton floccosum, Microsporum canis</i>

2.9. *B. fuckeliana* Hakkında Genel Bilgiler

Botrytis cinsi mantarlar, Ascomycota şubesine bağlı Helotiales takımı, Sclerotiniaceae familyasına aittir [31]. *B. fuckeliana* Pers.: Fr. [anamorph: Botrytis cinerea (de Bary) Whetz.] parazitik ve saprofitik olarak, farklı toprak ve iklim koşullarına dayanıklı, konukçu dizisi geniş önemli bir mantardır [32]. *B. fuckeliana* konidileri, sera içerisinde oluşan anlık sıcaklık yükselişleri sonucu artan nem ile birlikte ortama hızla yayılabilmektedir. Duyarlı çeşitlerde konidiler, ortalama 15-25°C sıcaklık ve %90-95 nemde birkaç saat içinde hiflerini oluşturarak, gri-kahverengi konidiofor ve konidileri bulunduran, geniş ve düzensiz sınırları olan lezyonlara sebep olmaktadır [33]. *Botrytis* cinsi funguslar düşük sıcaklıkta saklanan

meyve ve sebzelerde de enfekte olabilmektedir. *B. fuckeliana* enfekte ettiği bitkiye göre genellikle çiçek yanıklığı, meyve çürüklüğü, gövde ve dal çürüklüğü, yaprak lekeleri, kök çürüklüğü ve yumuşak çürüklük gibi oluşumlar sergilemektedir [34].

B. fuckeliana toprakta bitki kalıntılarında sklerot formunda kış mevsimini geçirmektedir. *B. fuckeliana*'nın oluşturduğu sklerotlar toprakta 7-8 yıl canlı kalabilmekte, apotheciumdan askospor veya miselyumdan konidiospor üreterek primer infeksiyonu gerçekleştirmektedir [35].



Şekil 2.16 Havadaki tüm mantarların (siyah çubuklar) yüzdesinde dış mekan *Botryotinia*'nın yaygınlığı [36].

2.9.1. *B. fuckeliana* Alerji İlişkisi

Mantarların neden olduğu alerji ve astım uzun yıllardır bilinmektedir. Alerji ve astımla bağlantılı olarak, araştırılan tipik mantar türleri *Cladosporium*, *Alter-naria*, *Aspergillus* ve *Penicillium*'dur, çünkü muhtemelen bunlar ortam havasında çok sıklıkla en yaygın türlerdir. Bununla birlikte, tür çeşitliliği, hem en yaygın 2-4 cins içinde hem de daha az yaygın olan cinslerde oldukça yüksek olabilir. Lugauskas ve ark. , örneğin, iç mekanlarda mantar bileşimini araştırırken 359 tür içeren 100 cins buldu. Ayrıca, birçok çalışma göstermektedir ki en az 80 cins mantar türü alerjenik potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Ortam havasında bulunan bu mantarlardan biri de *B. fuckeliana*'dır [37].

BÖLÜM III

MATERYAL METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Materyaller

- Etanol (%96 Merck, Almanya)
- Fenol (Sigma, ABD)
- Fosfat Tamponlu Salin (Oxoid, İngiltere)
- Kloroform (Merck, Almanya)
- Metanol (Sigma, ABD)
- Aseton (Merck, Almanya)
- Trikloroasetik Asit (ISO LAB, Almanya)
- β - mercaptoetanol (Merck, Almanya)
- Polivinilpolipirrolidon (Sigma, ABD)
- SDS (Merck, Almanya)

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD)
- Vorteks (Velp Scientifica, İtalya)
- Buzdolabı (Vestel, Türkiye)
- Hassas Terazı (Denver Instrument, Precissa, İsviçre)
- Otoklav (HMC Hiroyama, Japonya)
- Etüv (Selekta, İspanya)
- Saf Su Cihazı (Merck, Almanya)
- Pasteur Pipet Tabancası (Capp Aid, Danimarka)
- Otomatik Pipet (Eppendorf, Research Plus, Almanya)
- Liyofilizatör (Labconco, ABD)

- Nikon TS100 mikroskop (Nikon Japonya)

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

- Bikinkoninik Asit (BCA, Serva, Almanya)
- Bovine Serum Albumin (BSA, Serva, Almanya)
- Fosfat Tamponlu Salin (Oxoid İngiltere)

3.1.4. Kullanılan Besiyerleri

3.1.4.1. Potato Dextrose Agar (PDA)

B. fuckeliana kültürlerini oluşturmak ve sonraki çalışmalar için stok hazırlamak amacıyla kullanılmıştır.

Ticari olarak elde edilen PDA 15 g tartılarak 0.5 L distile su içerisinde çözülerek 121°C'de 15 dk otoklavda steril edilmiştir.

3.1.4.2. Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

PDA besiyerine ek olarak SDA besiyerinde de kültürü oluşturularak farklı besiyerlerinde *B. fuckeliana* kültürleri incelenmiş ve en verimlileri kullanılmıştır.

3.1.4.3. Kanlı Agar

Hazırlanan mantar ekstratlarının sterilite kontrolleri kanlı agar üzerine yapılan ekimler ile belirlenmiştir.

3.2. Metod

3.2.1. *Botryotinia Fuckeliana* Ekstraktlarının Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılan mantar örnekleri ticari olarak satın alınmış ve laboratuvarımızda çoğaltılmıştır. PDA besiyerinde yetiştirilen *B. fuckeliana* +25°C'de 7-14 gün inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.1).



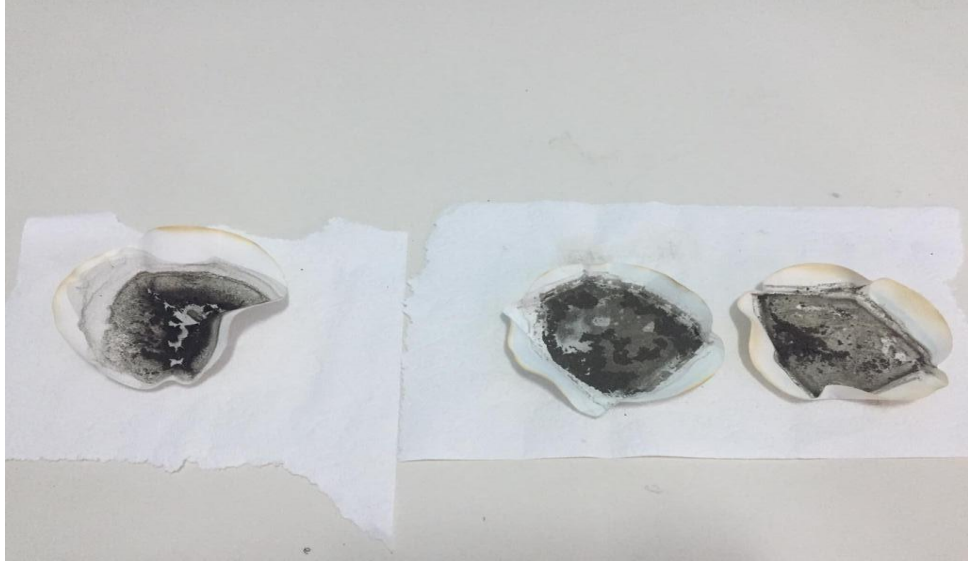
Şekil 3.1 *B. fuckeliana*'nın PDA besiyerindeki hif yapısı

3.2.2. *B. fuckeliana* Ekstrelerinin Hazırlanması

Miseller döner bir çalkalayıcıda 24 saat %70'lik etanol içinde çalkalanmasının ardından kurutma kağıdı üzerine alınarak 24 saat boyunca iyice kurutulmuştur. Kurutulmuş mantar miselleri sıvı azot içerisinde havaneli yardımı ile toz haline getirilmiştir. Toz haline getirilen mantar örnekleri kullanılıncaya kadar +4°C' de saklanmıştır.

3.2.3. *B. fuckeliana* Etanol Ekstresi

Miseller döner bir çalkalayıcıda 24 saat etanol içinde çalkalanmasının ardından kurutma kağıdı üzerine alınarak 24 saat boyunca kurutmaya bırakılmıştır (Şekil 3.2).

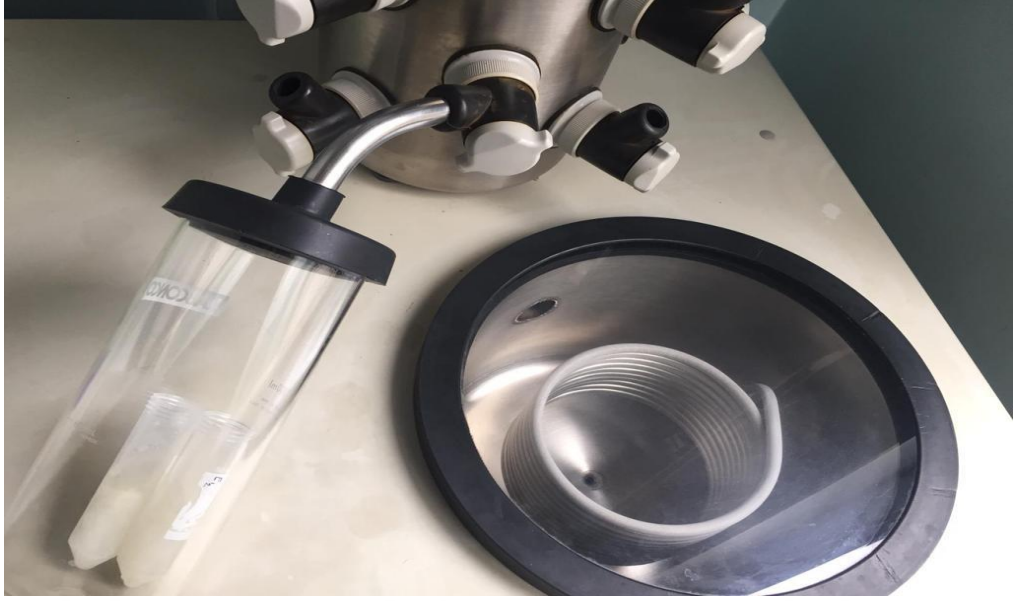


Şekil 3.2 Kurutmaya bırakılan miseller.

Kurutulmuş mantar miselleri sıvı azot içerisinde havaneli yardımı ile toz haline getirilmiştir. Tozlar koruyucu olarak %0,4 (a/h) fenol kristalleri içeren 1:50 (a/h) fosfat tamponlu salin (PBS) pH:8 içerisinde +4 °C'de 72 saat çalkalanmıştır. 15.000 rpm'de 30 dk satrifüjleme işleminin ardından süpernatant +4°C'de % 25 PBS'e karşı 6 saat boyunca diyaliz edilmiştir. Bir örnek diyalize tabi tutulmadan liyofilize edilmiştir ve diğer örnek gece boyunca çift damıtılmış suya karşı tekrar diyalize tabi tutulan ekstraler liyofilize edilmiştir (Şekil 3.3).

3.2.4. B. fuckeliana Kloroform-Metanol Ekstresi

Miseller döner bir çalkalayıcıda 24 saat kloroform ve metanol (2:1) (h/h) içinde çalkalanmasının ardından kurutma kağıdı üzerine alınarak 24 saat boyunca iyice kurutulmuştur. Kurutulmuş mantar miselleri sıvı azot içerisinde havaneli yardımı ile toz haline getirilmiştir. Tozlar koruyucu olarak %0,4 (a/h) fenol kristalleri içeren 1:50 (a/h) fosfat tamponlu salin (PBS) pH:8 içerisinde +4°C'de 72 saat çalkalanmıştır. 15.000 rpm'de 30 dk satrifüjleme işleminin ardından süpernatant +4°C'de % 25 PBS'e karşı 6 saat boyunca diyaliz edilmiştir. Gece boyunca çift damıtılmış suya karşı tekrar diyalize tabi tutulan ekstraler liyofilize edilmiştir.



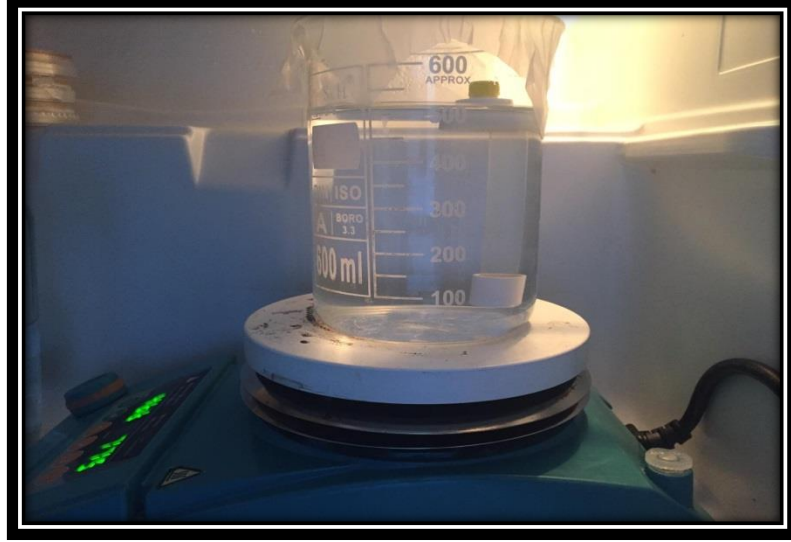
Şekil 3.3 *B. fuckeliana* ekstralarının liyofilizasyonu

3.2.5. *B. fuckeliana* Etken Maddelerinin Ekstre Edilmesi

Diyalizin ardından liyofilize edilen numunelerin etken maddelerinin ekstre edilmesinde Ziwei Li ve arkadaşlarının (2018) tarif ettiği ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır [38].

- %100'lük aseton
- %10'luk TCA
- %2'lik β mercaptoetanol
- %1'lik PVPP

içerisinde 30 dakika oda ısısında muamele edilen miseller -20°C 'de 1 gece bekletilmiştir. 13000 rpm'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 20 dakika santrifüjün ardından süpernatant atılmıştır. Pelet üzerine %80'lik aseton eklenerek her defasında aseton yenilenerek $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 13000 rpm'de 20 dakika 7 kez santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak kalan asetonun kuruması beklenmiştir. Elde edilen ekstralar 1:1 oranında PBS ve %5 SDS içerisinde özümленerek protein konsantrasyonları belirlenmiştir.



Şekil 3.4 Diyaliz Aşaması

3.2.6. Toplam Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

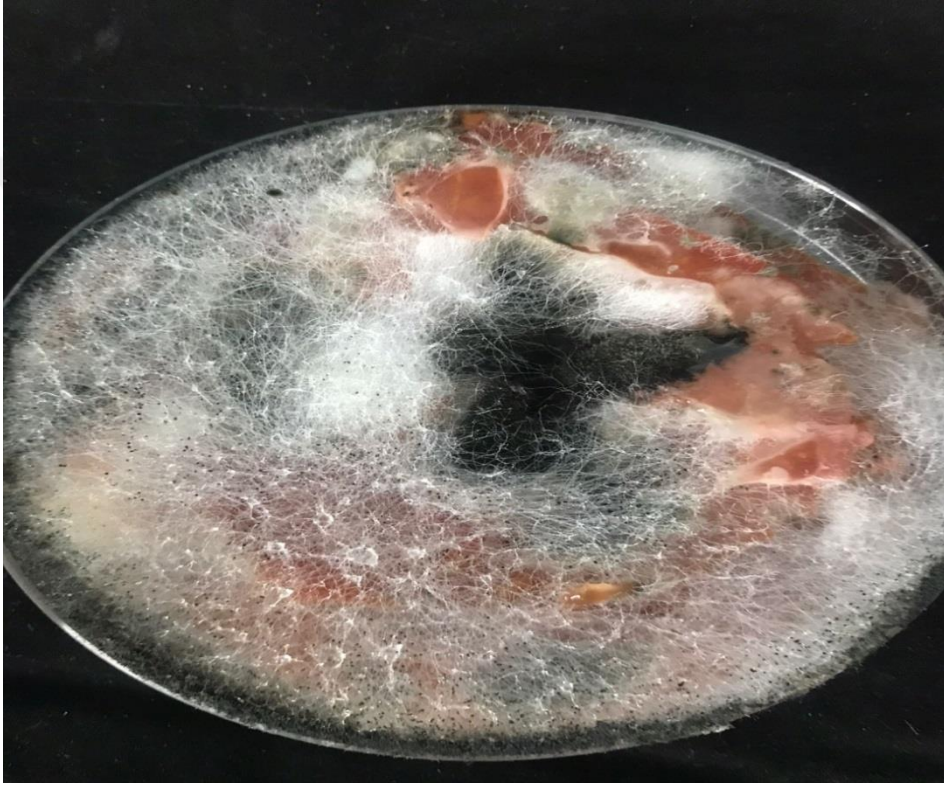
Mantar ekstraktlarının toplam protein konsantrasyonu, bisinkonik asit (BCA) yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Protein konsantrasyonunu belirlemek için ticari olarak satın alınan BCA Macro Assay Kit (Serva Electrophoresis GmbH) kullanılmıştır. Üretici tarafından önerilen protokol izlenerek BCA analizi yapıldı [40].

3.2.6.1. BCA Yöntemi

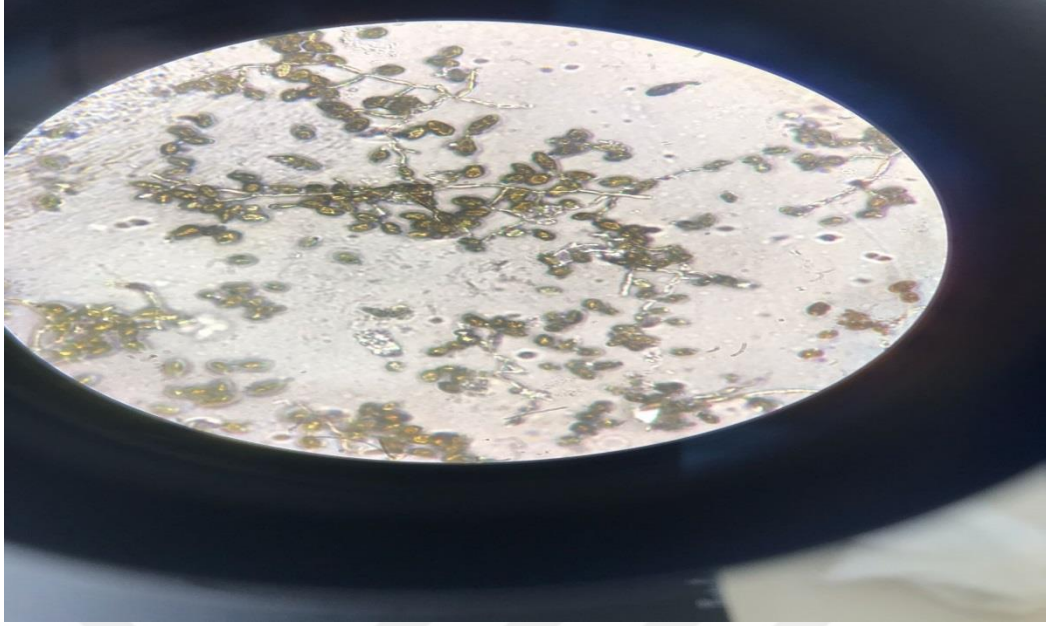
Mantar ekstraktlarının total protein konsantrasyonlarının belirlenmesinde BCA yöntemi kullanılmıştır. Total protein konsantrasyonu BCA Macro Assay Kit (Serva Electrophoresis GmbH) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak çalışılmıştır.

BÖLÜM IV BULGULAR

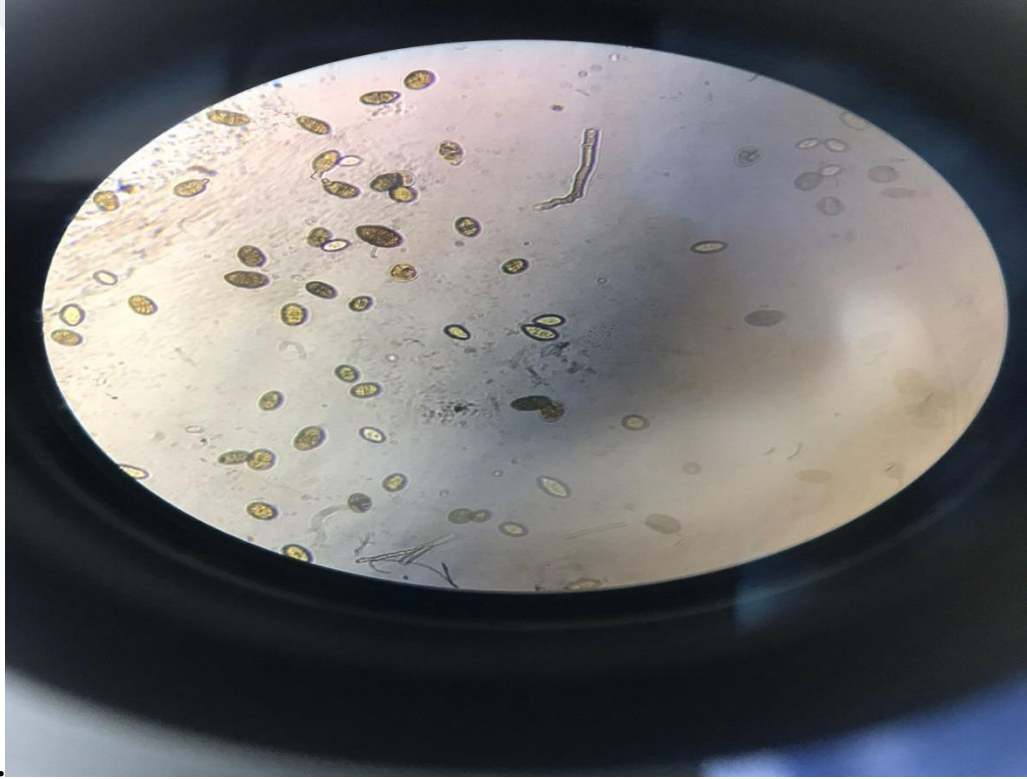
4.1 Bulgular



Şekil 4.1 Domates üzerinde gelişen *B. fuckeliana*.



a.



b.

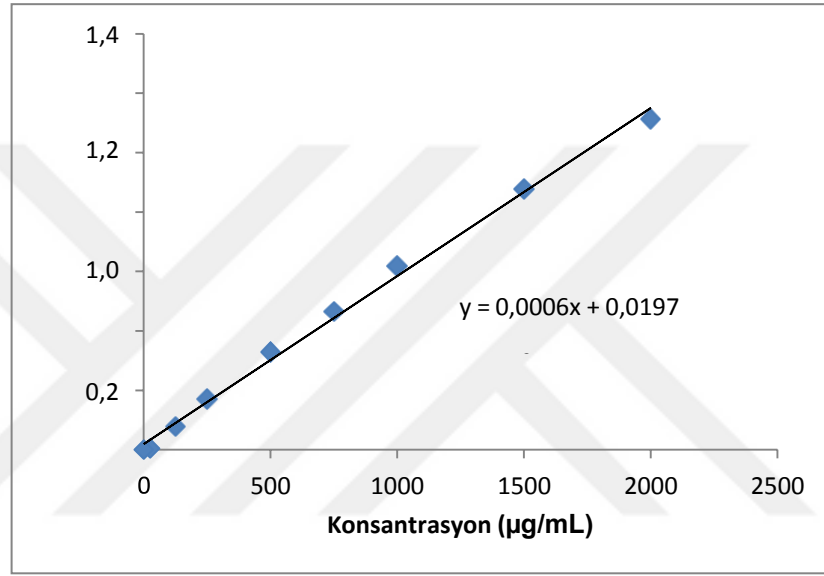
Şekil 4.2 *B. fuckeliana*'nın mikroskop altındaki görüntüleri. a) Direkt olarak toplanmış b) Serum fizyolojik ile seyreltilmiş.

4.2 Protein Konsantrasyonları

Üç farklı ekstraksiyon yöntemi ile hazırlanan mantar ekstratlarının protein konsantrasyonlarını belirlenmesinde BCA protein yöntemi kullanılmıştır. BCA kiti protokolüne göre çalışılan *B. Fuckeliana* örneklerine ait protein miktarları aşağıda

gösterilmiştir (Tablo 3.1). Elde edilen daha önce yapılan çalışmalarda belirtilen protein miktarı referans alınarak değerlendirilmiştir [40].

Miktarı bilinmeyen numunenin toplam protein miktarı BCA Protein Macro Assay Kit (Serva Electrophoresis GmbH) ile yapılmıştır. Standart sığır albüminin 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/mL derişimlerinde standart grafik oluşturulmuştur. Derişimi bilinmeyen örneğin absorbansı, elde edilen lineer grafik ve doğru denklemi kullanılarak protein miktarı belirlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen protein konsantrasyonu 0.660 mg/mL olduğu belirlenmiştir.

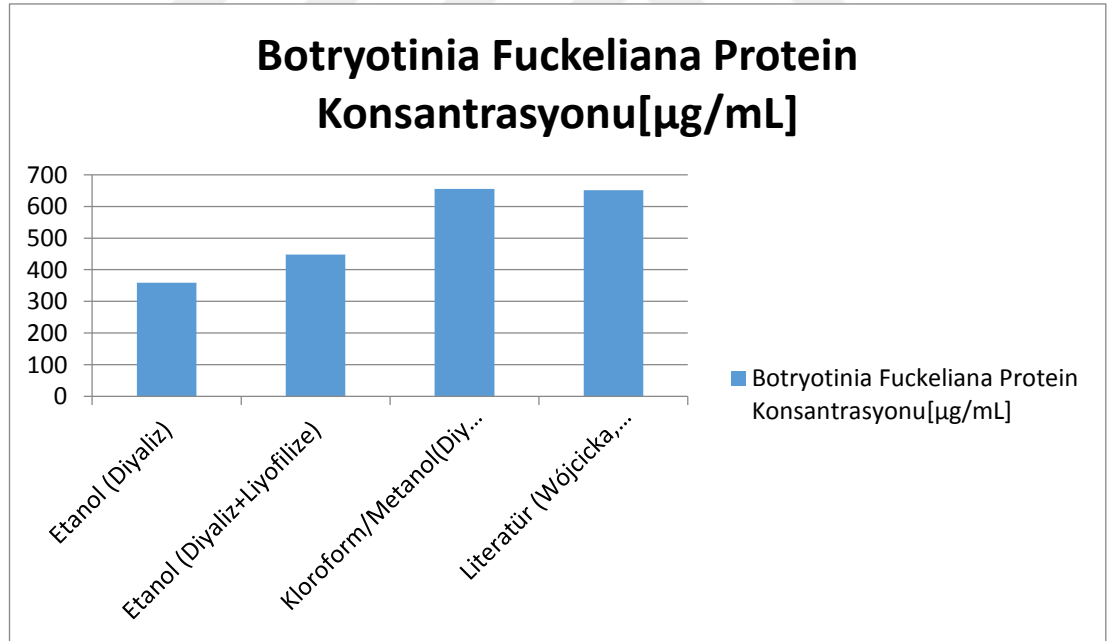


Şekil 4.3 Protein standart grafiği. Sığır Serum Albumin (—Bovine SerumAlbumin, BSA) kullanılarak oluşturulmuştur ($R^2 = 0,9959$).

Çalışmamızda alerjenik mantarlardan *B. fuckeliana*'nın proteinleri 3 farklı ekstraksiyon protokolü ile ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edilen protein miktarı BCA yöntemi ile ölçülmüştür. Çalışmada etanol kullanılarak hazırlanan mantar ekstraktları ilk olarak diyalize tabi tutularak ekstrakte edilen mantar örneklerinin protein konsantrasyonu 447,6 µg/mL olarak belirlenmiştir. Diyalize tabi tutulmadan ekstrakte edilen mantar örneklerinin protein konsantrasyonu ise 359,3 µg/mL olarak belirlenmiştir. Kloroform-metanol kullanılan protokolde protein miktarı 0.660 µg/mL olarak belirlenmiştir. Kloroform-metanol ekstraksiyonunda önceki çalışmalarda belirtilen protein miktarı ile benzer sonuçlar elde edilmiştir [40].

Tablo 4.1 BCA testi ile ölçülen *B. fuckeliana* özütlerinin ve referans alınan çalışmanın toplam protein konsantrasyonu değerleri.

Alerjen Adı <i>Botryotinia fuckeliana</i>	Absorbanslar	Ortalama Absorbans	Protein Konstantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)
Etanol (Liyofilize)	0,421 0,425 0,437	0,427	359,3
Etanol (Diyaliz+Liyofilize)	0,503 0,542 0,553	0,532	447,6
Kloroform/Metanol (Diyaliz+Liyofilize)	0,773 0,779 0,785	0,779	655,5
Literatür			651



Şekil 4.4 *B. fuckeliana* ekstraktlarının BCA testi ile ölçülen toplam protein konsantrasyon grafiği.

BÖLÜM V

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Mantarlar alemi, canlılar arasında yaklaşık yüz binden fazla tür çeşitliliği ile önemli bir yer kaplamaktadır. Habitatları oldukça geniş olup toprak, su, hava, canlıların üzerinde yaşayabilen bir canlı grubudur. Çoğu ekosistemde, özellikle madde döngüsünde önemli role sahip iken bir kısmı bitki, hayvan ve insanlarda patojen özelliğe sahiptirler. Bununla beraber sporla çoğalmaları ve bunların atmosfere karışabilme özelliği ile alerjen potansiyelleri yüksek canlı gruplarıdır. Bu nedenle alerjen etkenler arasında olup olmadığı testlerle saptanması önem taşımaktadır.

Alerjik hastalıkların gün geçtikçe artması bölgesel beslenme farklılığına göre değişebilmektedir. Beslenmedeki değişimler özellikle fast food gibi veya gıda koruyucu içeren besinlerin tüketilmesiyle olmaktadır. Bunun yanı sıra teknolojinin gelişmesi ile de atmosfer kompozisyonunun değişimi ve dolayısıyla insanların daha alerjen bünyeye sahip olmalarına sebep olmaktadır.

Alerjen yapıdaki maddelerin vücuda girişleri farklı yollar ile olmaktadır. Doğrudan vücut yüzeyine temas ederek deri yolu ile olabileceği gibi solunan hava ile solunum sistemi üzerinde de etkili olabilmektedirler. Ayrıca gıdaların tüketilmesi ile sindirim kanalı ile de alerjenlerin vücuda girişleri mümkündür [42].

Küf mantarları sporlarının geniş yayılım alanına sahip olması sebebiyle ev içi ve açık alanlarda sıklıkla rastlanılmaktadır. Küf mantarı sporları alerjik rinit ve astım semptomlarının gelişmesinde önemli rollere sahiptirler. Bu sebeple dış ortamda bulunan aeroallerjenlerin daha sık vakit geçirilen bina içlerine taşınması ve bu alanlarda küf kolonizasyonlarını önlemek, sağlıklı yaşam alanları oluşturulması için son derece önemlidir [41].

Gerek dünyada gerekse ülkemizde alerji tanısı için çeşitli testler kullanılmaktadır. Bunların büyük çoğunluğu alerjen temelli yöntemlerdir. Dolayısıyla alerjen izolasyonu ve tespiti sağlık açısından oldukça büyük bir öneme sahiptir.

Çalışmamızda alerjen potansiyele sahip olan *B. fuckeliana*'ya ait alerjen potansiyeli olabilecek total proteinleri elde edilerek saflaştırılması amaçlanmıştır.

B. fuckeliana'nın şuana kadar herhangi bir alerjeni karakterize edilmemiştir. Ancak *B. fuckeliana* aspartik proteaz aktivitesine sahiptir ve bu diğer yaygın alerji kaynağı olan mantarlarda bir alerjik sebep olarak görülmektedir. Bununla birlikte *B. fuckeliana*'nın hücre duvarındaki kitin de alerjen kaynağı olarak bilinmektedir. Son yıllarda artan çalışmalarla birlikte *B. fuckeliana* potansiyel alerjen olarak görülmektedir ve alerjen panellerinde yer alması gerektiği düşünülmektedir.

Ülkemizde neredeyse tüm alerji tanı materyalleri yurt dışından temin edildiği bilinmektedir. Alerjen proteinlerin izolasyon ve saflaştırma tekniklerinin optimize edilmesi, potansiyel alerji test materyallerinin ülkemizde üretilebilmesi açısından oldukça önemlidir. Çalışmamız bu açıdan alerji test materyali eldesi için temel bir araştırma olup sonrasında kullanılabilir önemli verileri sunacak niteliktedir.

Standart *B. fuckeliana* laboratuvarında uygun koşullarda kültüre edilmiş ve total proteinleri saflaştırılmış olup literature ile kıyaslanmıştır. *B. fuckeliana* ile ilişkili şuana kadar alerjen protein eldesine yönelik çok az makaleye rastlanmış olup bu makalelerin de yurt dışı menşeli olduğu gözlemlenmiştir. Ülkemizde ise ilk kez *B. fuckeliana* protein eldesi için yöntem optimize edilmiştir.

Son yıllarda küflerin neden olduğu alerji vakaları artmaktadır. Bu nedenle doğada yaygın olarak bulunan mantarların alerjen proteinlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar önem kazanmıştır.

Bu tez çalışmasında *B. fuckeliana*'nın alerjenik proteinleri üç farklı protokol ile ekstrakte edilmiştir. Ekstrakte edilen protein miktarı BCA yöntemi ile ölçülmüştür. Çalışma sırasında kullanılan *B. fuckeliana* ekstrelerinin protein konsantrasyonu spektrofotometre cihazında 562 nm'de BCA yöntemi ile ölçümler alınmıştır.

Kloroform/Metanol protokolüne göre 3 tekrarlı aldığımız ölçümlerde protein konsantrasyonumuz 655.5 µg/mL ölçülmüştür. Etanol (diyaliz ile) protokolüne göre protein konsantrasyonumuz 447,6 µg/mL ölçülmüştür. Etanol (diyaliz olmadan) protokolüne göre protein konsantrasyonumuz 359,3 µg/mL ölçülmüştür. Bu üç değer literatür ile karşılaştırılmıştır ve en yakın değer kloroform/metanol protokolünde gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda *B. fuckeliana*'tan elde ettiğimiz ekstraktlar, alerjik hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılan alerji testleri için potansiyel veriler sunmaktadır. Ülkemizde alerjik hastalıkların tanısında kullanılan kitler ithal edilmekte ve ülke ekonomisini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu çalışmadan elde edilen veriler sonraki çalışmalarla alerji hastalarının tanı ve tedavisinde kullanılan ithal kitlere alternatif yerli kitlerin üretilmesine ve immünoterapide kullanılan spesifik alerji aşılarının üretilmesinin temelini oluşturmaktadır.

Bu çalışmadan elde edilen veriler alerji hastalarının tanı ve tedavisinde kullanılan ithal kitlere alternatif yerli kitlerin üretilmesine temel oluşturmaktadır. Alerjik hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılan ekstraktların alerjene spesifik olmayan proteinlere de sahip olduğu bilinmektedir. Elde edilen alerjen proteinlerin standardizasyonu sonrası klinikte kullanıma sunmayı hedeflemekteyiz. SDS-PAGE analizi ile moleküler boyutlandırması yapılarak, hangi molekül büyüklüğündeki alt ünitelerin allerjik reaksiyona neden olduğu belirlenerek; her bir fraksiyonun deri testinde denenmesinin ardından, ticari olarak total hücre ekstraktları şeklinde satılan deri prick testleri yerine ekstraktaki hedef proteini saflaştırarak, klinikte kullanılacak formda geliştirmeyi öneriyoruz.

KAYNAKLAR

- [1] Tao, A., Raz, E. (Eds.). (2015). Allergy bioinformatics (8nd ed., pp.1-14). Springer.
- [2] Pawankar R, Canonica GW, ST Holgate ST, Lockey RF, Blaiss M. (2013). The WAO White Book on Allergy.
- [3] Çeter, T. Y., Pinar, N. M. (2008). The concentration of atmospheric pollen and spores of Kastamonu province (Central Region) and effects of meteorological factors on this concentration (January 2006- December 2007) (Doctoral dissertation, Ankara University Graduate School of Natural and Applied Sciences Department of Biology
- [4] Sümer, S. (2006). *Genel Mikoloji*, Nobel Yayıncılık, 1. Baskı, Ankara, 374s.
- [5] Güneser, S., Atici, A., Köksal, F., Yaman, A. (1994). Mold allergy in Adana, Turkey. *Allergologia et immunopathologia*, **22(2)**, 52–54.
- [6] Lugauskas, A., Krkistaponis, A., (2004). *Litvanya'daki hastaneler ve bazı tbbi kurumlarda izole edilen filamentli mantarlar*. 13, 101–108.
- [7] International archives of allergy and immunology, **145(1)**, 58–86. <https://doi.org/10.1159/000107578>
- [8] Önerci, M. (2002). Rinitlerin tanımı ve sınıflaması, Alerjik rinosinüzitler. Rekmay ltd. Ankara. **4**, 13-18.
- [9] Oğuz, F. S., Karadeniz, S. Integration of Immunogenetic and Bioinformatics Applications Into Medical Informatics. **9**, 188-200.
- [10] Miman, M. C., Özerol, İ. H., Özturan, O., Erdem, T. (2003). Atopi veya alerjili olgularda alerjen-spesifik IgE düzeyleri. **10**, 188-193.
- [11] Alerjenler | Türkiye Ulusal Alerji ve Klinik İmmünoloji Derneği (aid.org.tr) 25.09.2021

- [12] Larché, M., Akdis, C. A., Valenta, R. (2006). Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy, *Nature Reviews Immunology*. **6(10)**, 761-771.
- [13] Hamid, Q. A., Minshall, E. M. (2000). Molecular pathology of allergic disease: I: lower airway disease, *Journal of allergy and clinical immunology*. **105(1)**, 20-36.
- [14] Akoğlu, H.A., (2017). Çocuk allerji-immunoloji kliniğine solunum yolu alerji semptom ve kliniği ile başvuran hastaların deri prick testi sonuçlarının değerlendirilmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi. Sağlık Bilimleri Üniversitesi. Zeynep Kamil Kadın Ve Çocuk Hastalıkları Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Kliniği.
- [15] Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., and Jackson, R. B. (2014). *Campbell biology*. 1309.
- [16] Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem Toxicol*. 2013;60:218-237.
- [17] Esch, R. E., Codina, R. (2017). Fungal raw materials used to produce allergen extracts. *Annals of allergy, asthma & immunology : Official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, **118(4)**, 399-405.
- [18] Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008). "Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi", 10th Edn CAB International, Wallingford, UK.
- [19] Dubois, S. E., and Scheetz, R. W. (1986). Localization of actin in spores and swarm cells of myxomycetes, *Transactions of the American Microscopical Society*, **105(4)**, 387-395.
- [20] Gündüz, E., Demirsoy, A., ve Türkan, İ. (2008). *Biyoloji*, 2. Baskı, Palme, Ankara.
- [21] Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., and Jackson, R. B. (2014). *Campbell biology*. 1309 p.
- [22] İnci, R. (1999). Mantarların yapıları, üreme özellikleri ve sınıflandırılması, *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Güneş Kitabevi, Ankara. 1015-1021 p.
- [23] Bilgehan, H. (2005). *Temel mikrobiyoloji ve bağışıklık bilimi:(Uygulama konuları ile)*. Fakülteler Kitabevi Barış yayınları, İzmir.

- [24] Lafayettefirefighters (2017). Plazmogami ve Karyogami Arasındaki Fark. Intl.: www.lafayettefirefighters.com.tr, 10.10.2021.
- [25] Craigie, J. H. (1940). Studies in cereal diseases. XII. Stem rust of cereals. Can., Dep. Agric, Farmers' Bull. **84**, 1-39 .
- [26] Cotter, R. U. (1932). Factors affecting the development of the aecial stage of Puccinia graminis. U.S., Dep. Agric, Tech. Bull. **314**, 1-38 .
- [27] Simon-Nobbe, B., Denk, U., Pöll, V., Rid, R., Breitenbach, M. (2008). The spectrum of fungal allergy. *International archives of allergy and immunology*, **145(1)**, 58–86.
- [28] Mazur, L. J., Kim, J. (2006). Committee on Environmental Health, American Academy of Pediatrics. Spectrum of noninfectious health effects from molds. *Pediatrics*, **118(6)**, 1909–1926.
- [29] Nihan, Ç. (2019). Mersin ili atmosferik polen ve sporlarının araştırılması. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- [30] Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA (2008). “Ainsworth & Bisby’s Dictionary of the Fungi”, 10th Edn CAB International, Wallingford, UK.
- [31] Domsch KH, Gams W, Anderson T (1993). Compendium of soil fungi, New York, Academic Press.
- [32] Yunis H, Shteinberg D, Elad Y, Mahrer Y. (1994). Qualitative approach for modeling outbreaks of grey mould epidemics in non-heated cucumber greenhouses. *Crop Protection*, **13**, 99-104.
- [33] Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N. (2004). Botrytis spp. and systems-an introduction. (Botrytis, biology, pathology and control, Ed. Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N). Kluwer Academic Publisher, Netherland, 1-8p.
- [34] Hugerford CW, Pitts R. (1953). The Sclerotinia disease of beans in Idaho. *Phytopathology*, **43**, 519-521.
- [35] Jürgensen CW, Madsen AM: Exposure to the airborne mould Botrytis and its health effects. *Ann Agric Environmental Medicine*, **16**, 183–196.

- [36] Burge HA. (1985). Fungus allergens. *Clin Rev Allergy*, **3**, 319-329.
- [37] Ziwei, L., Rui, L., Yuexin, Z., Xiufeng, Y., Qiuying, P. (2018). Effective protein extraction from mycelium and fruiting body of *Auricularia auricula* for proteomics studies, *International Journal of Food Properties*, **21(1)**, 2156-2166.
- [38] Walker J M. (2002). *The Protein Protocols Handbook* (pp. 11-14). Second edition. Humana Press.
- [39] Kustrzeba-Wójcicka I. (2009). Enolase-mold panallergen: a comparative characterization of enolase as an allergen of chosen species of fungi. DSc thesis, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland [Polish]
- [40] Cole GT, Samson RA. (1984). The conidia, In: Al- Doory Y, Domson FJ (eds), *Mould Allergy*, p.66-105, Lea and Febiger, Philadelphia.
- [41] Çöl, A. (2006). Değişik ekolojik koşullarda saksı toprağında bulunan alerjik küf florasının saptanması. YL tezi. Marmara Üniv. Fen Bil. Enst. İstanbul.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı Mustafa KÖROĞLU

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Kurum	Yıl
Yüksek Lisans	Gaziantep Üniversitesi	2018-2022
Yüksek Lisans(erasmus)	University of Science Technology	2020-2021
Lisans	Bartın Üniversitesi	2013-2018
Lise	Abdulkadir Konukoğlu Lisesi	2009-2013

YAYINLAR

Koroglu, K., Kilic, I., Karagoz, I., Ozaslan, M. (2021). Extraction and Purification of the Potential Allergen Proteins from Botryotinia Fuckeliana. Dergipark.

Kok, S., Ozaslan, M., Kilic, I., Koroglu, M., Kurt, B., Tonus, S. (2019). Urmu Dut'un Biyolojik Aktivite Potansiyelinin Belirlenmesi ve Stenotrophomonas Maltophilia Üzerine Etkileri ve Araştırılması. Sosyal Beşeri ve Eğitim Bilimleri Konferansı.