

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEMMUZ 2018

Yüksek Lisans - Biyoloji

ÖZLEM ÖNMAN

**GAZİANTEP’TEKİ TÜYLÜ HUŞ (*Betula alba*),
ANADOLU PALAMUT MEŞESİ (*Quercus
ithaburensis*) ve IHLAMUR (*Tilia cordata*)
POLENLERİNİN MORFOLOJİSİ ve
POTANSİYEL ALERJENİK
PROTEİNLERİNİN TESPİTİ**

BİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZLEM ÖNMAN
TEMMUZ 2018

**Gaziantep'teki Tüylü Huş (*Betula alba*), Anadolu Palamut Meşesi
(*Quercus ithaburensis*) ve Ihlamur (*Tilia cordata*) Polenlerinin
Morfolojisi ve Potansiyel Alerjik Proteinlerinin Tespiti**

Gaziantep Üniversitesi

Biyoloji

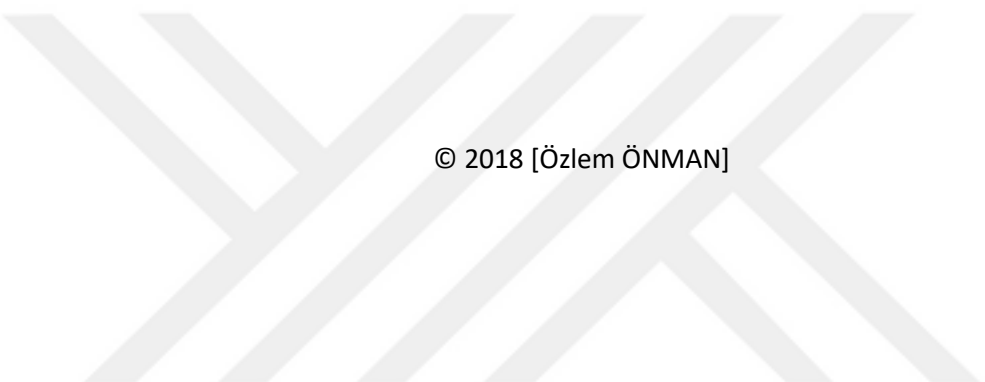
Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ

Özlem ÖNMAN

Temmuz 2018



© 2018 [Özlem ÖNMAN]

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tezin Adı: Gaziantep'teki Tüylü Huş (*Betula alba*), Anadolu Palamut Meşesi
(*Quercus ithaburensis*) ve Ihlamur (*Tilia cordata*) Polenlerinin
Morfolojisi ve Potansiyel Alerjenik Proteinlerinin Tespiti

Öğrencinin, Adı Soyadı: Özlem ÖNMAN

Tez Savunma Tarihi:

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. A. Necmeddin YAZICI
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvanı, ADI ve SOYADI):

İmzası

Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR

.....

Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ

.....

Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ

.....

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

Özlem ÖNMAN

ABSTRACT

Determination of Potential Allergenic Proteins and Morphology of Birch (*Betula alba*), Anatolian Oak (*Quercus ithaburensis*) and Linden (*Tilia cordata*) Pollens in Gaziantep

ÖNMAN, Özlem

M.Sc. in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Işık Didem KARAGÖZ

JULY 2018

104 pages

Allergic disease is a major public health concern in the modern societies. Wind-mediated spreading pollens are important aeroallergens. When they are released to atmosphere in sufficient amount, they can cause the development of diseases such as asthma, rhinitis, rhinoconjunctivitis etc. in allergically hypersensitive individuals. The spreading of pollens are affected by their amount in the air, their structures, geographic areas and the climate. Therefore, the amount of pollens that hypersensitive individuals who live in different regions are exposed to may differ and different allergic reactions may occur in effected individuals. The high amount of pollen production enhance the pollen sensitivity. Thus the research on region-specific allergenic effects of species becomes important. Pollens of birch (*Betula alba*), Anatolian oak (*Quercus ithaburensis*) and linden (*Tilia cordata*) are the important allergen sources in Gaziantep region.

Pollen allergens are water soluble, stable proteins or glycoproteins of molecular weight between 5-80 kDa. A single pollen type usually contains tens of different allergens.

Pollens from birch (*B.alba*), Anatolian oak (*Q.ithaburensis*) and linden (*T.cordata*) were collected in pollination period and their extracts were prepared. For determination of pollen morphologies were prepared slides Wodehouse's method used taken under light microscopy photos. Total consantrations of potential allergen proteins were determined from prepared pollen extracts through the use of BCA method.

In this study we aimed to prepare extracts of pollens from birch (*B.alba*), Anatolian oak (*Q.ithaburensis*) and linden (*T.cordata*) widely deployed in wooded areas of Gaziantep University for studies of allergy and use for diagnosing allergic diseases.

Key Words: Tree pollen allergy, *Tilia cordata*, *Quercus ithaburensis*, *Betula alba*, pollen extracts

ÖZET

Gaziantep'teki Tüylü Huş (*Betula alba*), Anadolu Palamut Meşesi (*Quercus ithaburensis*) ve Ihlamur (*Tilia cordata*) Polenlerinin Morfolojisi ve Potansiyel Alerjik Proteinlerinin Tespiti

ÖNMAN, Özlem

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ

Tem 2018

104 sayfa

Allerjik hastalıklar modern toplumların çoğunda büyük bir sağlık problemidir. Rüzgar aracılığıyla yayılış gösteren polenler önemli aeroalerjenlerdendir. Atmosferde yeterli miktarlarda bulunduklarında duyarlı kişilerde astım bronşiyale, alerjik rinit, rinokonjunktivit gibi hastalıkların gelişimine yol açabilirler. Polenlerin yayılışı, havadaki miktarları ve yapıları bulundukları coğrafi bölge ve iklimden etkilenmektedir. Bu nedenle farklı bölgelerde yaşayan duyarlı kişilerin maruz kaldığı polen miktarı değişebilmekte ve etkilenen bireylerde farklı alerjik reaksiyonlar gelişebilmektedir. Üretilen polen miktarının fazla olması polen duyarlılığını artırmaktadır. Dolayısıyla türlerin bölgelere özgü alerjenik etkilerinin araştırılması önemli hale gelmektedir. Gaziantep bölgesindeki Tüylü Huş (*Betula alba*), Anadolu Palamut Meşesi (*Quercus ithaburensis*), Ihlamur (*Tilia cordata*) polenleri de önemli alerjen kaynaklarındandır.

Polen alerjenleri moleküler ağırlıkları 5-80 kDa arasında değişen suda çözülebilir protein ya da glukoprotein yapısındaki maddelerdir. Tek bir polen tanesi onlarca farklı tipte alerjen içerebilmektedir.

Tüylü Huş (*B.alba*), Anadolu Palamut Meşesi (*Q.ithaburensis*), Ihlamur (*T.cordata*) ağaçlarının tozlaşma dönemlerinde polenleri toplanarak polen ekstraktları hazırlandı. Polenlerin morfolojisinin tespiti için Wodehouse yöntemi ile preparatları hazırlanarak ışık mikroskopunda fotoğraflandı. Hazırlanan polen ekstraktlarından BCA yöntemi ile potansiyel alerjen proteinlerin total konsantrasyonları tespit edildi.

Bu çalışmada Gaziantep Üniversitesi kampüsü içindeki ağaçlandırılmış alanlarda yaygın olarak bulunan Tüylü Huş (*B.alba*), Anadolu Palamut Meşesi (*Q.ithaburensis*) ve Ihlamur (*T.cordata*) ağaçlarından toplanan polen örneklerinden alerji çalışmalarında ve alerjik hastalıkların tanısında kullanılmak üzere polen ekstraktları hazırlanması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ağaç polen alerjisi, *Tilia cordata*, *Quercus ithaburensis*, *Betula alba*, polen ekstraktları.

**Biricik eşime, varlığıyla bize huzur veren evladım Eylül Elif'e ve çok kıymetli
aileme...**

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince tüm bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan, aynı zamanda kişilik olarak ta bana çok şey katan Gaziantep Üniversitesi öğretim üyelerinden danışman hocam, sayın Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ'e sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Engin Bilgi ve tecrübeleriyle lisans eğitimimden bu yana bilimsel veya herhangi bir konuda bizlere en doğru yolu göstermekten hiç kaçınmayan değerli hocam sayın Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ'a;

Bu çalışma kapsamında bitki teşhisi hususunda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Dr. Hüseyin TEKİN'e;

Örneklerin toplanmasında, polen proteinlerinin ekstresinin hazırlanmasında ve tüm ölçümlerin yapılmasında desteklerini benden esirgemeyen değerli arkadaşlarım Yüksek Biyolog Hiba HÜSSEİN, Yüksek Biyolog Başak SİMİTÇİOĞLU, Yüksek Biyolog Gülsüm DOĞANÇAY, Biyolog Gülay KAŞOĞLU, Biyolog Dilara TÜTER, Biyolog Canan AFACAN, Biyolog Asiye GÖZÜBÜYÜK ' e;

Çalışma süresince çeviri konusunda, literatür tarama hususunda yardımını esirgemeyen beni hep destekleyen ve güvenen çok sevdiğim biricik eşim Uzm. Dr. Turgut ÖNMAN' a, varlığıyla bize huzur veren evladım Eylül Elif'e her konuda beni destekleyen, yüreklendiren, yanımda olan üzerimde emeği bulunan canım annem Fatma YÜCEBAĞ' a, babam Bekir YÜCEBAĞ' a, kız kardeşlerim Hatice YÜCEBAĞ ve Emel YÜCEBAĞ' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ABSTRACT	v
ÖZET	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLolar LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
SEMBOLLER LİSTESİ	xvii
KISALTMALAR LİSTESİ	xvii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM2.....	6
LİTERATÜR ÖZETLERİ.....	6
2.1 Alerji.....	6
2.2 Acil Hipersensitivitenin Mekanizmaları	8
2.2.1 Alerjik (Atopik) Fenotip: Genetik Etkiler Ve Aday Genler	9
2.2.2 Alerjik Reaksiyonun Mekanizması	10
2.3 Polen Alerjisi	11
2.3.1 Polen Morfolojisi.....	12
2.3.1 2 Apertürler.....	16
2.3.1.3 Apertür Yapısı ve Fonksiyonları	20
2.3.1 4 Polen Duvarı	22
2.3.2 Alerji Etkeni olarak Polenler	28
2.3.3 Alerjeniteden Sorumlu Polen Bileşenleri: Alerjenik Proteinler.....	37
2.4 Polen Alerjisini Etkileyen Çevresel Faktörler.....	43
2.5 Betulaceae Ailesi Genel Özellikleri ve Alerji	46
2.5.1 <i>Betula alba</i> L.(= <i>Betula Pubescens</i> Ehrh.) Türünün Genel Özellikleri ve Alerji.....	51

2.6 Fagaceae Ailesi Genel Özellikleri ve Alerji.....	60
2.6.1 <i>Quercus ithaburansis</i> Türünün Genel Özellikleri ve Alerji.....	64
2.7 Tiliaceae Ailesi ve <i>T.cordata</i> Türünün Genel Özellikleri ve Alerji.....	66
BÖLÜM 3	72
MATERYALLER VE METOTLAR	72
3.1 Materyal	72
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	72
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar.....	72
3.1.3 Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler.....	73
3.1.4 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar.....	73
3.2 Materyalin Temini.....	73
3.3 Materyalin Toplanması.....	73
3.4 Polen Morfoloji Çalışmaları.....	76
3.4.1 Wodehouse Yöntemi.....	76
3.4.2 Gliserin Jelatin Hazırlanması.....	77
3.5 Polenlerin Ölçümü.....	78
3.6 Polen Fotoğraflarının Çekimi.....	78
3.7 Ekstraksiyon için gerekli Reaktifler.....	78
3.7.1' Coca' Çözeltilisinin Hazırlanması.....	78
3.8 Polen Ekstrelerinin Hazırlanması.....	79
3.9 Süzme (Filtrasyon) Yöntemi.....	80
3.10 Polenin Kuru Ağırlığının Hesaplanması.....	81
3.11 Polen Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	81
BÖLÜM 4	84
BULGULAR.....	84
4.1 Polenlerin Mikrofotoğrafları.....	84
4.2 Bitki Türlerinin Mikrofotoğrafları.....	84
4.3 Polen Ekstreleri ve Protein Konsantrasyonu.....	84
BÖLÜM 5	88
TARTIŞMA	88
KAYNAKLAR	97

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Hipersensitivite reaksiyonlarının sınıflandırılması.....	8
Tablo 2.2 Genler ve alerjik fenotip.....	9
Tablo 2.3 Majör alerjen bitki ailelerinin polen duvar yapısı, depo materyali ve orbikül durumu.....	35
Tablo 2.4 Polen alerjen ailelerinin taksonomik dağılımı, alerjen protein sayıları	42
Tablo 2.5 <i>Betula alba</i> L. Türünün Sistematik Şeması.....	54
Tablo 3.1 Coca çözültisinin içeriği.....	78
Tablo 3.2 Polen Ekstrelerimiz ile ticari polen ekstraktlarının protein konsantrasyonlarının karşılaştırılması.....	87

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Tetrad yapısı.....	13
Şekil 2.2 Kutup eksen ve ekvatorial düzlem.....	14
Şekil 2.3 Polarite.....	14
Şekil 2.4 Tetrad düzenlenmesi.....	15
Şekil 2.5 Apertür düzenlenmesi.....	15
Şekil 2.6 Polen biçimleri.....	16
Şekil 2.7 Polen tanesinin polaritesi, çiftçenek <i>Bellisperennis</i> . <i>Astreaceae</i>	17
Şekil 2.8 Polen tanesi polaritesi, tek çenekli. <i>Alliumpradoxum</i> . <i>Alliaceae</i>	18
Şekil 2.9 Sporlarda tetrad işaretler.....	19
Şekil 2.10 Pre-polen	19
Şekil 2.11 Taksoid polen germinasyonu.....	21
Şekil 2.12 Anlık polen tüpleri.....	21
Şekil 2.13 Polen duvarı tabakalanması.....	22
Şekil 2.14 Kostal polen.....	23

Şekil 2.15	Saklat polenlerde terminoloji.....	24
Şekil 2.16	Harmomegatik etki.....	27
Şekil 2.17	Polen içeriğinin apertür ve parçalanmış granüllerden dışarı çıkması.....	29
Şekil 2.18	Farklı duvar karakteristikleri gösteren polen taneleri.....	31
Şekil 2.19	Kompakt veya tespit edilebilir endekzini olmayan polen duvarı.....	33
Şekil 2.20	Huş ağacı erkek çiçeği içinde yerleşmiş yapıların taramalı elektron mikroskopik görüntüleri.....	35
Şekil 2.21	Polen ve bitki besin alerjenlerinin protein aile dağılımı	41
Şekil 2.22	Kırsal ve kentsel alanlarda toplanmış huş poleninin taramalı elektron mikroskopik görüntüleri.....	44
Şekil 2.23	Polen-Partikül etkileşimi yoluyla oluşan alerjen taşıyan aerosolün öngörülen mekanizması.....	45
Şekil 2.24	Betulaseöz bitkilerin Fosil polen, yaprak ve meyveleri ve Betulaceae familyasında yayılan türün, yaprak ve meyvelerinden elde edilen güvenilir fosil kayıtlarına dayanan, en eski oluşumları.....	48
Şekil 2.25	Alerjenik Fagales cinslerinin coğrafik dağılımı.....	50
Şekil 2.26	Protein fonksiyonlarına göre kümelenmiş ağaç polen alerjenlerinin şematik gösterimi	51
Şekil 2.27	Huş ağacının yıllara göre gelişme durumu.....	52
Şekil 2.28	<i>Betula alba</i> 'nın erkek ve dişi çiçeklerini (sırasıyla resmin sağında) ve meyvesini (resmin solunda) temsil eden resim	53

Şekil 2.29	Park, bahçe ve yol kenarlarında dikilmiş <i>Betula</i> türüne ait ağaçlar	55
Şekil 2.30	Sonbahar aylarında <i>Betula alba</i> ağaçları (üst resim), <i>Betula alba</i> yaprak ve dişi organ (alt resim) fotoğrafları	56
Şekil 2.31	Atmosferik örneklerin ışık mikroskopik incelemesi ve sayımı esnasında preparatlarda tespit edilen bazı huş ağacı polenleri	56
Şekil 2.32	Rüptüre polen. 3 saat su içinde germinasyondan sonra polen rüptüre olmuştur	57
Şekil 2.33	<i>Betula pubescens</i> Ehrhart tipinin taramalı elektron mikroskopik fotoğrafları: <i>Betula pubescens</i> Ehrhart ssp. <i>pubescens</i> , 1, 2, 4-5; <i>Betula pubescens</i> Ehrhart ssp. <i>carpatica</i> , 3; <i>Betula pubescens</i> Ehrhart ssp. <i>Tortuosa</i>	57
Şekil 2.34	<i>Betula pubescens</i> Ehrhart tipinin taramalı elektron mikroskopik fotoğrafları: <i>Betula pubescens</i> Ehrhart ssp. <i>pubescens</i> , 1, 5- 6; <i>Betula pubescens</i> Ehrhart ssp. <i>tortuosa</i> , 2-4.....	58
Şekil 2.35	<i>Quercus</i> polenlerinin ışık mikroskopik incelemesi.....	59
Şekil 2.36	<i>Quercus</i> polen tanelerinin ışık mikroskopik fotoğrafları. (a-d) <i>Q. macranthera</i> , (e-h) <i>Q. longipes</i> , (i-l) <i>Q.patraea</i> subsp. <i>İberica</i> . (a,c,e,g,i,k) ekvatoryal bakış	62
Şekil 2.37	<i>Quercus</i> polen tanelerinin taramalı elektron mikroskopik fotoğrafları. (a-d) <i>Q. macranthera</i> . (e-h) <i>Q.patraea</i> subsp. <i>İberica</i> . (i-l) <i>Q. robur</i> subsp. <i>pedunculiflora</i> . (a,e,i) Polar, (d,h,l) Ekvatoryal görünümler.....	62
Şekil 2.38	<i>Quercus ithaburensis</i> Decne. türüne ait palamut	63
Şekil 2.39	<i>Quercus ithaburensis</i> Decne	65

Şekil 2.40 <i>T. cordata</i> türüne ait yaprak, çiçek ve meyve yapılarının demonstre edildiği resim	65
Şekil 2.41 <i>T. cordata</i>	67
Şekil 2.42 <i>T. cordata</i> polenlerinin ışık mikroskopik fotoğrafı.....	68
Şekil 2.43 <i>T. cordata</i> poleni taramalı elektron mikroskopik fotoğrafları, soldaki resim polar görünüş, sağdaki resim kuru polen taneleri	68
Şekil 2.44 <i>T. cordata</i> poleni taramalı elektron mikroskopik fotoğrafları. (1) polar görünüm (2) ekvatoryal görünüm (3) apertür (4) ekzin yüzeyi.....	69
Şekil 2.45 Ig E immunedeksiyon deneyi: hat 1) <i>Tilia</i> ekstraktı 2) <i>Platanus</i> ekstraktı 3) Negatif kontrol 4) <i>Platanus</i> ekstraktı ile <i>Tilia</i> -Ig E immunedeksiyonunun inhibisyonu (16).....	69
Şekil 3.1 Polen örneklerinin kurutulması	74
Şekil 3.2 Toplanan Polenlerin Elenmesi	75
Şekil 3.3 Polenlerin asetonla yıkama ve etuvde kurutulması işlemi	76
Şekil 3.4 Polen preparatlarının hazırlanışı	77
Şekil 3.5 Polen ekstratlarının hazırlanışı	80
Şekil 3.6 Polenlerin total protein konsantrasyonunun ölçümü.....	83
Şekil 3.7 Polen preparatlarının hazırlanışı	83
Şekil 4.1 <i>B.alba</i> ‘nın polen mikrofotografı Nikon ECLİPSE TS100 mark mikroskop ile yapılmış olup ölçümler için ise X40’lık objektif kullanılmıştır.....	84

Şekil 4.2 *Q. ithaburensis* ‘in polen mikrofotoğrafı Nikon ECLİPSE TS100 marka mikroskop ile yapılmış olup ölçümler için ise X40’lık objektif kullanılmıştır. 85

Şekil 4.3 *T. Cordata*‘ nın polen mikrofotoğrafı Nikon ECLİPSE TS100 marka mikroskop ile yapılmış olup ölçümler için ise X40’lık objektif kullanılmıştır.....85

Şekil 4.4 Protein konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan standart grafik.....86



SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ

kDa	Kilodalton
M	Molar
rpm	Revolution per minute
IgE	İmmünoglobulin E
IgM	İmmünoglobulin M
IgG	İmmünoglobulin G
SEM	Scanning Electron Microscope (Taramalı E. M.)
WHO	World Health Organization
HLA	İnsan lökosit antijeni
MHC	Majör doku uygunluğu kompleksi
STAT6	Sinyal aktarıcı ve transkripsiyon aktivatörü 6
ICAM-1	İntrasellüler adezyon molekülü-1
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekülü-1
pk	Polenkit
ekt	Ektekzin
end	Endekzin
BCA	Bişinkoninik asit
BSA	Bovin Serum Albumin (Sığır serum albümin)



BÖLÜM 1

1.1 GİRİŞ

Allerjik hastalıklar modern toplumların çoğunda büyük bir sağlık problemidir. Avrupa alerji raporuna göre Avrupa'daki alerjik rinitin mevsimsel prevalansı %15' dir. Astım prevalansı oranı %2,5-10 arasında çeşitlilik gösterir. Ev içi ve ev dışı çevreden kaynaklanan alerjenler-ev tozu akarları, hayvan tüyleri ve polen alerjenleri-atopik ebeveynlerin genç çocuklarında ilk etapta duyarlanmayı başlatan maddelerdir. Şehirsiz kirlilik, özellikle trafik emisyonundan kaynaklanan kirlenitçiler alerjen spesifik Ig E üretiminde ilave aktiviteler sergilerler ve tüm duyarlanmalar için prevalans oranlarını ve atopik çocuklarda alerjik rinit semptomlarını artırırılar. Alerjik duyarlanmanın (sensitizasyon), alerjenlerin mukozal veya cilt epitel bölgelerinde antijen sunan hücreler ile kontakından sonra başladığına inanılır. Alerjik semptomları meydana çıkarmak ve hastalığı idame ettirmek için kişi ile alerjenin tekrar eden temasları mutlak ön koşuldur. Temas, havanın inhalasyonu yolu ile gastrointestinal yola alınan besinler yolu ile ve cilt yüzeyine direkt kontakt yolu ile veya perkutanöz enjeksiyonlar ile olur. Ig E indükleyen alerjenlerin çoğu bitki veya hayvan orjinli çevresel maddelerdir ve moleküler ağırlığı 8-10 kDa ve üstü olan protein ve glikoproteinlerdir. Bu alerjenler dendritik hücreler tarafından alınır, işlenir ve yüzeyinde T lenfositlere sunulur-Th2 sitokin salınma paterninin gelişmesi yoluyla- Ig E antikoları salınımları için B hücrelerini indüklerler. Bu süreç sırasında alerjik hastalığın hiçbir semptomu açık değildir ve durum sensitizasyon (duyarlanma) olarak adlandırılır. Sensitize bireylerin tekrarlayan alerjen maruziyeti, hastalığın kızarma ve kabarma veya derideki ekzema, rinokonjunktivit, hapsirık veya hava yolu bronkokonstruksiyonu gibi tip 1 alerjik hastalık semptomlarını meydana getirir [1].Havadaki biyolojik partiküller bitki, hayvan ve insanlardaki birçok hastalıktan sorumludur. İnsanlardaki bronşiyal astım, alerjik rinit ve konjunktivit gibi solunum yolu alerjileri havadaki biyolojik partiküllerin solunması sonucu ortaya çıkarlar. Havadaki biyolojik partiküller, mantar sporları, bakteri, virus, alg, bitkilere ait diğer parçacıklar ve bunlardan çok daha fazla miktarda polen tanesini içermektedir.

Bu aeroalerjenler, alerjik duyarlanma ve sonrasında spesifik Ig E antikorunun üretiminden sorumludurlar. Ig E' nin vücut tarafından üretimi ve duyarlanmanın oluşumu bölgeden bölgeye değişiklik gösterebilmektedir. Havadaki herhangi bir biyolojik partikülün aeroalerjen olarak nitelenebilmesi için öncelikle söz konusu partikülün havada bol miktarda veya yaygın olarak bulunması, havada asılı kalıyor olması, antijen içermesi ve duyarlı kişilerin bu biyolojik partiküllere en azından bir kaç kez tepki vermiş olması gereklidir [2].

Son yıllarda yapılan çalışmalar aeroalerjenlerden kaynaklanan hastalıklara sahip olan bireylerin sayısında bir artış olduğunu göstermiştir. Bunun nedeni tam olarak bilinmemektedir. Ancak tartışılmakta olan birçok hipotez vardır. İklimdeki değişiklikler sonucu polenlerin atmosferdeki miktarı ve bulunma süresinin artması; hava kirliliği ve aeroalerjen etkileşimlerinin mevsimsel alerjik rinit prevalansını arttırabileceği tartışılan hipotezlerden bazılarıdır [3-4]. Hava kirleticileri alerjiye yatkın kişilerde solunum yolu geçirgenliğini arttırarak polen alerjenlerinin mukoza tabakasına daha kolay nüfuz etmesine ve immün sistem hücreleri ile daha kolay etkileşime girmesine sebep olur [5]. Aeroalerjenlerin sağlık üzerindeki olumsuz etkileri, dış ortama sağlanacak adaptasyon ya da önleyici tıbbi tedavilere duyarlanma oluşmadan önce başlanması sayesinde önemli derecede azaltılabilir. Bu doğrultuda, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) polen mevsimlerinin önceden tahmin edilmesinin önemini vurgulamış, iklim değişiminin aeroalerjen miktarına ve insan sağlığına etkileri ile ilgili yeni çalışmalar yapılmasını önermiştir [2].

Polen taneleri, bitkilerin erkek üreme materyalini (gameti ve DNA'yı) çiçeğin dişi organına taşımada görevli olan yapılardır. Polen tanelerinin, dişi organ üzerine erkek gametin taşınması sırasındaki yolculukta karşılaşılabilecekleri olumsuz koşullara karşı dayanıklı olması gerekir ve polenin çeper yapısı buna uygun adaptasyonlar göstermektedir. Alerjenik etkisi daha çok olan polenler ile diğerleri arasında polenin çeper yapısı, alerjenlerin salınım ve lokalizasyonu, polen tanesi içerisindeki ve üzerindeki depo maddeleri açısından birtakım farklılıklar bulunması, polenlerin alerjik etkisinde yukarıda bahsi geçen konuların etkili olduğunu düşündürmektedir. Polen tanelerinin içeriğinin apertürlerden ya da polen tanesinin çeşitli nedenler ile parçalanması sonucu açığa çıktığı bilinmektedir. Polen alerjenleri moleküler ağırlıkları 5-80 kDa arasında değişen suda çözünebilir stabil protein ya da glukoprotein yapısındaki maddelerdir. Son dönemlerde yapılan çalışmalar duyarlı

bireylerin birçoğunda alerjik reaksiyonlara neden olan major alerjen proteinlerin çoğunun, sitoplazma içerisindeki amiloplastlarda oluştuğunu, bazen organeller ile ilişkili olduğunu ve çok nadir olarak polen duvarında yer aldığını göstermiştir [2].

Proteinlerin alerjenitesi mukozal bariyerleri aşmasına, çözünabilirliğine ve molekül büyüklüğüne bağlı olarak değişiklik göstermektedir [9]. Tek bir polen tanesi onlarca farklı tipte alerjen içerebilmektedir. Örneğin Gramineae (Buğdaygiller) polenlerinde 11, *Olea europea* L. poleninde 10, *Parietaria judaica* L. ise 9 farklı çeşit alerjen içermektedir [6-8]. Bu proteinlerin tanımlanması alerjik hastalıkların moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ve tedavi süreçlerinin geliştirilmesi açısından çok önemlidir. Alerjenik proteinlerin tanımlanmasında, protein mikrodarrayleri ve iki boyutlu jel elektroforezi ile birleştirilmiş immunblotlama ve ardından yapılan kütle spektrometrisi gibi proteomik teknolojiler artan sıklıkta kullanılmaktadır [10].

Son 20 yılda polen türevi alerjenik proteinlerin moleküler özelliklerinin anlaşılmasında büyük gelişmeler yaşanmıştır. Farklı bitki türleri içinde, çeşitli protein ailelerine ait polen alerjenleri tanımlanmıştır. Polen alerjenleri üzerine geniş miktarda bilgi Allergome (www.allergome.org) veya İmmunoloji Dernekleri Uluslararası Birliği Alerjen Adlandırma Alt Komitesinden elde edilen alerjenler resmi listesi (Official List of Allergens from the International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee) (www.allergen.org) gibi alerjen veri tabanlarından sağlanabilir. Bununla birlikte, polen alerjenlerinin sistematik bir sınıflandırması (taksonomik ve moleküler yaklaşımları içeren) şimdiye kadar uygun şekilde yapılamamıştır. Polen alerjenleri arasındaki taksonomik ve moleküler ilişkilerin belirlenerek yapılan derlemeler, klinik pratik, temel araştırmalar ve düzenleyici kaynakça olarak çeşitli alanlarda değerli bir araç olacaktır [11].

Polen alerjen proteinleri, totalde 7868 protein ailesi içinden sadece 29 unda sınıflandırılmıştır. Ekspansinler, profilinler ve kalsiyum bağlayan proteinler (EF hand domain içerenler) major polen alerjen ailelerini oluştururlar. Ole e 1-benzeri, pektatliyz, ribonükleaz, Bet v 1 benzeri, glikozilhidrolaz 28, FAD bağlayan domain, thaumatin benzeri, prolamin, Amb V alerjen protein aileleri daha az sayıda alerjen protein içerirler. Farklı olarak bitki besin alerjenlerinin çoğu prolamin, kupin veya profilin ailelerine aittir. Bazı polen alerjenleri çok sık olarak ortaya çıkabilirler

(örneğin profilinler), bazıları belirli bitki ailelerinde mevcuttur (örneğin pektatliyz) veya bazıları tek bir takson ile sınırlıdır (thaumatin benzeri proteinler). Allerjenik bitki profilinleri birbirleri arasında %70-85 oranında dizilim benzerliği olan yüksek oranda korunmuş bir protein ailesini oluştururlar, fakat düşük diziliş benzerliği gösteren %30-40 ı insanın da dahil olduğu diğer ökaryotiklerden kaynaklanan nonallerjenik profilinlerdir. Benzer şekilde allerjenik polkalsinler %64-92 oranında dizilim benzerliğine sahiptirler fakat %39-42'si düşük dizilim benzerliğine sahip, insan ve vegetatif bitki dokularından kaynaklanan non-allerjenik kalmodulinler ve kalmodulin benzeri proteinler ile ilişkilidir [11].

En çok allerjenik ağaç poleni Kuzey, Orta ve Doğu Avrupa da Huş ağacı (*Birch-Betula*) tarafından, Akdeniz bölgesinde Zeytin (*Olea europaea*) ve de Servi (*Cypress-Cupressus*) tarafından üretilir. Zeytin poleni allerjik rinitin İspanya, Güney İtalya, Yunanistan ve Türkiye'deki en önemli sebebidir [12]. Fagales takımına ait ağaç polenleri, ılıman iklim kuşağında Kış/İlkbahar aylarının ana allerjik rinit sebebidirler. Fagales takımı; Betulaceae, Casuarinaceae, Fagaceae, Juglandaceae, Myricaceae, Nothofagaceae, Rhoipteleaceae ve Ticodendraceae olmak üzere 8 aileden oluşmasına rağmen Betulaceae (*Alnus*, *Betula*, *Carpinus*, *Corylus*, *Ostryopsis* ve *Ostrya*) ve Fagaceae (*Fagus*, *Castanea* ve *Quercus*) ailelerinin üyeleri en sıklıkla alerji ile ilgilidirler. Major Fagales polen allerjenleri Bet v 1 (Birch-Huş), Aln g 1 (Alder-Akçaağaç), Car b 1 (Hornbeam-Gürgen), Ost c 1 (Hop Hornbeam-Kayacık ağacı), Cor a 1 (Hazelnut-Fındık), Fag s 1 (Beech-Kayın), Cas s 1 (Chestnut-Kestane) ve Que a 1 (Oak-Meşe) geniş bir grup aeroalerjen ve yaygın besin allerjenlerini içeren patogenezis ile ilişkili protein sınıf 10 (PR-10) protein ailesine aittir. Fagales ailesinde homolog PR-10 allerjenleri çapraz reaktivite gösterirler. Bet v 1 dışında, minör Huş (Birch) polen allerjenleri Bet v 2 profilin, Bet v 3 ve Bet v 4 polkalsin (EF hand domain proteinler) ailesinin iki üyesi, isoflavon reduktaz Bet v 6 (eskiden Bet v 5 olarak adlandırılırdı) ve siklofilin A ailesinden Bet v 7 dahil Ig E bağlayan proteinler olarak tanımlanırlar [13-15]. İhlamur polenine karşı alerji 2001 yılına kadar dokümente edilmemiştir. 2001 yılında P. Mur ve arkadaşları 21 yaşında genç bir kadının evinin yakınındaki çiçeklenmekte olan İhlamur ağacının polenlerine karşı her Haziran ayında burun, göz, damak, kulak ve farenkste kaşıntı, konjunktival hiperemi, hapşıрма ve gece öksürüğü bulguları ile giden bir alerji tablosu olduğunu görmüşler ve yaptıkları laboratuvar incelemelerinde total Ig E düzeyini yüksek ve

T.cordata polen ekstraktına karşı deri prik testini (%5 w/v) pozitif olarak tespit etmişlerdir[16]. Aynı hastada konjunktival provokasyon testi (0,5 mg/mL miktar ile) ve *T. cordata*' ya karşı spesifik Ig E de (27,7 kUA/L) pozitif bulunmuştur. *T.cordata* ekstraktına sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) sonrası Ig E immunedeksiyonu ile esasen moleküler ağırlığı ~50 kDa seviyesinde spesifik bir alerjen protein bandı tespit edilmiştir. *T.cordata*' ya ait bu spesifik alerjen protein için daha ileri analizin yapıldığı bir çalışma şu ana kadar yayınlanmış literatürlerde bulunamamıştır ve ileri araştırmalara ihtiyaç duyulduğu açıktır [16].

Bu tez çalışmasında Gaziantep Üniversitesi kampüsü içindeki ağaçlandırılmış alanlarda yaygın olarak bulunan Tüylü Huş (*Betula alba*), Anadolu Palamut Meşesi (*Quercus ithaburensis*) ve Ihlamur (*Tilia cordata*) ağaçlarının tozlaşma dönemlerinde toplanan polen örneklerinden elde edilen ekstrelerden polenlerin morfolojilerinin ve potansiyel alerjenik total protein konsantrasyonlarının belirlenmesi, tanısal testlerde kullanılmak için üretilen ticari polen ekstraktları ile total protein konsantrasyonları yönünden karşılaştırılmaları amaçlanmıştır.

BÖLÜM 2

LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1 Alerji

Alerji, bir bireyin immün sisteminin birçok insana zararsız olan çevresel maddelere (alerjenlere) reaksiyon vermesi sonucunda gelişir. Alerji terimi ilk olarak 1906 yılında Clemens von Pirquet tarafından bir organizmanın değişmiş reaktivite durumunu tanımlamak için önerilmiştir. Gell ve Coombs (1963) alerjiyi immünolojik mekanizmalar sonucu ortaya çıkan bir aşırı duyarlılık reaksiyonu (hipersensitivite) olarak tanımlamışlardır [17]. Astım ve alerjik hastalıkların, duyarlı kişilerde solunum mukozasının inflamatuvar sürecini uyaran alerjenlerden kaynaklandığı şimdi iyi bilinen bir gerçektir. Geniş bir popülasyon polenler, sporlar, toz, böcekler gibi aerobiyojik etkenlerden ve farklı tür yiyeceklerden kaynaklanan bu hastalıklardan etkilenmektedir, bununla birlikte hastalıkların yüzdeleri ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir [18].

Alerjik hastalıkların prevalansı Amerika Birleşik Devletleri'nde ve gelişen dünyada önemli ölçüde artmıştır. Birleşik Devletlerde alerjik hastalıkların kümülatif prevalansı %30 olarak hesaplanmıştır. Son verilere göre, Birleşik Devletlerde her yıl 50 milyon kişide alerjiden etkilenme mevcutken, bunun 31 milyondan fazlası astım hastası 9 milyondan fazlası çocuktur. Mevsimsel alerjilerin 1985 den beri %30' dan fazla arttığı hesaplanmıştır, çocukluk çağı fındık alerjisinin 1997 ile 2002 yılları arasında prevalansı ikiye katlanmıştır ve astım 1982'de 1000'de 35 vakadan, 1994'de 1000'de 56 vakaya artış göstermiştir. Alerjik hastalığın çok sayıda geniş kategorilerinde toplam yıllık tanı ve tedavi maliyeti onlarca milyar dolara yaklaşmaktadır. Basitçe alerjik hastalıklar büyük bir halk sağlığı problemidir [19].

Alerjik hastalıkların artan prevalansını açıklamaya dair son girişimler genetik ve çevresel faktörlerin tümüne odaklanmıştır. Konağın genetik polimorfizmlerinin alerjik hastalıkların gelişimine katkıda bulunduğu açık olmasına rağmen daha önceden de belirtildiği gibi genetik etkiler hastalığın prevalansındaki hızlı değişikliklerin miktarını etkilerler. Mevcut teoriler alerjik hastalık prevalans değişikliğinde çevresel etkilerin rolünü vurgulamaktadır. Çeşitli araştırmacılar, gelişmiş ülkelerde erken çocukluk çağı sırasında azalmış mikroorganizma maruziyetinin, adaptif immun sistemin aberan (atipik fazla) gelişimine ve bütün alerjik hastalıkların ve bazı otoimmun hastalıkların predispozisyonuna (yatkınlaşmasına) neden olduğunu öne sürmektedir. Bu teori, **Hijyen hipotezi** olarak adlandırılır, bazı bakteri ve parazitlere erken maruziyetin matür dentritik hücreler ve regultuar T hücrelerinin gelişimini teşvik ettiğini kabul eder, oysaki azalmış maruziyetimmun aracılı hastalık patogeneze katılan Th1 ve Th2 efektör T hücrelerinin yüksek seviyelerineneden olur. Bakteri, parazit ve hatta evcil hayvanlara maruziyetinyararlı etkileri için ortaya atılan mekanizma, dendritik hücrelerden salınıp antijen spesifikregultuar T hücrelerini indükleyen antiinflamatuvar sitokinler olan interlökin-10 (IL-10) ve transforme edici büyüme faktörü- β (TGF- β)'nın artmış salınımıdır. Bu etkinin bakteriyel ürünler (bakteriyel endotoksin, Toll benzeri reseptörler [TLR2 ve TLR4]) ve dendritik hücreler, monositler ve makrofajlarında dahil olduğu doğal immun sistem hücreleri arasındaki etkileşim aracılığı ile olduğu kabul edilmiştir. Alerjik hastalık gelişiminin epidemiyolojisini araştırmak ve hijyen hipotezinin bakış açısını doğrulamak için çeşitli merkezlerde geniş ölçekli longitudinal çalışmalar yürütülmektedir [19].

Klinik düzeyde, alerjik hastalıkların bulgu ve semptomlarının diğer hastalıklardan ayırmanın zor olabildiği iyi şekilde belgelenmiştir. Klinik manifestasyonları (belirgin hale gelen bulguları) göreceli olarak hafif (ılımlı) ve kendi kendini sınırlayan, mevsimsel alerjik rinitteki gibi veya astımdaki gibi morbidite ile birlikte giden şiddetli şekilde olabilir. Laboratuvar testleri alerjik hastalığı olan hastaların değerlendirilmesinde faydalıdır fakat acil hipersensitivitenin temel mekanizmalarının bilgisi ile test sonuçları ve bunların tanı koyucu ön görme değerleri (diagnostik prediktif değerler) arasındaki ampirik (deneyerek görülen) ilişkilerin farkındalığı testlerin optimize edilmesi için gereklidir [19].

2.2 Acil Hipersensitivitenin Mekanizmaları

Ig E, alerjik inflamasyonun en önemli tetikleyici molekülüdür. 1960' lı yılların sonlarında araştırmacılar, alerjik hastalığı olan hastalardan elde edilen serumun cilt sensitize edici aktivitesinden sorumlu olan insan immunoglobulinlerinin yeni bir sınıfını belirlemek için iki farklı laboratuvarda bağımsız olarak çalıştılar. Bu immunoglobulin orjinal olarak Ig ND olarak adlandırıldı daha sonra Ig E olarak isimlendirildi. İzleyen yıllar içinde araştırmacılar, immunokompetan B lenfositleri tarafından Ig E üretiminin kontrolü, inflamatuvar hücrelerin toplanmasının başlatılması ve alerjik inflamasyon alanlarında Ig E ile sensitize olmuş efektör hücrelerden vazoaktif mediatörlerin salınımını içeren acil hipersensitivitenin temel biyolojik mekanizmalarını keşfetmeye odaklanmışlardır [19].

Aşırı duyarlılık (hipersensitivite) reaksiyonları, antikor ya da hücre aracılı olabilir. Gell ve Coombs (1963) tarafından yapılan sınıflandırmada 4 tip aşırı duyarlılık reaksiyonu yer almaktadır (Tip I, Tip II, Tip III ve Tip IV). Aşırı duyarlılık reaksiyonları ve bunlara aracılık eden antikor tipleri Tablo 1' de gösterilmiştir. Çoğu hastada, alerjik bir reaksiyon için tipik sorumlu antikor Ig E izotipindedir ve bu reaksiyon Ig E-aracılı alerji olarak adlandırılır. Bazı bireylerin yaygın alerjenlere karşı Ig E üretme yeteneği yüksektir. Bu genetik yatkınlığa **atopi**, böyle bireylere de **atopik** denir. Diğer immünoglobulin sınıfları ve/veya hücreler tarafından uyarılan tüm aşırı duyarlılık reaksiyonları ise Ig E-aracılı olmayan alerjiler olarak kabul edilir [17](Tablo2.1).

Reaksiyon	Antikor
Tip 1 – Anafilaksi	Ig E
Tip 2 – Sitotoksik	Ig G, Ig M
Tip 3 - İmmunkompleks	Ig G (Ig M)
Tip 4 - Geç tip	-

Tablo 2.1: Hipersensitivite reaksiyonlarının sınıflandırılması

Son alışmalar ise alerjik (atopik) fenotipin genetik belirleyicilerinin araştırılmasına ve Ig E üretiminin düzenlenmesinden sorumlu genlerin tanımlanmasına odaklanmıştır [19].

2.2.1 Alerjik (Atopik) Fenotip: Genetik Etkiler Ve Aday Genler

Aile öyküsünün alerjik hastalık gelişimi olasılığını güçlü bir şekilde etkilediği gayet iyi bilinmektedir. Genetik olarak yatkın bireyler sıklıkla atopik olarak klinik alerjik fenotip ile sinonimdir. Genetik epidemiyolojik çalışmaların sonuçları Ig E' nin serum düzeylerinin çeşitli genler tarafından etkilendiğini ortaya koyar ve klinik çalışmalar yüksek Ig E fenotipleri için serumdaki Ig E düzeylerinin birkaç kat daha yüksek olduğunu göstermektedir. Yapısal düzeyde, alerjik fenotipi belirlemede rol oynayabilen birkaç aday gen tanımlanmıştır fakat sonuçlar tartışmalıdır ve popülasyon çalışmalarına göre çeşitlidir. Popülasyon genişliği bağlantı analizi çalışmaları çeşitli aday genlerin kromozomal lokasyonlarını belirlemiştir ve pozisyonel klonlama çalışmaları kabul edilen alerji genlerinin immün yanıtın düzenlenmesi ile ilgili moleküllerin bilinen genleriyle ilişkisini desteklemektedir. Bu genler insan lökosit antijenleri HLA-DRB1 ve DQB1 (kromozom 6p21), yüksek afiniteli Ig E Fc reseptörünün α zinciri (kromozom 11q), IL-4, IL-13 nde dahil olduğu sitokinler ve sitokin reseptörleri (kromozom 5q31), IL-4 reseptör α geni, tirozinkinazlar ve nükleer transkripsiyon faktörlerini de içeren genlerdir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Genler ve Alerjik Fenotip		
Kromozom	Genetik Lokus	Fenotip
6p21-23	HLA* D bölgesi (HLA-DRB1 ve DQB1)	Yaygın alerjenlere yanıt veren veya vermeyen
11q13	Fc ϵ reseptör β zinciri	Aeroalerjenlere artmış yanıt verebilirlik; yüksek total serum Ig E
5q31	Sitokinler interlökin (IL)-3, IL-4, IL-5, IL-9 ve IL-13; β -adrenerjik reseptör	Yüksek total serum Ig E; artmış havayolu yanıt verebilirliği
16	IL-4 reseptörü	Yüksek total serum Ig E
20p13	ADAM33 geni	Artmış havayolu yanıt verebilirliği, havayolu yeniden modellenmesi

*HLA: İnsan lökosit antijeni. Alerjik hastalıklarla ilgili 120 den fazla aday gen belirlenmiştir. Bu tabloda yer alan liste çok sayıda çalışmada bulunan gen örneklerinden seçilmiştir [19].

Çeşitli aday genler arasında, alerjik hastalıklarda oynadığı rol açısından en güçlü kanıtlar majör histokompatibilite kompleks (MHC) genlerinde izlenmektedir. Kromozom 6p üzerindeki HLA Sınıf II allelleri, toz akarlarından (mite) kaynaklı (*Dermatophagoides pterynissinus* ve *Dermatophagoides farinae*) yaygın alerjenler Derp p ve Derp f peptidlerine karşı alerjik yanıt verebilirliği belirlerler ve astımlı bireylerde bronşial aşırı duyarlılık (aşırı cevap verebilirlik) ile ilgili diğer lokuslarla aralarında bağlantı bulunmuştur. Benzer bir bağlantı, kromozom 11 üzerindeki Ig E Fc reseptör α -zinciri lokusu ile ilişkisi açık olan atopi geni için önerilmiştir.

Bu kabul edilen (varsayılan) atopi geni, astımlı ve *D. farinae* ve çim polen alerjenlerine karşı artmış aşırı alerjik yanıt verebilirliğe sahip Afrika kökenli Amerikalı ailelerde yapılan bir çalışmanın da dahil olduğu çeşitli çalışmalarla belirlenmiştir. Ig E sentezinin düzenlenmesi çalışmaları, IL-4 ve IL-13 sitokinlerinin B lenfositleri yoluyla Ig E sentezinin indüklediğini ve Th2 fenotipinin yardımcı ve indükleyici T lenfositlerinin farklılaşmasını teşvik ettiğini göstermektedir. Kromozom 5q üzerinde yer alan IL-4' ü de içeren sitokin gen kümesi, çeşitli aeroalerjenlere karşı Ig E yanıtını etkileyen lokus ile bağlantılıdır. Kromozom 16 üzerindeki IL-4 reseptör α zincirini de içeren diğer lokuslar alerjik fenotipte rol oynayabilirler. Bu genin, ϵ -immunoglobulin ağır zincirlerinin transkripsiyonunu sırayla kolaylaştıran, sinyal aktarıcı (transducer) ve transkripsiyon aktivatörü 6 (STAT6) yoluyla sinyal aktarımını (transduksiyonu) etkileyen mutasyonlar taşıdığı bulunmuştur. Astımla büyük oranda bağlı çalışmalarda bulunan; hücre migrasyonu, hücre adezyonu ve transmembran sinyalizasyonundan sorumlu transmembran proteinlerle ilişkili diğer genleri konak genomu içermektedir. Bu genler astım yatkınlığını ve ağırlığını etkiler ve hava yolu yeniden şekillenmesinde (remodeling) rol oynayabilir [19].

2.2.2 Alerjik Reaksiyonun Mekanizması

Solunumla alınan alerjenler vücuda girdikten sonra nazal mukozada birikir. Burada antijen sunan hücrelerce işlenerek MHC sınıf 2 hücreleri, alerjenlerin, lenf nodlarında bulunan CD4⁺ yardımcı T hücrelerinin (Th) T hücre reseptörleri tarafından tanınmasını sağlar. Alerjenle uyarılmış olan T hücreleri Th2 hücrelerine dönüşerek interlekinler (IL-3, IL-4, IL-5, IL-13) ve diğer sitokinlerin salgılanmasını sağlar. Sitokinlerin salgılanması kaskad mekanizmasını uyarak alerjene spesifik Ig

E üretimine, eozinofilik infiltrasyona, mast hücre proliferasyonuna ve hava yolu inflamasyonuna neden olur.

Erken faz reaksiyonlarında, duyarlılaşmış bireyler alerjen ile karşılaştığında mast hücre yüzeyindeki Ig E reseptörleriyle etkileşime girmesi sonucunda histamin, triptaz, lökotrien (LTC₄, LTD₄, LTE₄), prostaglandin D₂ salınır. Salınan bu maddeler damarlardan plazmanın sızmasına, arteriovenöz anastomozların dilatasyonuna, glandüler ve goblet hücrelerinden mukus sekresyonunun artmasına neden olur. Histamin kaşıntı, rinore ve hapsirıklara, lökotrienler ve prostaglandin D₂ nazal konjesyona neden olmaktadır.

Alerjen ile karşılaştıktan yaklaşık 4-8 saat sonra meydana gelen geç faz reaksiyonlarında erken fazda salınmış olan mediatörler ve sitokinler, postkapiller endotelial hücreleri etkileyerek İntersellüler Adezyon Molekülü-1 (ICAM-1), E-selektin ve Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1 (VCAM-1) ekspresyonunu artırarak eozinofil gibi lökositlerin endotelial hücrelere yapışmasını sağlar. IL-5 süperfisyal lamina proprianın, eozinofil, nötrofil, bazofil ve CD4+ (Th2) lenfositler ve makrofajların infiltrasyonunu artırmaktadır. Bu hücreler aktif hale geçerek daha fazla mediatörün salınmasına ve proinflamatuvar reaksiyonların artmasına neden olmaktadır [17].

2.3 Polen Alerjisi

Polen alerjisi, tipik olarak bitkilerin çiçeklenme mevsiminde sıklıkla bireyin polen hassasiyetinin olmasına bağlı mevsimsel bir hastalıktır. Bununla birlikte, çok kereler duyarlanmış (polisensitize), polen alerjik bireylerde alerjik rinit semptomları neredeyse tüm yıl boyunca gözlenebilir [20]. Rüzgarla polenize olan tohumlu bitkilerden kaynaklanan polenler tip 1 alerjinin dünya genelinde en önemli kaynağıdır. Çok sayıda çim, ağaç ve ot türü polen mevsiminde polenlerini yüksek konsantrasyonda dökerler ve duyarlı kişilerde mevsimsel rinokonjunktivit ve bronşiyal astımdan kaynaklanan alerjik semptomlara neden olurlar [11].

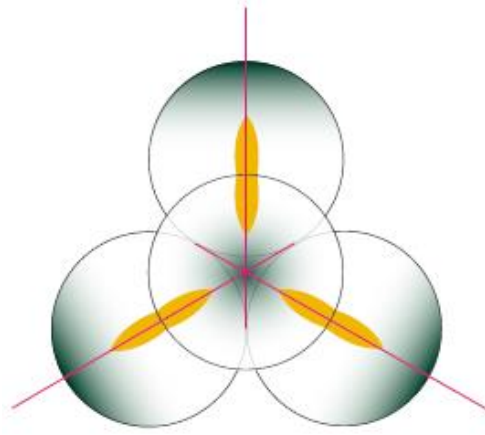
Polen alerjilerinin, alerjik bireylerin yaklaşık %40' ını etkilediği hesaplanmıştır. Genel olarak, ağaç polen alerjileri temel olarak Fagales, Lamiales, Proteales ve Pineales takımına ait alerjenik ağaçlar yolu ile meydana getirilirler. Genelde polen alerjenleri, tüm mevsimsel alerjik rinit ve astım vakaları için major bir risk faktörü

olarak değerlendirilmekte iken ev içi alerjenleri perennial (sürekli) rinit için bir risk faktörü gibi görünmektedir. Halen bazı çalışmalar perinneal alerjik rinitli hastaların %50' den fazlasının polen alerjenlerine duyarlı olduğunu göstermesine rağmen duyarlılık profilinin çeşitliliği önemli bir miktarda çalışma populasyonunun coğrafik yerine bağlıdır. Polen duyarlılığı genellikle, tüm çiçekli bitkilerin yaklaşık %10-18 ini oluşturan anemofilöz (polenleri rüzgarla yayılan) bitkilerle sınırlıdır [13].

2.3.1 Polen Morfolojisi

Polen tipi, özelliklerinin belirgin kombinasyonları yolu ile polen tanelerinin kategorizasyonunun genel bir terimidir ve sıklıkla belirli bir takson ile bağlantılı olarak kullanılır (ör. *Polygonum aviculare* tipi). Polen sınıfı, polen tanelerinin tek ve belirgin bir karakterini paylaşımlarına göre yapılmış yapay bir gruplamadır. Polen sınıfları, apertür şekli ve lokalizasyonu veya aşırı şekilde belirgin ornamentasyon (süslenme) özelliğine göre polen üniteleri olarak adlandırılırlar. Sınıflar; polyadlar, tetradlar, diyadlar, sakkat, inaperturat, sulkat, ulserat, kolpat, kolporat, porat, sinaperturat, lofat, klipeat ve plikat terimlerini içerirler. Bu sınıflar, iyi bir tanı koyucudurlar ve tanımlama anahtarları olarak faydalı olmalarına rağmen sıklıkla sistematik değeri yoktur. Genel olarak bir polen tanesi tek bir polen sınıfından fazlasına sahip olabilir, bu gibi durumlarda daha önemli özellikler ilk olarak sıralanmalıdır (ör. *Pistia*: plikat-inaperturat, *Hemigraphis*: plikat-kolporat, *Typha*: tetrad-ulserat, *Rhododendron*: tetradlar-kolporat).

Bir palinomorfun (tercihen polen taneleri ve sporlar) temel morfolojik özelliklerinin şematik sunumu Palinogram olarak adlandırılır. Simetri, hatları ve büyüklüğü, apertür sayısı ve lokasyonu, süslenmesi ve tabakalanması dahil parametreleri içerir. Olgun polenler dispersal (dağıtılma) üniteleri içinde dökülürler. Mayoz sonrası polen ürünleri tam veya kısmi birleşik veya tamamen bağımsız şekilde bulunabilirler. İkincisi, dispersal (dağıtılma) ünitesi tek bir polen tanesi ise monad, post mayotik ürünler birleşik ise diyad (nadir bir kombinasyon), tetrad veya polyad (massulae, pollinia) şeklinde olurlar. Pollinaria, iki pollinia ünitesini içten birleştiren eklenti ile oluşturan, steril dispersal (dağıtım) üniteleridir [21] (Şekil 2.1).

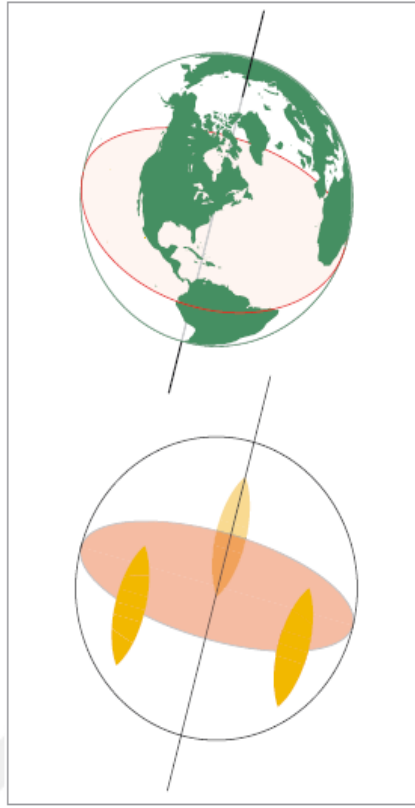


- Distal kutuplar yeşil gölgeli kısımlardır.
- Tetrad yapısında proksimal kutuptan distal kutuba doğru uzanan eksenler pembe renkle belirtilmiştir.

Şekil 2.1. Tetrad yapısı [21].

Polen şekli ve aperture yerleşimi, mayotik tetrad içindeki mikrosporun uzaysal (konumsal) oryantasyonu yoluyla belirlenen ve sadece tetrad durumunda incelenebilen polen polaritesi ile direkt olarak ilişkilidir. Her mikrosporun kutup eksenini proksimal kutuptan geçer tetradın merkezine doğru yönelir, tetrad alanının dışına distal kutba doğru uzanır. Ekvatoryal düzlem mikrosporun merkezinde yerleşir, kutup eksenine diktir. Böylece ekvatoryal düzlem polen tanesini proksimal ve distal yarı olarak iki parçaya böler.

İsopolar polen tanesi özdeş proksimal ve distal kutuplara sahiptir, böylece ekvatoryal düzlem simetri düzlemidir. Heteropolar polen tanelerinin proksimal ve distal yarıları birbirlerinden farklıdır. (Şekil 2.2-2.3)

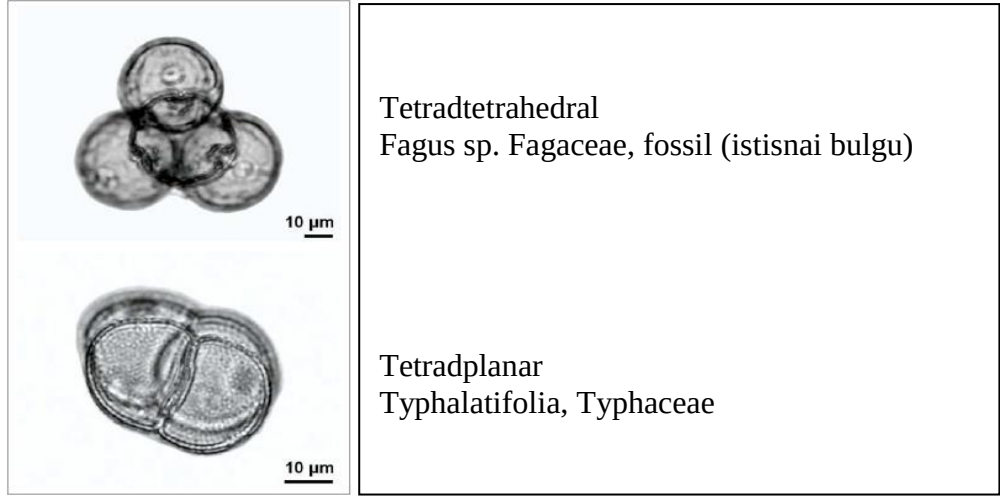


- **Şekil 2.2:** Kutup ekseni ve ekvatoryal düzlem [21]. Gösterilen siyah renkli dikey eksen, kutup ekseni; pembe renkli düzlem ekvatoryal düzlemdir.



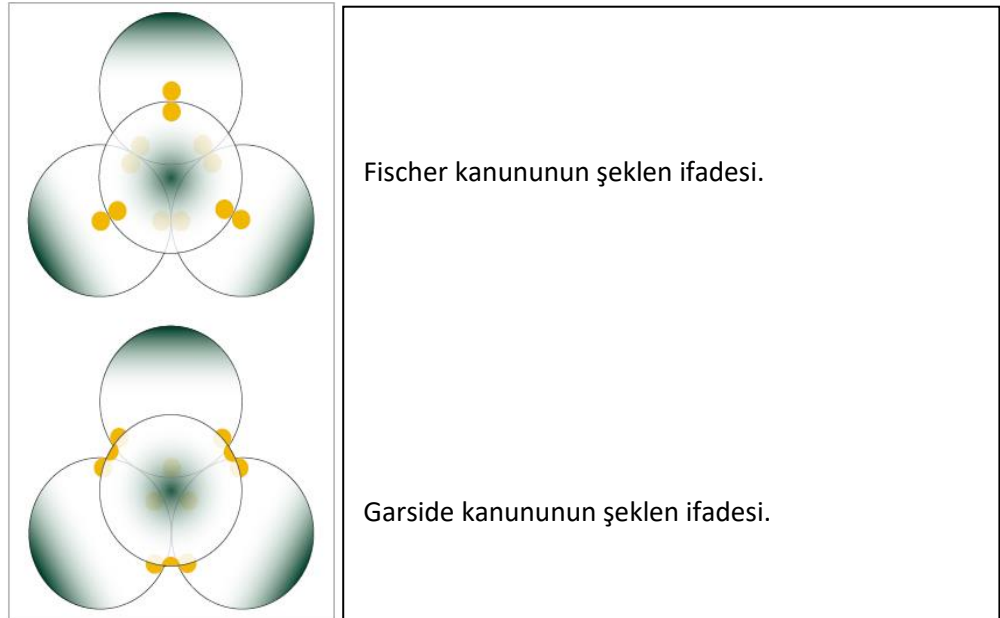
- **Şekil 2.3:** Polarite [21]. Soldaki şekil isopolar, sağdaki şekil heteropolar poleni temsil etmektedir.

Kalıcı veya ayrılmış tetradların içindeki dört mikrosporun çeşitli düzenlenmeleri, eşzamanlı veya ardışık tip sitokinezise ve spor içi duvar oluşumunun türüne bağlıdır. Eşzamanlı sitokinezin ardından mikrosporların uzaysal düzenlenmesi genellikle bir tetrahedraltetradır. Bu düzenlenme sistematik ilişkilidir. Ardışık sitokinezisin ardından mikrosporların uzaysal düzenlenmesi hiçbir sistematik ilişkisi olmayan farklı tetrad tiplerine neden olur: planar (tetragonal, linear, T biçimli) veya non-planar (decussate veya tetrahedral) (Şekil 2.4).



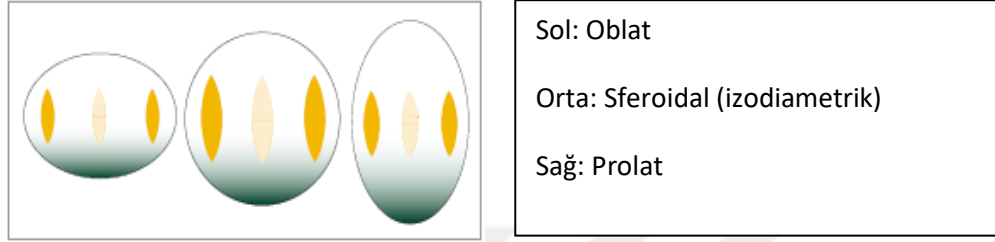
Şekil 2.4. Tetrad düzenlenmesi [21].

Üç apertürlü polen tanelerinde, eşzamanlı sitokinezisin ardından iki tip apertür düzenlenmesi oluşur (ayrılmış veya kalıcı tetrahedaltetradlar). **Fischer kanunu**, tetrad içindeki apertürlerin düzenlenmesinin en sık belirli alanlardaki altı noktadan oluşturulduğunu ifade eder (örnek: Ericaceae, kalıcı tetradlar). **Garside kanunu**, tetrad içindeki üç dört noktada grup oluşturan apertürlerin olağan dışı düzenlenmesini ifade eder (olasılıkla Proteaceae ile sınırlı, kalıcı tetrad değildir).



Şekil 2.5. Apertür düzenlenmesi [21].

Polen formu (biçimi) P/E oranı ile ifade edilir: kutup eksenin (P) uzunluğunun ekvatoryal çapa (E) oranıdır. "Sferoidal" veya "izodiametrik" polen tanelerinde kutup eksenini ekvatoryal çapa yaklaşık olarak eşittir. Kutup eksenini ekvatoryal çaptan uzun olan polen taneleri "prolat"; kutup eksenini ekvatoryal çaptan kısa olan polen taneleri "oblat" olarak tanımlanır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Polen biçimleri [21].

Polen büyüklüğü, 10 μm ' nin altından 100 μm ' nin üzerine kadar değişen ebatlardadır. Polen büyüklüğünü belirlemek için en büyük çap kullanılır. Bu ayrıca hidrasyon derecesi ve preparasyon metoduna da bağlıdır. Bu ve doğal çeşitlilik sebebi ile bir bant genişliği tespit edilmesi önerilir. Çap göstergesi olarak verilen aralık örneğin 1 μm ' nin altındadır şeklinde olması önerilmez. Aşağıda belirtilen büyüklük kategorilerinin kullanımı yardımcı olabilir: çok küçük (< 10 μm), küçük (10-25 μm), orta (26-50 μm), büyük (51-100 μm) ve çok büyük (>100 μm) şeklinde [21].

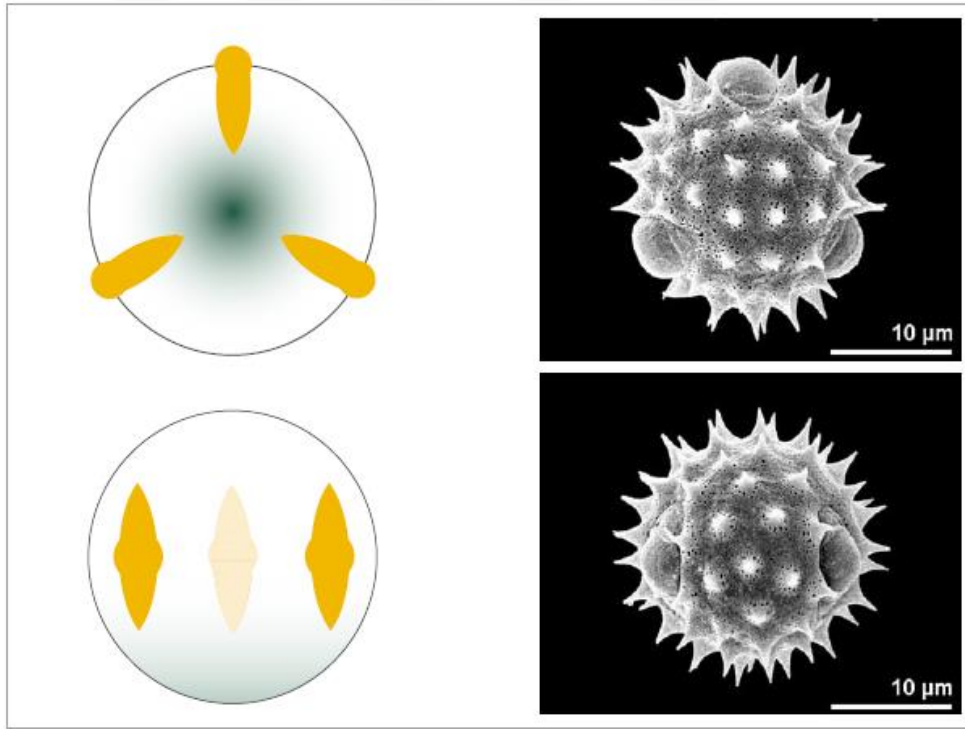
2.3.1.2 Apertürler

Apertür, polen duvarının geri kalanından anatomik ve morfolojik olarak anlamlı derecede farklı olan bir bölgesidir ve genellikle çimlenme alanı olarak fonksiyon gösterir, "harmomegati" olarak adlandırılan kurak çevresel koşullarda polen tanelerinin apertürlerini kapatarak su kaybını önlemesi işleminde rol oynar. Apertürlerini kaybetmiş polen taneleri "inaperturat" olarak adlandırılır. Apertür izahı tüm angiosperm ve gymnosperm polenlere uyar fakat gymnospermelerde apertür tipi angiospermlerden genellikle farklıdır, sıklıkla bir leptoma mevcuttur. Bundan sonra ifade edilecek olan apertür yapıları angiosperm polen yapısındakiler olacaktır.

Polenin polaritesi apertür terminolojisini belirler. Sirküler apertür ekvatoryal veya global (küresel) yerleşimli ise "porus"; eğer distal yerleşimli ise "ulcus" olarak

adlandırılır. Elonge (uzunlama) apertür ekvatoryal veya global yerleşimli ise "colpus"; distal yerleşimli ise "sulcus" adını alır. Bir porus ve colpus'un kombinasyonu "colporus" olarak isimlendirilir; colpori sadece ekvatoryal ve global yerleşimlidir. Colpi ve colpori (colpi ve pori) bazı taksonlarda eş zamanlı olarak bulunabilir, bu durum "heteroaperturat" olarak adlandırılır. Bir sirküler veya eliptik apertür belirsiz kenarlarla bir "poroid" dir.

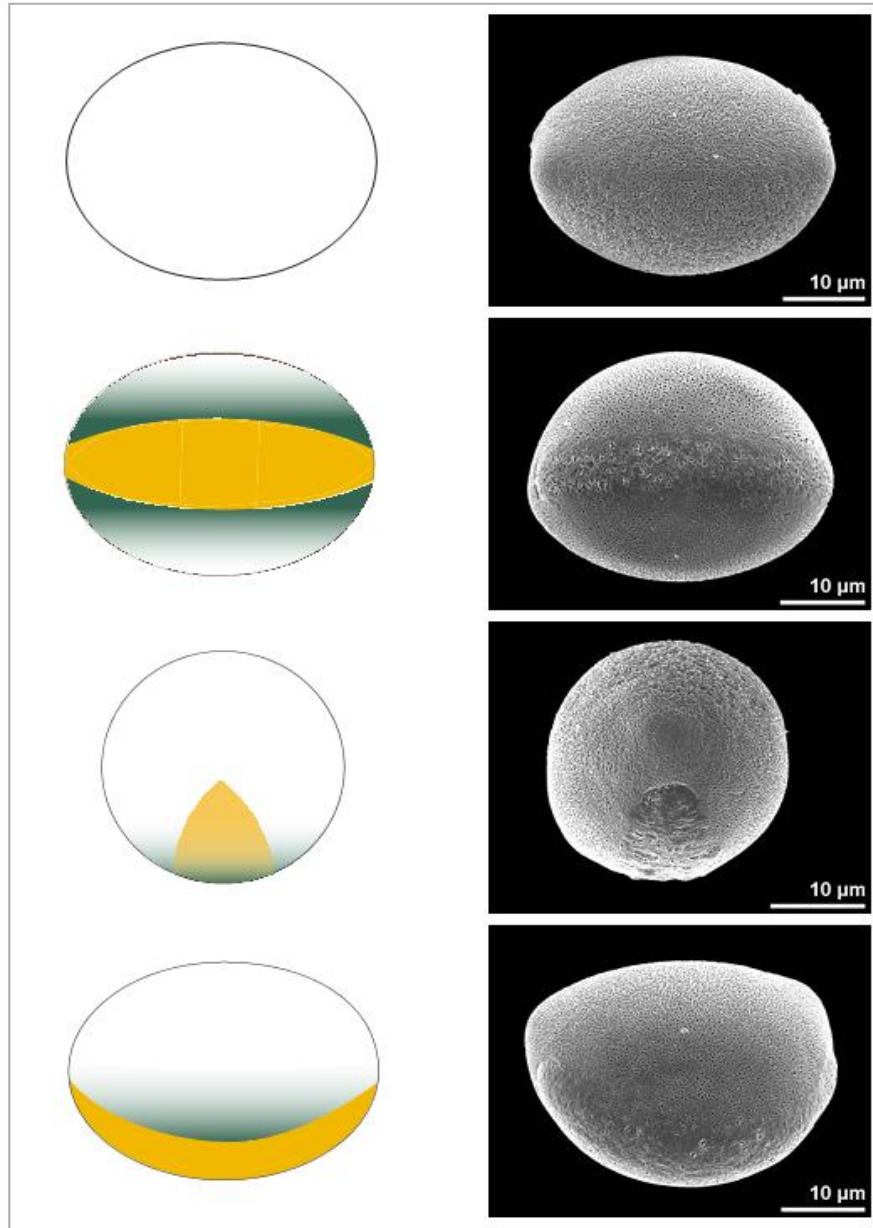
Ekvatoryal apertürlerin sayısı (pori, colpi, colpori) di- veya tri- gibi ön eklerle gösterilir. Bununla birlikte, tetra-, penta-, hekza da bazen kullanılır. Ön ek kullanımının yerine numara yazmak daha yaygın kullanılır, örneğin 4-porat veya tetra-porat, 6-colpat veya hekza-colpat gibi. Ekvatoryal bölgede üçten fazla apertür bulunan herhangi bir polen tanesi de "stefanoaperturat" (stefanoporat, stefanocolpat, stefanocolporat) olarak adlandırılır. Apertürleri küresel olarak dağılan polen taneleri "pantoaperturat" olarak adlandırılır [21] (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Polen tanesinin polaritesi, çiftçenek [21]. *Bellis perennis*. Asteraceae. (Sağ üst resim polar, sağ alt resim ekvatoryal görünümüdür.)

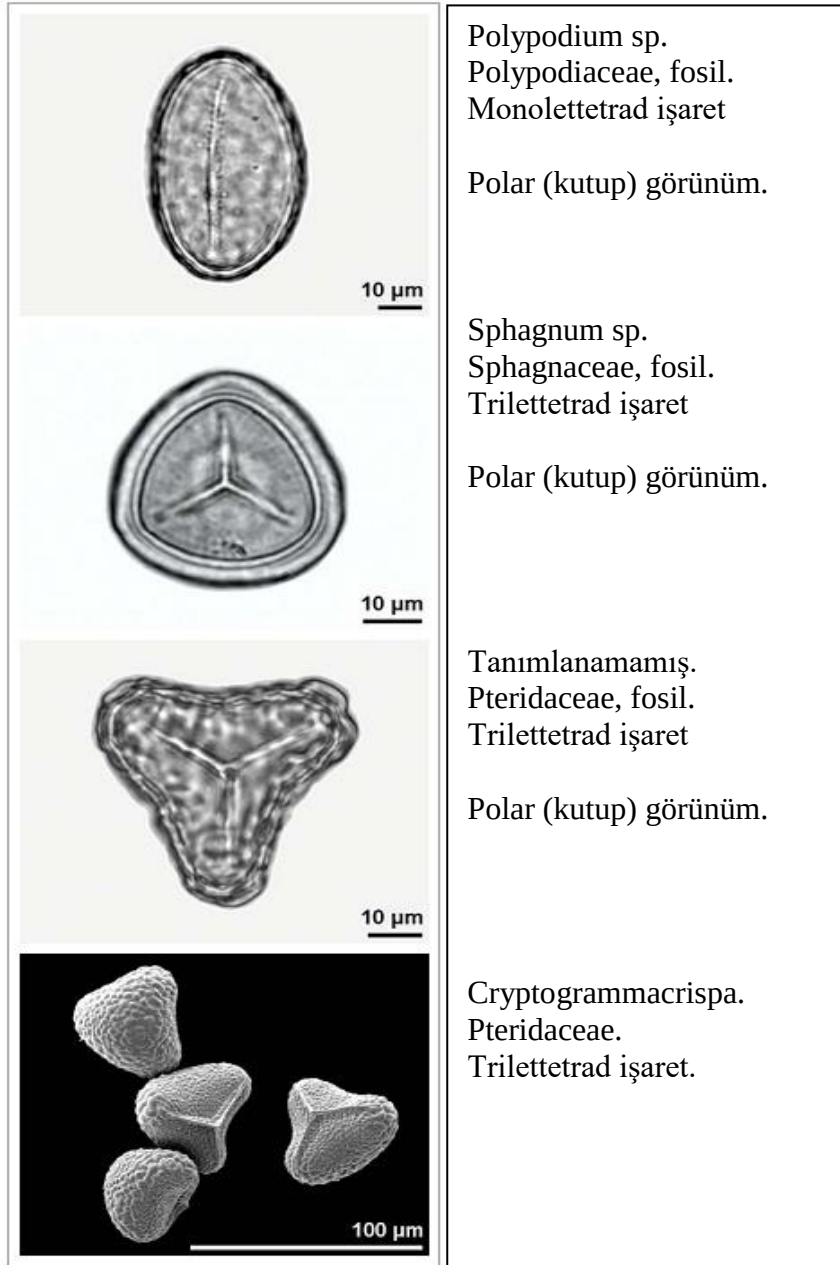
Polarite, polar (kutupsal) ve ekvatoryal görünümlere neden olur. Çift çeneklilerde genellikle bir polar ve bir ekvatoryal görünüm vardır. Tek çeneklilerde, en sıklıkla

distal apertürden kaynaklanan dört görünüm vardır: bir proksimal polar, bir distal polar ve iki farklı ekvatoryal görünüm olmak üzere [21] (Şekil 2.8).

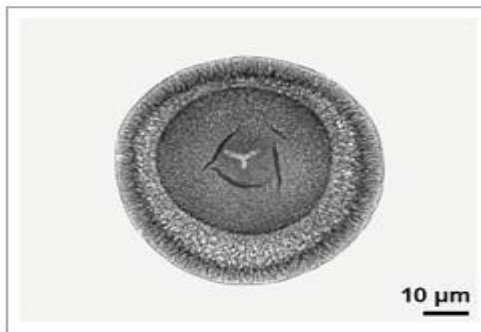


Şekil 2.8. Polen tanesi polaritesi, tek çenekli [21]. *Allium pradoxum*. *Alliaceae*. (Sırasıyla yukarıdan aşağıya doğru: proksimal polar görünüm, distal polar görünüm, ekvatoryal görünüm 1 ve 2)

Tohumlu bitkilerde proksimal çimlenme bilinmemektedir ve sporlarda da sınırlıdır, germinasyon ‘laesura’ da denilen ‘tetrad işaret’ te olur. Pre-(prae-) polen (belirli soyu tükenmiş tohumlu bitkilerin mikrosporları) proksimal ve distal apertürler ile karakterizedirler ve hareketli spermatozoidler üreterek proksimal germine olduğu farz edilir [21] (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Sporlarda tetrad işaretler [21].



Şekil 2.10. Pre-polen [21]. Polar görünüm.

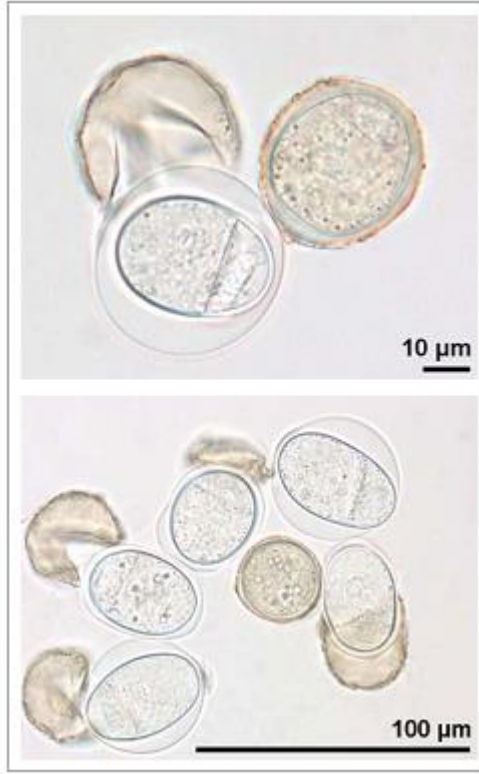
Apertürler normal olarak, apertür membranı adını alan eksinöz bir tabaka ile kaplıdır. Apertür membranları süslenmiş (ornamente) olabilir, örneğin çeşitli ekzin elementleri ile kaplı veya pürüzsüz olabilir. Bunun tersi, ‘operkulum’ kalındır, yapışık ekzin kalkanıdır ve apertürü bir kapak gibi kaplar. Genelde, apertür membranları polen kuru durumdayken katlanmıştır, asetolizisten sonra apertür membranı kaybolabilir. Apertürlerin sayısı, tip ve pozisyonları genetik olarak belirlenir ve genelde türler içinde sabittir; bununla birlikte bazen değişiklik gösterebilir (örneğin stefanoaperturat polen tanelerinde polenlerin sayısı gibi) [21].

2.3.1.3 Apertür Yapısı Ve Fonksiyonları

Apertür genellikle özel bir çimlenme alanı olarak rol oynar. İnapturat angiosperm polende polen tüpleri önceden şekillenmiş bir çıkış alanı olmadan üretilir. Taksoid polende hidrasyon sırasında ekzin, dairesel leptomanın ortasındaki tenuitas, ulcus veya papilla gibi özelleşmiş bir bölgeden rüptüre olur ve ardından dökülür.

Protoplastı da içeren intin tabakası serbestleşir ve herhangi bir yerde (inapturat polen tanesine fonksiyonel olarak benzeşen) bir polen tüp oluşabilir. Üstelik bazı angiosperm taksonları, örneğin bazı Annonaceae’ lerde, ekzin tabakasını polen tüp oluşumundan önce dökerler.

Germinasyon sırasında, genellikle tek bir polen tüp oluşur. Bununla birlikte bazen, tüp benzeri yapılar (‘anlık polen tüpleri’) anter içinde veya su temasından hemen sonra çok hızlı bir şekilde dökülen polenlerde eşzamanlı olarak oluşur. Bunların üretimi pre-germinatif işlem olarak yorumlanır [21] (Şekil 2.11-2.12).



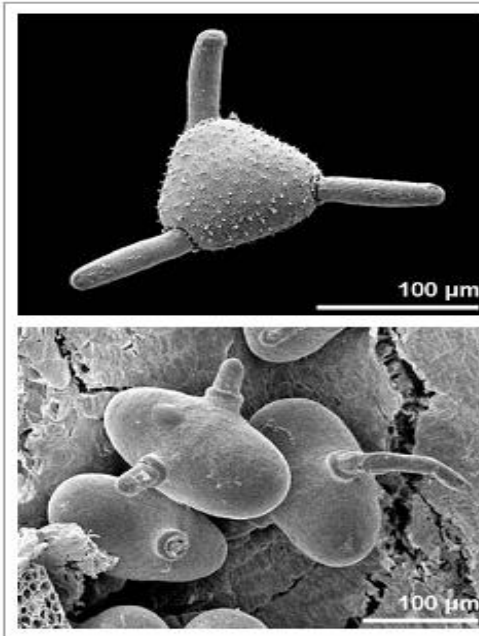
Cephalotaxus sp.

Cephalotaxaceae.

Polen tüp oluşuncaya kadar ekzin dökülür.

Taze polenlerin su içindeki görünümü.

Şekil 2.11. Taksoid polen germinasyonu [21].



Scabio sacaucasica.

Dipsacaceae.

Morina longifolia.

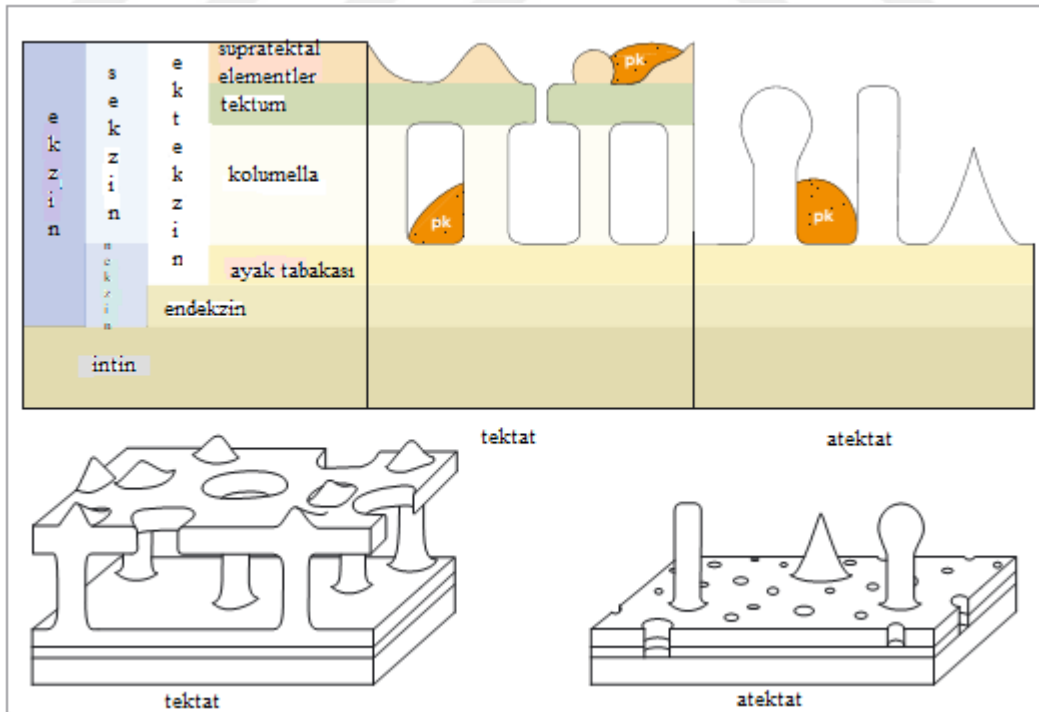
Morinaceae.

Şekil 2.12. Anlık polen tüpleri [21].

2.3.1.4 Polen Duvarı

Genelde tohumlu bitkilerin polen duvarı (sporoderm) iki ana tabakadan oluşur, dıştaki ‘ekzin’ ve içteki ‘intin’ tabakası olmak üzere. Ekzin temel olarak, asetolizis ve parçalanmaya dirençli biyopolimerler olan sporopolleninlerden oluşur. İntin esasen sellüloz ve pektinden meydana gelir. Yaygın şekilde, apertural bölgelerdeki polen duvarı, ekzinöz yapıların azalması veya olağan dışı ekzin, kalın ve sıklıkla iki tabakalı intin ile karakterizedir.

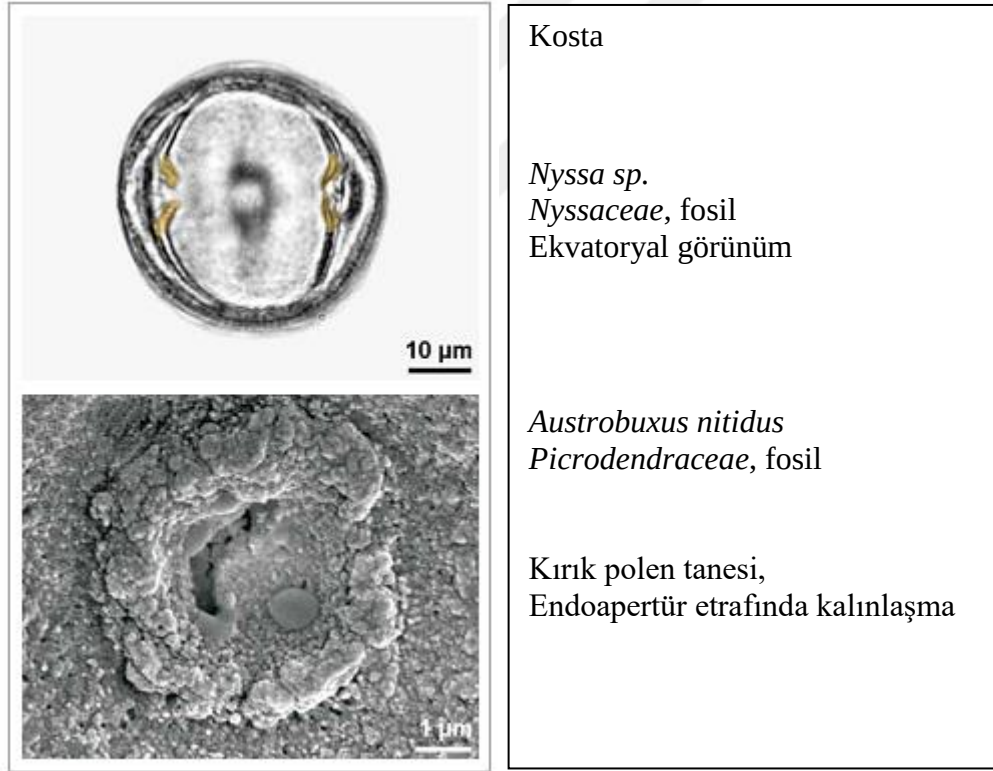
Ekzin içersinde iki tabaka ayrılabilir: içerdeki tabaka ‘endekzin’ ve dışarıdaki tabaka ‘ektekzin’ olmak üzere. Ektekzin bazal kısmında bir ‘ayak tabakası’, bir ‘infratektum’ ve bir ‘tektum’ tabakasından oluşur. Endekzin temelde, yapısal bir organizasyonu olmayan şekilde ve tek tabaka halindedir. Esas yapıdan çok sayıda sapma mevcuttur: tabakalar kalınlaşabilir, yapı değişken veya eksik olabilir. Apertural bölgelerde polen duvarı farklı bir ekzin yapısıyla karakterizedir. Sekzin terimi dışta ve yapısal bütünlüğe sahip kısmı, nekzin terimi de içte yapısal bütünlüğü olmayan ekzin tabakasını ifade eden ışık mikroskopide kullanılan terimlerdir fakat sırasıyla ektekin ve endekzine tam olarak bir uygunlukları yoktur [21] (Şekil 2.13).



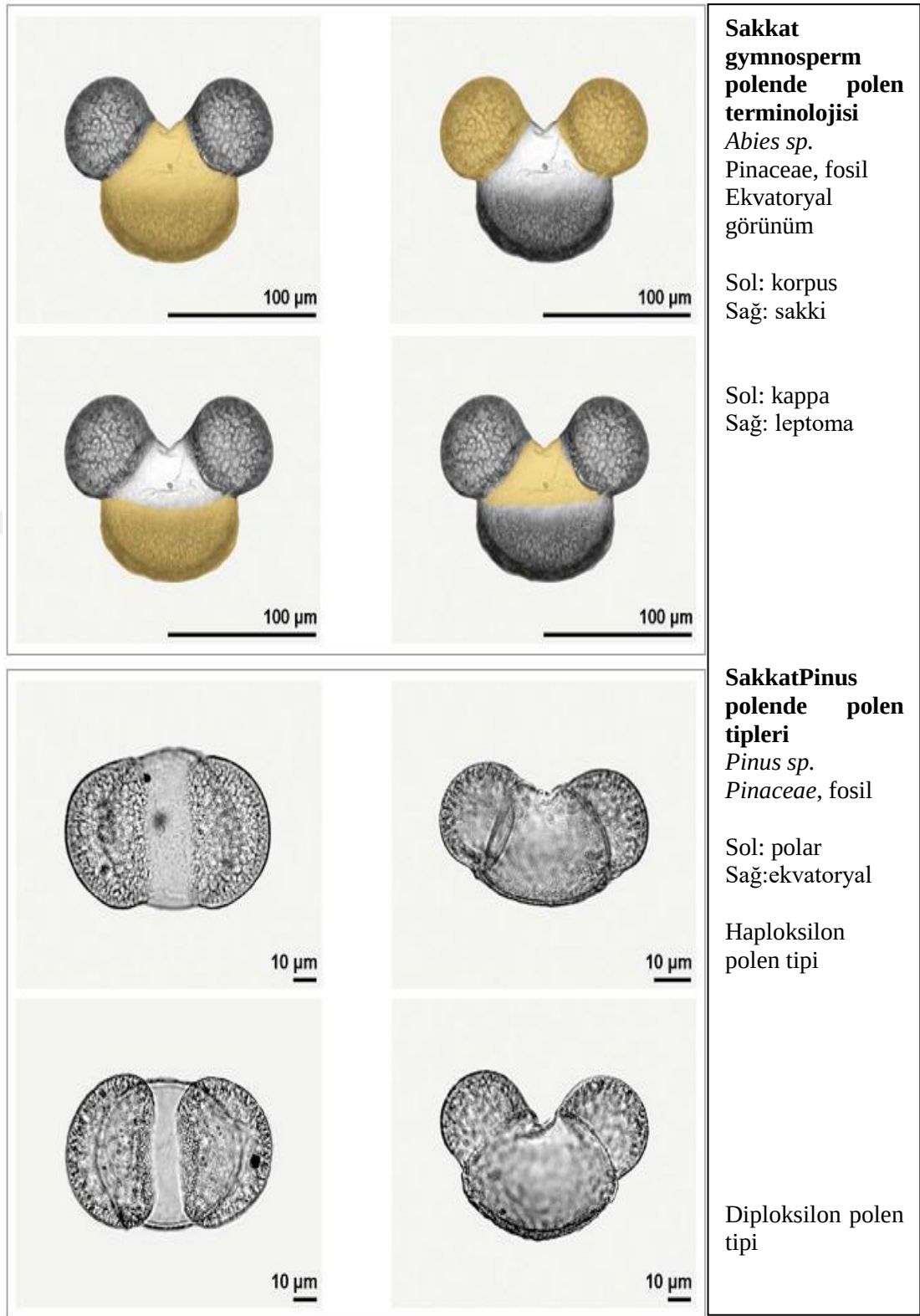
Şekil 2.13. Polen duvarı tabakalanması (pk: polenkit) [21]

Angiosperm Polen Duvarı:

Ektekzin genel olarak tektum, infratektum ve ayak tabakasından oluşur. En dış tabaka, az çok devamlı tektumdur ve supratektal elementlerle kaplı olabilir. İnfratektum un altı kolumellat veya granulardır (kolumellanın ikinci bir tabakası internal tektumdan oluşabilir). Ayak tabakası devamlı şekilde olabilir, olmayabilir veya hiç olmayabilir. Endekzin devamlı veya kesintili, süngerimsi veya sıkı tüm hallerde mevcuttur, sadece apertürlerde bulunabilir veya hatta hiç de bulunmayabilir. Duvar kalınlığında bazı tipik sapmalar özel terimlerle adlandırılır: arkus, annulus, tenuitas ve kosta (nekzin/endekzin sınırının kalınlaşması) [21] (Şekil 2.14). Sakkat polenlerde terminoloji (Şekil 2.15).



Şekil 2.14. Kostal polen [21].



Şekil 2.15. Sakkat polenlerde terminoloji [21].

Değişken ektexzin dizaynının ekstrem örnekleri, eksiklik formlarının neredeyse hiç alt bölüm veya tabakalanmanın olmadığı veya tamamen hiçbir ektexzin tabakasının bulunmadığı masif şekillerini içerir.

Tipik angiosperm apertür kalın, çift katmanlı intin bulundurur [21].

Gymnosperm Polen Duvarı:

Gymnospermiler, sikadları, Ginkgo, koniferler ve Gnetales'i içerir. Gymnosperm polen duvarı angiospermilerden iki yönden farklılık gösterir: 1. Endekzin olgun polen formlarında her zaman lamellattır. 2. İnfratektum asla kolumellat değildir. Dört gymnospor sınıfı apertürlerin özel yapısı bakımından farklılık sergiler.

Gymnosperm polen duvarının temel tabakalanması (ektexzin, endekzin ve intin) angiospermilere özdeştir (identiktir). Tektum tüm sikadlar, Ginkgo ve Gnetaleslerde mevcuttur fakat tüm Coniferlerde bulunmaz, bazı taksonlarda tektum tamamen yoktur (silüete ait elemanlar ayak tabakasında yerleşmiştir). İnfratektum da alveolat veya granulardır ancak asla columellat değildir.

Sakkat polen için özel bir terminoloji uygulanır, örneğin Pinaceae ve Podocarpaceae. Sakkus, sakkat polen tanelerinin merkezi gövdesi olan corpusa izdüşümü uyan geniş bir çukurdur, Polen duvar şeklinin tipik bir sapmasıdır, sadece ekzin ve alveolat altyapıdan oluşur. En sıklıkla, iki sakki mevcuttur, bazı taksonlarda hatta üç tane bile bulunurken bazılarında sadece tek bir tane bulunur. Sakkat polen tanesinin corpus'unun proksimal tarafı için kappa terimi, distaldaki daha ince kısmı için leptoma terimi kullanılır.

Pinus ta sistematik olarak iki polen türü ayırdedilir. Haploksilon polen tipi yaygın olarak yarı sferik hava kesecikleri eklenmiş olması ile karakterizedir, ışık mikroskopisinde leptoma dikkate değer bir şekilde kalınlaşma gösterir (siyah noktalar). Diploksilon polen tipi ise çok daha az ekli sferik hava keseciği ile karakterizedir, leptoma herhangi bir kalınlaşma göstermez [21].

Yapı ve Silüet:

Polen duvarının iç konstriksiyonu onun yapısıdır; polen yüzeyindeki süsleme elemanları silüet (sculpture, oyma, yontma) terimi ile özetlenir. Bununla birlikte, yapı ile silüeti ayırmak her zaman mümkün olmamaktadır (örneğin serbest duran kolumella).

Süslenme:

Palinolojideki bu genel terim yüzey özelliklerinde kullanılır. Tüm süslenme özellikleri (areola, klava, ekinus, foveola, fossula, granulum, gemma, plicae, retikulum, rugula, stria, verruca) geniş morfolojik serilerde aşırılıklara işaret eden yapay kategorilerdir, bu yüzden aşırı değişken olarak kabul edilirler, buna rağmen polen tanımlanmasında önemlidirler.

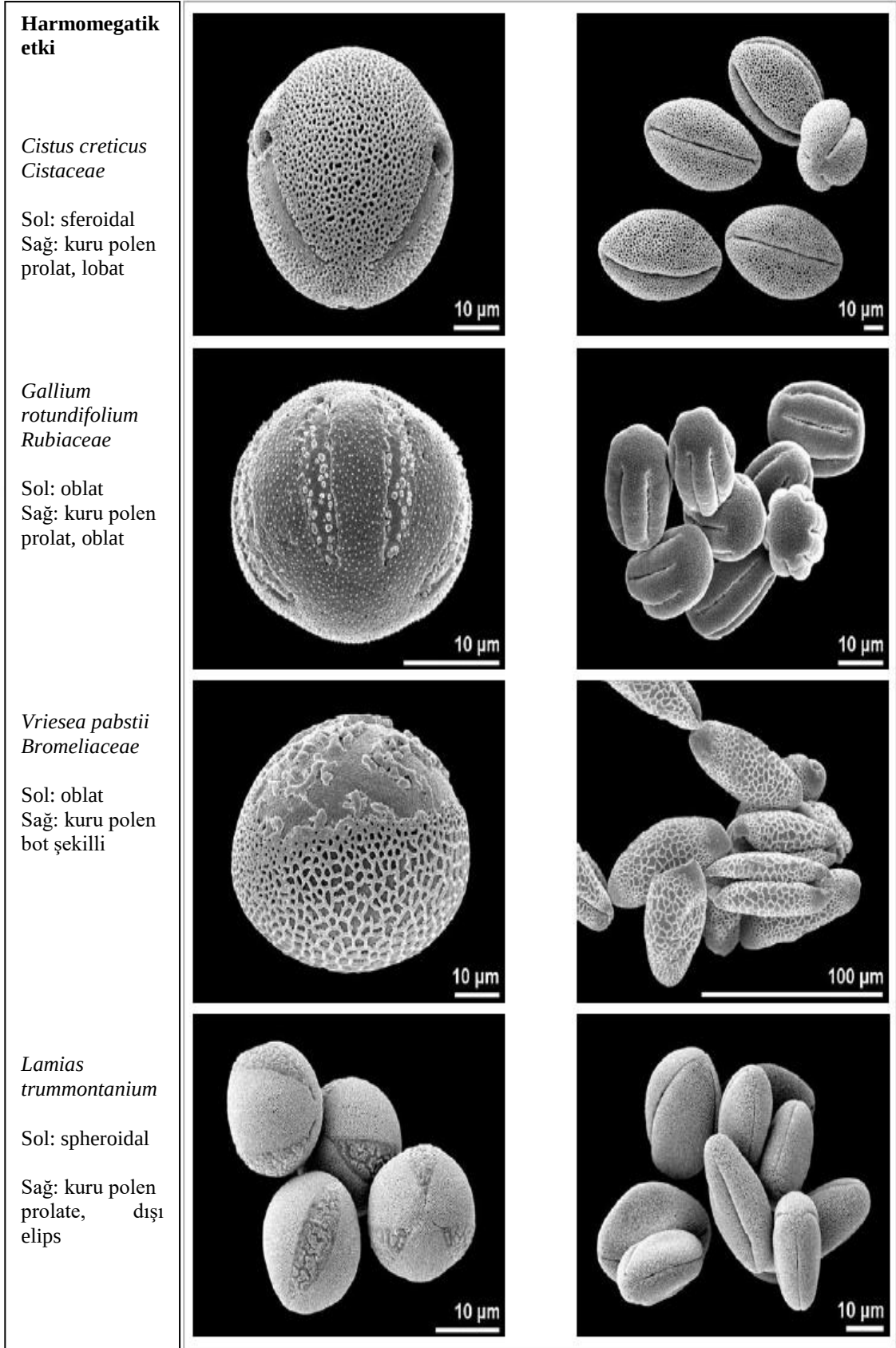
Belirgin bir özelliğin pratik tanımlanması amacı için, süslenme elemanlarının çapı 1 µm' i aşanlar veya aşmayanlar (bunlar mikro ön eki ile işaretlenir) olarak alt bölünmeler yapılabilir.

Bu silüet elemanlarının kombinasyonları yaygın olarak kullanılır. Sıklıkla spesifik bir süslenmenin kelimelerle tanımlanması, süslenme elemanlarının çok yüksek plastisitesinden dolayı zordur. Tipik bir mikroskopik görüntü çok yüksek derecede silüetsel desen (sculptural) elemanları ile karakterizedir.

Polen yüzeyinde süslenme elemanlarının düzenlenmesi çok sıklıkla birbirine benzemez, özellikle apertural bölgelerde. Polenit veya triffin gibi polen kaplamaları süslenmeyi gizleyebilir.

Harmomegati- Harmomegatik Etki (Wodehouse Etkisi):

Tüm canlı polen taneleri suyu absorbe edip salabilirler, böylece, her canlı tane morfolojik olarak iki farklı durumda bulunur: kuru ve hidrate durum. Polen duvarının katlanması (paketlenmesi), hidrasyon veya dehidrasyon sırasında sitoplazma içerisindeki osmotik basıncın değişiminin uygun şekilde düzenlenmesi harmomegatik mekanizmalara örneklerdir [21] (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Harmomegatik etki [21].

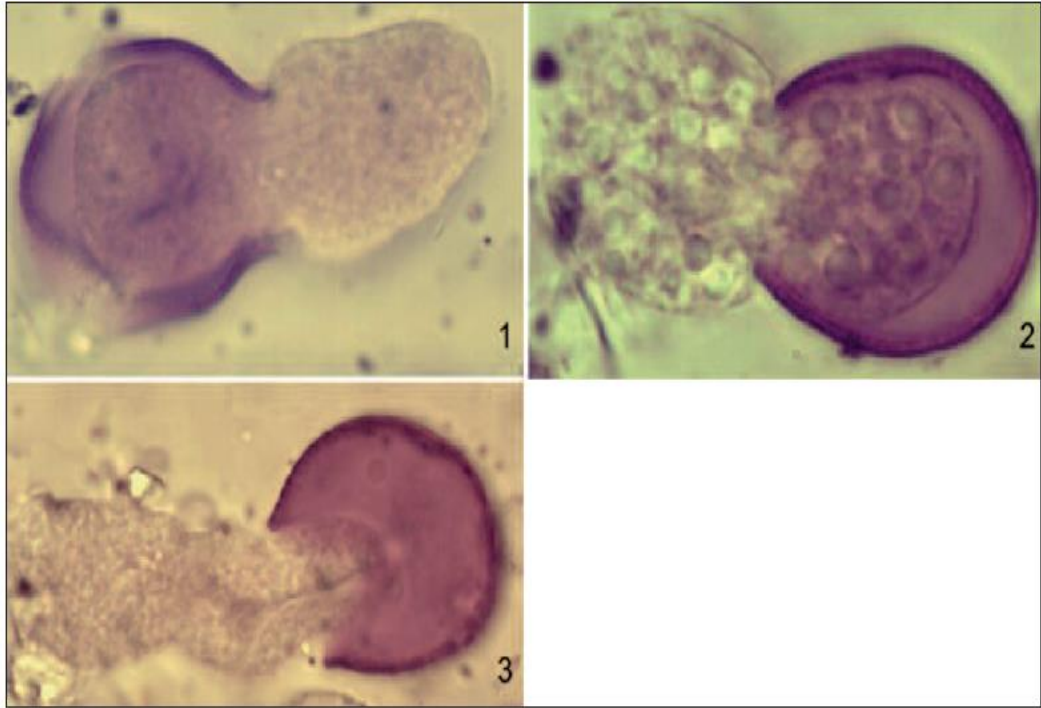
2.3.2 Alerji Etkeni Olarak Polenler

Polen taneleri, bitkilerin erkek üreme materyalini (gameti ve DNA yı) çiçeğin dişi organına taşımada görevli olan yapılardır. Polen tanelerinin, dişi organ üzerine erkek gametin taşınması sırasındaki yolculukta karşılaşılabilecekleri olumsuz koşullara karşı dayanıklı olması gerekir ve polenin çeper yapısı buna uygun adaptasyonlar göstermektedir. Alerjenik etkisi daha çok olan polenler ile diğerleri arasında polenin çeper yapısı, alerjenlerin salınım ve lokalizasyonu, polen tanesi içerisindeki ve üzerindeki depo maddeleri açısından bir takım farklılıklar bulunması, polenlerin alerjik etkisinde bazı konuların önemli olduğunu düşündürmektedir. Polen tanesinin içeriğinin apertürlerden ya da polen tanesinin çeşitli nedenler ile parçalanması sonucu açığa çıktığı bilinmektedir [2].

Polen duvarının yapısı temel olarak ekzin ve intin adı verilen iki tabakadan oluşur. Polenin duvar yapısı kimyasal olarak incelendiğinde intin tabakasının sellüloz, hemisellüloz ve kallozdan oluştuğu görülmektedir. Ekzin tabakası ‘sporopollenin’ adı verilen karatenoid esterlerinin polimerleşmesinden oluşan sıra dışı bir tabakadır. Sporopollenin çok kuvvetli asitlere karşı bile oldukça dayanıklı bir maddedir. Ekzin, ektekin ve endekzin olmak üzere iki tabakadan oluşur. Polenin yüzeyinde ağısı, granüllü, dikensi ya da delikli gibi çok değişik kombinasyonlar gösterebilen çeper süsleri bulunmaktadır. Polen tanelerinin en dış yüzeyini ise ‘polenkit’ adı verilen yağ asitleri ve lipitlerden oluşan bir madde sarmaktadır. Polen yüzeyinde, ekzin tabakasının incelendiği ya da olmadığı ve genetik materyalin dişi bireye aktarım yolu olarak nitelenebilecek polen tüpünün oluştuğu açıklıklar bulunmaktadır. Bu açıklıklara apertür adı verilmektedir. Basitçe söylemek gerekirse apertürler delik, yarık ya da bu ikisinin kombinasyonu şeklinde karşımıza çıkmaktadır [21].

Öncelikle bitkileri tozlaşma şekillerini dikkate alarak polen alerjenitesi açısından değerlendirmek gerekir. Bitkilerde en yaygın görülen tozlaşma şekli rüzgar yoluyla (anemofil) ve böceklerle (entemofil) gerçekleşmektedir. Anemofil ve entemofil tozlaşan bitki grupları arasında polen üretim miktarı, polenin morfolojik yapıları, depo maddeleri ve polen alerjeniteleri açısından farklılıklar bulunmaktadır. Polenleri alerjen olan bitkilerin birçoğu anemofil olarak tozlaşmaktadır. Bitkilerin rüzgarla tozlaşmaya gösterdiği adaptasyon polenin morfolojik karakterleri üzerinde de etkiye sahiptir. Genel olarak anemofil bitkilerin polenlerinin boyutları entemofillere göre

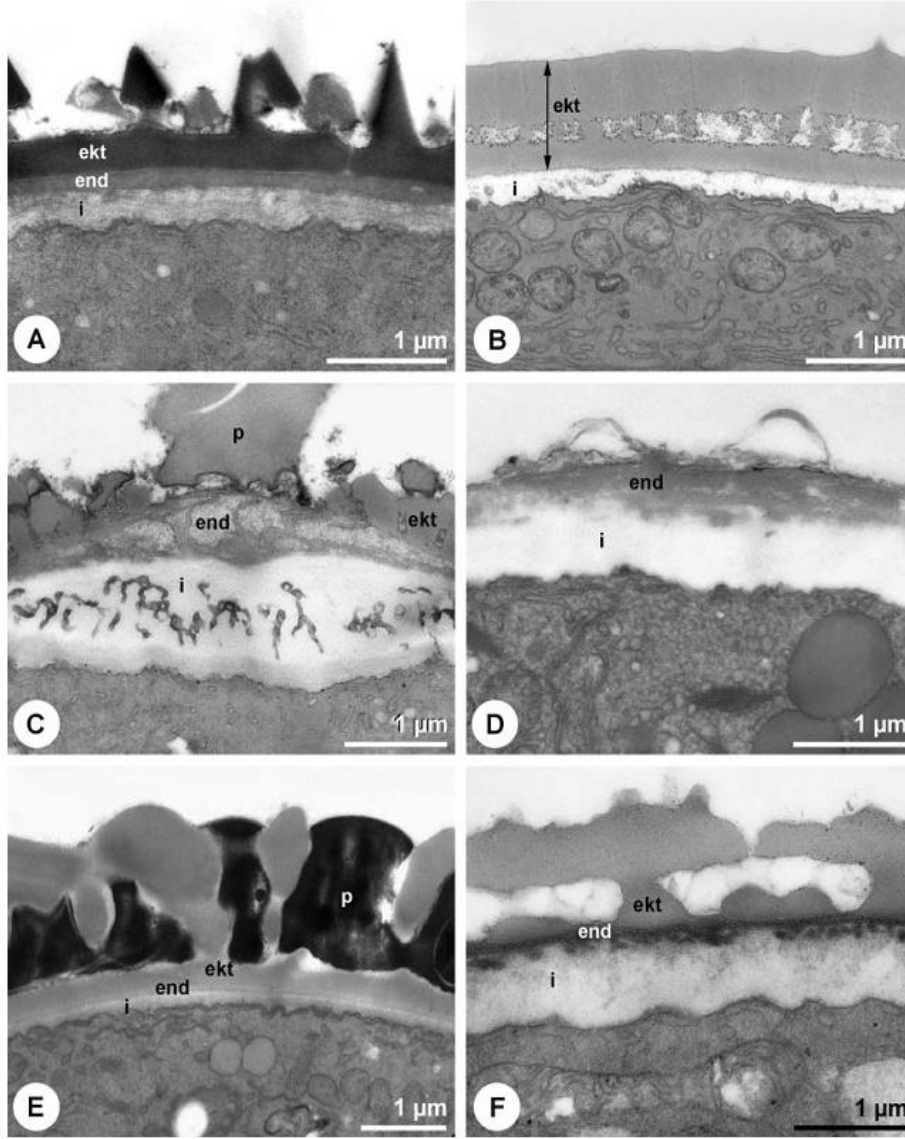
küçüktür, apertürleri por ya da ulkus şeklindedir. Polen yüzeyindeki çeper süsleri basittir ve polenkit ya yok denecek kadar azdır, ya da yoktur. Bununla birlikte yalnız rüzgarla tozlaşan bitkilerin insan immün sistemi için alerjik olan proteinler taşıdığı gibi yanlış bir kanı uyanmamalıdır. Böceklerle tozlaşan bitkilerin polenlerine havada çok az oranda rastlanmaktadır ve bu bitkiler rüzgarla tozlaşanlara oranla çok daha az miktarda polen üretmektedir. Yani aeroalerjen olarak nitelenebilmeleri için gerekli olan tüm kriterleri yerine getirememektedirler. Tüm bu sebeplerden ötürü rüzgar ile tozlaşan bitkilerin insan solunum mukozasına erişmesi ve alerjik reaksiyonlar oluşturmaları çok daha kolay olmaktadır [22] (Şekil 2.17).



Şekil 2.17: Polen içeriğinin apertür (1) ve parçalanmış granüllerden (2,3) dışarı çıkması [2]

Polen alerjenleri moleküler ağırlıkları 5-80 kDa arasında değişen, suda çözünebilen protein ya da glukoprotein yapısındaki maddelerdir. Son dönemlerde yapılan çalışmalar duyarlı bireylerin birçoğunda alerjik reaksiyonlara neden olan majör alerjenlerin büyük kısmının, sitoplazma içerisindeki amiloplastlarda oluştuğunu, bazen organeller ile ilişkili olduğunu ve çok nadir olarak polen duvarında yer aldığını göstermiştir. Major Huş (Betula) polen alerjeni Bet v 1 neredeyse tamamen sitoplazmaya özel iken, minör alerjen Bet v 7 ilaveten polen duvarında da

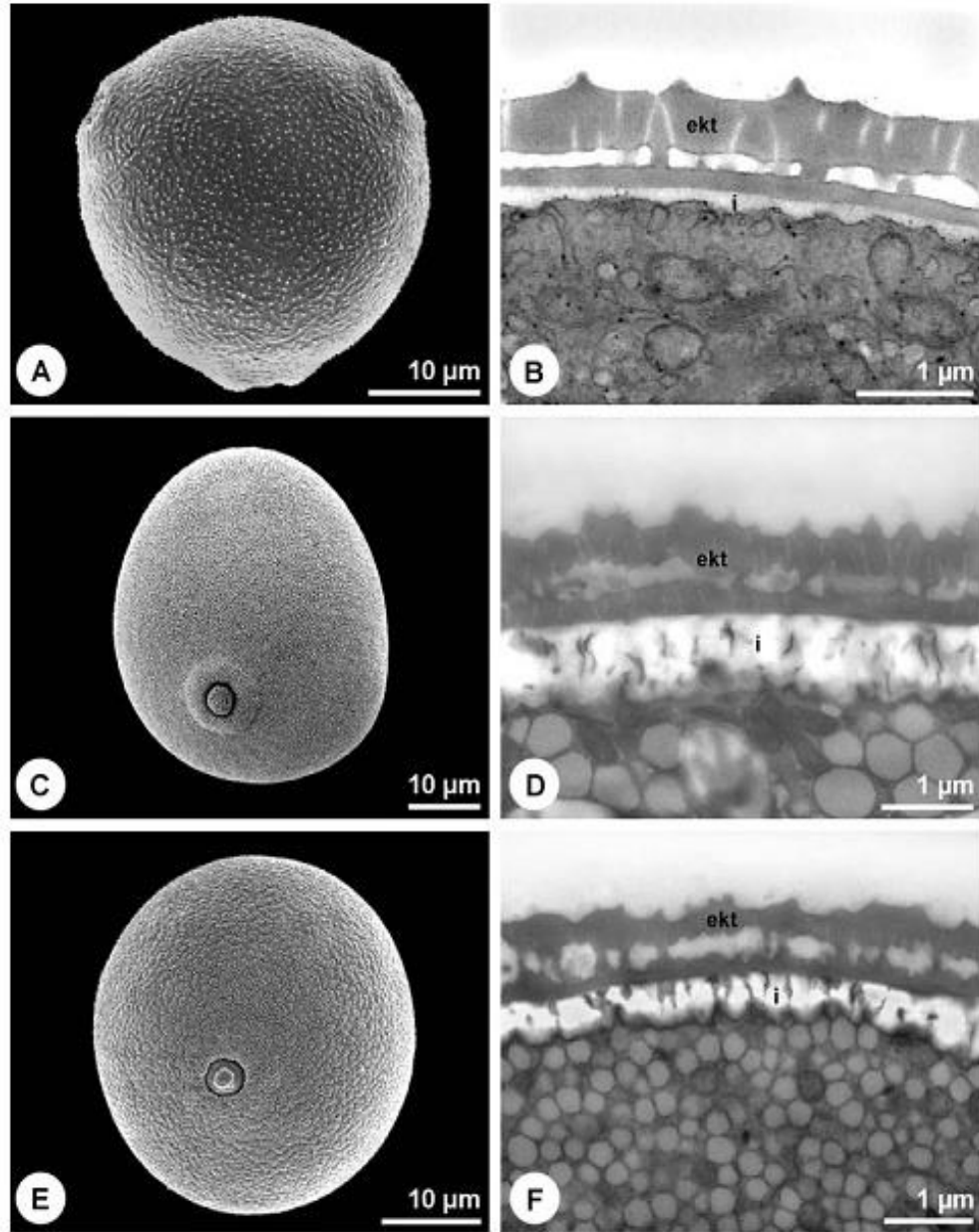
lokalizedir. Alerjenisitesi yüksek bitki polenlerinde endekzin tabakasının olmadığı tespit edilmiştir. Bu alerjik potansiyeli arttıran bir faktördür. Çoğu minör alerjen polenler tipik polen duvar yapısı gösterirken, majör alerjenik bitkilerin çoğunda, birçok fiksasyon metodu kullanılmasına rağmen endekzin tabakasının varlığı tespit edilememiştir. Ektekzin tabakasında ise protein geçişini kolaylaştıran mikro kanalların varlığı dikkati çekmektedir. Yapılan araştırmalarda endekzin tabakasının bulunması polenin alerjenik protein üretimini etkilememektedir. Ancak bu proteinlerin salınımı endekzin tabakası olanlarda olmayanlara göre anlamlı şekilde azdır. Chenopodiaceae familyası üyelerinde de endekzin ya yoktur ya da çok zor fark edilir. Endekzin tabakasının alerjen proteinlerin salınımında bariyer rolü olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte çok alerjik olan Olacaeae ve Poaceae gibi familyalarda ise endekzin tabakasının var olduğu gözlenmiştir. Ancak bu ailelerde endekzin sıkı bir yapıda değildir. Lamelli bir yapıya sahiptir ve endekzinden ektektine uzanan mikrokanallara sahiptir. Bu kanallar yolu ile alerjik proteinler dışarıya kolaylıkla yayılabilirler [22] (Şekil 2.18).



Şekil 2.18: Farklı duvar karakteristikleri gösteren polen taneleri [22] **A.** *Salix fragilis*. Tipik polen duvarı organizasyonu, intin, kompakt endekzin ve kolumelat ektekin ile. **B.** *Corylus avellana*. Polen duvarı intin ve ektekin içermektedir. Endekzin tespit edilebilir değildir. Ektekinde mikrokannallar mevcuttur. **C.** *Fraxinus excelsior*. Apertural bölgenin intin ve endekzinde mikrokannallar vardır. **D.** Apertural bölgede endekzin laminat/granulozdur. **E.** *Syringa vulgaris*. Ektekin kavimleri elektron yoğun polenkit ile kapatılmıştır. Endekzin kompakttır. **F.** *Quercus robur*. Ekzinde küçük elektron lusen polenkit bulunmaktadır. Endekzin kompakttır. **A-F.** Transisyonel elektron mikroskopisi (TEM), (ekt=ektekin, end=endekzin, i=intin, p=polenkit)

Diğer polen duvarı tipi kompakt bir endekzinin var olmaması ile karakterizedir. Betulaceae'nin de dahil olduğu major alerjenik bitkilerin büyük bir kısmı, devamlılığı olmayan, zorlukla tespit edilen veya tespit edilemeyen endekzini olan bu tiptendir. Yine ekzin içerisinde, incelenen Betulaceae ve Poaceae de transizyonel elektron mikroskopisi ile mikrokanallar gözlenmiştir. Alerjik polen taneleri genellikle oldukça küçüktür (20-40 µm), Urticaceae polenleri 15 µm çapında ve ortalamadan daha küçüktür. 50-70 µm çapında alerjik polenlerde mevcuttur. Alerjik bitkilerin polenleri sıklıkla yuvarlak apertürlere sahiptir ve ekzin basitçe oymalanmıştır. İlgili taksonlar içindeki polenlerin süslenmeleri az çok uniformdur ve regulat, granulat, mikroekinat ve çok nadiren ekinat veya retikülat oyma (sculpture) elemanlarını içerir. Polenkit gibi polen kaplamaları anemofilöz türlerde böceklerle poline olan bitkilerdeki gibi çok bol değildir, bunlarda neredeyse sıklıkla polen tanesinin yüzeyi tamamen kaplıdır. Ne incelenen Betulaceae, Poaceae, Fagaceae ne de Urticaceae polenleri herhangi bir tür aşık polen kaplamasına sahip olmamasına rağmen küçük bir miktar elektron lüsent polenkit ara sıra gözlenebilir. Dikkate değer miktarda polenkit Oleaceae, Salicaceae ve Chenopodiaceae taksonlarında bulunabilir, ekzin kavitelerinde primekzin-matriks de depolanır. Alerjik polenlerde çok yüksek oranda nişastanın depolandığı tespit edilmiştir [22].

Tek bir polen tanesi onlarca farklı tipte alerjen içerebilmektedir. Örneğin Graminae polenlerinde 11, *Olea europaea* L. poleninde 10, *Parietaria judaica* L. ise 9 farklı çeşit alerjen tespit edilmiştir [8,23]. Proteinlerin alerjenitesi mukozal bariyerleri aşmasına, çözünübilirliğine ve molekül büyüklüğüne bağlı olarak değişiklik göstermektedir [9]. Yapılan son çalışmalarda, major alerjenlerin çoğunun polen tanesi içerisinde sitoplazmada, amiloplastlarda, bazen hücre organellerine bağlı olarak, çok nadiren sitoplazmada yalnız başına ya da polen duvarına bağlı olarak bulunduğu gösterilmiştir [24] (Şekil 2.19).



Şekil 2.19: Kompakt veya tespit edilebilir endekzini olmayan polen duvarı [22] **A.** *Betula sp.* Huş poleninin genel görünümü. **B.** *Betula sp.* Polen duvarının çapraz kesiti. Ektekzinde mikrokanallar mevcuttur. **C.** *Secale cereale*. Çavdar polen tanesinin genel görünümü. **D.** *Secale cereale*. Polen duvarının çapraz kesiti. Ektekzinde mikrokanallar mevcuttur. **E.** *Pheleum pratense*. Çim poleninin genel görünümü. **F.** *Pheleum pratense*. Polen duvarının çapraz kesiti. Ektekzinde mikrokanallar mevcuttur. **A, C & E.** SEM. **B, D & F.** TEM (ekt=ektekin, i=intin)

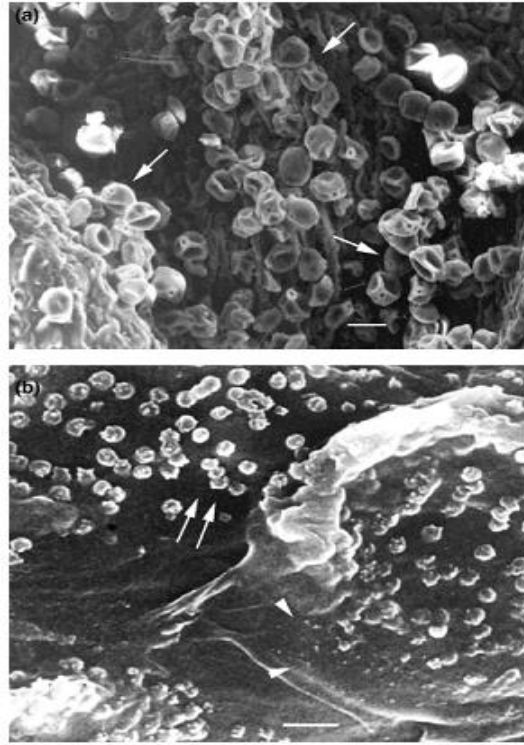
Polen tanelerinin hidrasyonundan hemen sonra yapılan gözlemlerde sitoplazma içerisinde bulunan proteinlerin hidrasyonu takip eden dakikalar içinde salındığı, polen duvarında büyük oranda bulunabildiği ve eksternal eksudatlarda 0,5-1 dk da tespit edilebildikleri gözlemlenmiştir [25-26]. Bu çalışmaların sonuçları, polenler içerisinde bulunan allerjenik proteinlerin fertilizasyon ve tozlaşmada görevli oldukları düşüncesini desteklemektedir. Polen-stigma uyumu ve tanınması, polen tüpü oluşumu ya da polen tüpü oluşmadan önce stigmadaki doku değişikliklerinde bu alerjen proteinlerin önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Bu proteinlerin polen tanesinden salınımı nemli ve yapışkan bir özelliği stigmaya benzer özellikler gösteren mukoza ile polenler temas ettiği zamanda oluşur. Bu durum alerjik rinit semptomlarının ortaya çıkması ile sonuçlanır [27].

Entemofil bitkilerin polenlerinde, anemofil bitki polenlerinin aksine nişasta granülleri yerine yağlar depolanmaktadır. Rüzgarla tozlaşan bitkilerin tozlaşması biotik bir pollinatöre bağlı olmadığı için yağlar gibi yaşamsal önemi olan maddeleri depolamaya gereksinim duymazlar. Nişastanın üretimi ve depolanması yağlara oranla daha ekonomiktir. Yani nişasta depolanması anemofil bitkilerin gösterdiği diğer bir adaptasyon mekanizmasıdır. Amiloplastlar allerjenik proteinlerin sitoplazma içinde depolandığı esas bölgelerdendir [28].

Bitki polenlerinin pek çoğunda 'polenkit' adı verilen materyal polen yüzeyini örtmektedir. Özellikle böceklerle tozlaşan entemofil bitkilerde yoğun olarak bulunan polenkit adlı maddenin polenler için, polen tanesini su kaybı ve ultraviyole radyasyondan korumak, böcekler tarafından kolayca görülebilmesini sağlamak, polenlerin dağılımını kolaylaştırmak, polen içerisine virus, bakteri ve mantar sporlarının girişini engellemek gibi birçok fonksiyonu vardır. Lipidik ve hidrofobik karakterdeki bu madde suda çözünebilir proteinler için bir bariyer görevi yapmaktadır. Bu sayede allerjenik proteinlerinde içinde bulunduğu tüm suda çözünür proteinler kolayca dış ortama geçemezler. Araştırmalar major allerjenik proteinleri bulunduran bitki polenlerinin çoğunun homojen bir polenkite sahip olmadığını göstermiştir. Bu durumun alerjen proteinlerin dış ortama salınımını kolaylaştıran bir durum olduğu ortaya konulmuştur [22].

Atmosferik alerjenler yani aeroalerjenler için önemli olan bir diğer yapı da 'orbikül' ya da 'ubish cisimciği' olarak adlandırılmaktadır. Orbiküller polen ekzini ile birlikte

gelişen sferik şekilli partiküllerdir. Birçok gelişmiş bitkinin anterinde tespit edilmişlerdir. Fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. Genellikle çok yüksek miktarlarda üretilmektedirler, yalnızca birkaç mikron çapındadırlar ve alerjenik proteinler içermektedirler. Orbiküllerin dış duvarı da polen duvarının dış kısmı olan ekzinin hammadresi olan sporopolleninden yapılmıştır. Sonuç olarak orbiküllerin yapısı polen tanelerine çok benzerdir, daha küçük sitoplazmaya sahiptirler. Polenler atmosfere dağıldığı sırada orbiküllerde polenlere tutunmuş olarak atmosfere salınırlar ve boyutları akciğerlerin en derin noktalarına gidebilecek kadar küçük olduğundan alerjik rinitte çok önem taşıyabilirler [29]. Alerjenik potansiyeli çok yüksek olan bazı bitkilerde orbiküllerin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 2.20) (Tablo 2.3).



Şekil 2.20: Huş ağacı erkek çiçeği içinde yerleşmiş yapıların taramalı elektron mikroskopik görüntüleri. (a) Oklar polen tanelerini göstermektedir, bar = 20 μ m. (b) Çift ok, orbiküller; okbaşıları, orbiküller arası yapılar [40].

Tablo 2.3. Major alerjen bitki ailelerin polen duvar yapısı, depo materyali ve orbikül durumu [22]

Familya	Alerjenisite	Polen kaplaması	Polen duvarı	Depo materyal	Orbikül
Asteraceae	Çok yüksek	Yok	Endekzin lamine	Yok	Yok
Betulaceae	Çok yüksek	Nadiren non elektron dens polenkit	Endekzin yok, ektzekzinde mikrokanallar var	Yok	Var
Chenopodiaceae	Orta	Polenkit, primekzin-matriks	Endeksin kesintili ya da yok	Niştasta	Var
Oleaceae	Yüksek	Polenkit	Endekzin kompakt, apertürlerin altında mikrokanallar var	Niştasta	Yok
Poaceae	Çok yüksek	Nadiren non elektron dens polenkit	Endekzin yok, ektzekzinde mikrokanallar var	Niştasta, polisakkarit vezikülleri	Var
Urticaceae	Yüksek	Yok	Endekzin ince ve zorlukla görünür.	Niştasta	Var

Küresel ısınma, polen alerjenleri ve alerjenitesi üzerinde etkiye sahiptir. Son dönemlerde yapılan çalışmalar, iklimdeki değişikliklerin atmosfere polen salınımını etkilediği kadar polenlerden alerjen protein salınımını da etkilediğini göstermiştir. Birçok araştırmacı atmosferdeki polen sayısı ve alerjen içeriği arasındaki farklılıkları ortaya koyan çalışmalar yapmışlar, konuyla ilgili hipotezler ortaya sürmüşlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda polenlerden alerjen salınımının yıllara ve farklı coğrafik bölgelere göre değiştiğini göstermiş ve çalışma sonuçlarına göre yüksek, sıcak ve kurak bölgelerde aeroalerjen salınımının daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır [30]. Polenlerin iklim değişimine karşı her yıl bir önceki yıldan daha fazla miktarda alerjeni atmosfere salarak reaksiyon gösterdiği tahmin edilmektedir. Ancak iklimdeki değişikliklerin polenlerin morfolojisini etkileyip etkilemediği veya etkiliyorsa ne kadar etkilediği konuları, üzerinde çalışmaların yapılmasını gerektiren, henüz aydınlatılamamış konular olarak yanıtsız kalmaya devam etmektedir. En çok

alerjenik ağaç poleni Kuzey, Orta ve Doğu Avrupa da Huş ağacı (Birch-Betula) tarafından, Akdeniz bölgesinde Zeytin (*Olea europaea*) ve de Servi (Cypress-*Cupressus*) tarafından üretilir. Huş ağacının çiçeklenme dönemi Nisan ayı ortasında başlamaktadır. Zeytin poleni alerjik rinitin İspanya, Güney İtalya, Yunanistan ve Türkiye deki en önemli sebebidir [12]. Fagales takımına ait ağaç polenleri, ılıman iklim kuşağında Kış/İlkbahar aylarının ana alerjik rinit sebebidirler. Fagales takımı; Betulaceae, Casuarinaceae, Fagaceae, Juglandaceae, Myricaceae, Nothofagaceae, Rhoipteleaceae ve Ticodendraceae olmak üzere 8 aileden oluşmasına rağmen Betulaceae (Alnus, Betula, Carpinus, Corylus, Ostryopsis ve Ostrya) ve Fagaceae (Fagus, Castanea ve Quercus) ailelerinin üyeleri en sıklıkla alerji ile ilgilidirler [12]. Tiliaceae ailesi ile alerjiye sıklıkla rastlanılmamaktadır.

2.3.3 Alerjeniteden Sorumlu Polen Bileşenleri: Alerjenik Proteinler

Polen tanecikleri erkek gametleri (veya bunların progenitor hücrelerini) taşır, fertilizasyon için havaya salınırlar. Polen tüm mevsimlerde hava florasının doğal bir üyesidir. Ilıman iklimde özellikle bahar ve erken yaz aylarında çok miktarda bulunurlar. Duyarlı kişiler polen yoğun havayı soluduklarında alerjik rinit ve astım semptomları gelişebilir. Bu semptomlar belirli protein ve glikoproteinlerin varlığında tetiklenir. Alergen olarak davranan bazı polen türlerinde, insan immun sistemi ile etkileşim alerjik yanıtı oluşturur. Neden tüm hava yoluyla yayılan polenlerin değil de sadece bazı tür polenlerin alerjen olarak tabir edilen yüksek oranda interaktif moleküller içerdiği araştırılırken, bu alerjenlerin polen tanesinin yüzeyine mobilize olabildikleri tespit edilmiştir. Bunlar çift fonksiyona sahip moleküllerdir. Bir yandan, bu stratejik yerleşimde erkek partner olarak dişi stigma ile olan intersellüler tanınma reaksiyonlarına katılır; ve diğer yandan da insan immun sistemi ile etkileşim içine girerler. Yani alerjen proteinler, alerjik reaksiyonları oluşturan Ig E üretimini sağlayan proteinlerdir. Diğer bir deyişle vücutta Ig E üretimine sebep olmayan veya bu antikorlar ile etkileşime giremeyen proteinler alerjen olarak adlandırılmazlar [31].

Alerjenler, duyarlı bireylerde oluşturabildikleri alerjen immun yanıtın düzeyine göre sınıflanırlar. Bir alerjen, köken aldığı kaynağa duyarlı bireylerin en az %50 sinde alerjik Ig E yanıtına neden olduğunda ‘major alerjen’ olarak adlandırılırken, %10 dan az bireyde alerjik Ig E yanıtına neden olan alerjenler ‘intermediate veya minör alerjenler’ olarak adlandırılır [1, 32]. Major alerjenler mukoza ile temaslarından

sonraki saniyeler içersinde Ig E aracılı alerjik reaksiyonlara neden olabilirler. Alerjenler antijenik özellikleri olan, organizmaya ait olmayan (non self) proteinlerdir. Sadece Ig E yanıtını ortaya çıkarmakla kalmazlar, iki sitotropik Ig E molekülünün FcεRI resptörleri yoluyla köprülenmesi mast hücreleri ve bazofilik hücrelerden mediatör salınımını da tetiklerler. Bunun anlamı alerjenin en az 2 Ig E reaktif epitopa sahip olması gerektiğidir. Pratikte alerjenler Ig E reaktivitelerine göre tanımlanırlar, pek çok amaç için böyle bir tanım yeterli olmaktadır [1]. Alerjen isimleri, kaynağının bilimsel isminin kısaltması (tür: 3 harf; cins: 1 harf) ve arabik numaradan oluşur. Örneğin Der p 1 ev tozu akarı *Dermatophagoides pteronyssinus*' un, Bet v 1 *Betula verrucosa*' nın tanımlanmış ilk alerjenidir. Orjinal olarak yeni alerjenlere ardışık numaralar verilmiştir. Arabik numaralar keşfedilme ve tanımlanma önceliğine göre verilir, daha önce farklı türlerden tanımlanan alerjenlerle yapısal olarak homolog ve immunolojik olarak çapraz reaktivite gösterenlere var olan numaralar verilir; örneğin çimen poleninde çimen grup 1 ve 5 alerjenleri bulunur. Son on yıl boyunca diziliş datasındaki artış ve biyoinformatikteki gelişmelerle birlikte alerjenleri protein aileleri içinde sınıflamak mümkün olmuştur. Bu protein aileleri evrimsel olarak ilişkili, benzer diziliş ve yapıya sahip olan ve bazı durumlarda çapraz reaktivite gösteren proteinlerden oluşurlar [1, 32].

Polen alerjenleri, moleküler ağırlığı 5 ile 80 kDa arasında olan suda çözünebilen stabil protein veya glukoproteinlerdir. Diziliş karşılaştırması, tohumlu bitkilerde, patogenezisle ilişkili proteinler, profilinler, expansinler ve kalsiyum bağlayan proteinlerin de dahil olduğu alerjen protein aileleri, 2615 protein ailesinin sadece 29'unda yer almaktadır. Sonuç olarak, pek çok alerjen, çapraz reaktivite olarak bilinen fenomene neden olan dikkate değer diziliş benzerliği gösterirler. Çapraz reaktivite, daha önce maruziyet olmaksızın, proteinlerin Ig E epitoplarının benzerliği nedeni ile kaynağına yönelik alerjik reaksiyonların gelişmesine neden olur. Oldukça yaygın bir örnek, polen alerjenlerinin belirli besin proteinlerine benzerliğinden kaynaklanan oral-alerji sendromudur. Burada Huş poleni ve Rosaceae meyvesi arasında olan protein benzerliğinin Bet v 1 ile ilgili alerjenler ve profilinler sebebiyle olduğu bulunmuştur. Çimen polen grup 1 alerjenleri de %50' den fazla diziliş benzerliği gösteren çimen türleri arasında geniş çapraz reaktivite gösterir [22].

Tek bir polen türü genellikle çeşitli alerjenler içerir. Çimen poleninde 11 grup alerjen, *Betula pendula* Roth da 8-10 grup alerjen, *Olea europa* L. poleninde 10 grup

alerjen, *Ambrosia artemisiifolia* L. poleninde 6 grup alerjen, *Parietaria judaica* L. poleninde en az 9 grup alerjenik protein içeriği gösterilmiştir. Bazı protein grupları, sensitize bireylerde diğer protein gruplarına nazaran Ig E tarafından daha sıklıkla tanınır. Major alerjenler, belirli bir polene karşı alerjik hastaların en az %50'si tarafından Ig E antikor üretimi yoluyla tanınırken, %50' den az Ig E bağlanması minör alerjenleri belirler. Çimen polenin major grup 1 ve 5 alerjenleri ile sensitizasyonun prevalansı %90' a kadar çıkabilirken minör grup 12 alerjen (profilin) ile Ig E bağlanmasının sadece %15-30 arasında olduğu rapor edilmiştir [22].

Aşırı çözünabilirlik ve yüksek erişilebilirlik, hepsi birlikte stabilite ve boyut, mukozal bariyerleri geçmeleri ile beraber proteinlerin alerjenitesini belirler. Hidrasyonu ile birlikte hareketlenmesi ve hızla yer değiştirmesi geleneksel sulu fiksasyon metodları ile polen tanesi içerisindeki alerjenlerin yerinin tespitini zorlaştırır. En son, kriyofiksasyon gibi sıkı susuz fiksasyon, major alerjenlerin büyük kısmının kuru polen içerisinde sitoplazmada, amiloplastlar içinde olduğunu, bazen organeller ile ilişkili olduğunu ve sadece nadiren polen duvarında bulunduğunu göstermiştir. Örneğin çeşitli çalışmalar, major Huş polen alerjeni Bet v 1'in neredeyse sitoplazmaya özel olduğunu, sadece sitoplazmada bulunduğunu, minör alerjen Bet v 7'nin ek olarak polen duvarında lokalize olduğunu göstermiştir. Hidrasyondan sonra bu proteinler dakikalar içinde salınırlar ve sadece 0,5-1 dk sonra büyük bir oranda polen duvarında ve dış salgılarda (eksternal eksüdatlarda) bulunabilirler. Bu hızlı aktivasyon ve salınımdan dolayı, polen alerjenlerinin çoğunun polen-stigma tanınması, polen tanesi ve uygun stigma arasında adezyon, transport, polen tüp formasyonu veya polen tüp penetrasyonundan önce maternal doku modifikasyonunun da dahil olduğu fertilizasyon işlemlerinde rol oynadığı genel olarak kabul edilir. Bu proteinlerin salınımı, polen tanesi, stigma çevresini taklit eden nemli ve sıcak mukoza ile temas ettiğinde de gerçekleşip alerjik rinit semptomlarının gelişmesine neden olur. Alerjen salınımının diğer bir yolu da sitoplazmik içeriğin apertürlerden veya suyla temas eden polen tanesinin rüptürü sonucu dışarıya çıkmasıdır [22].

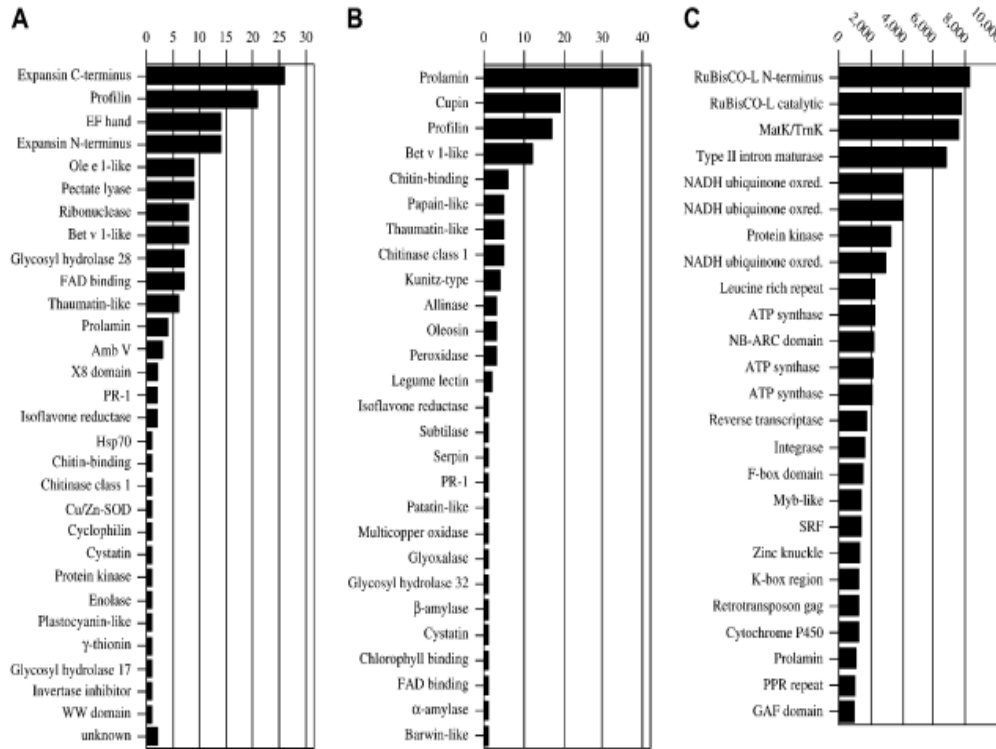
Son 20 yılda polen türevi alerjenik proteinlerin moleküler özelliklerinin açıklanmasında büyük gelişmeler yaşanmıştır. Çeşitli bitki türleri içinde, çeşitli protein ailelerine ait polen alerjenleri tanımlanmıştır. Polen alerjenleri üzerine geniş miktarda bilgi Allergome (www.allergome.org) veya İmmunoloji Dernekleri

Uluslararası Birliği Alerjen Adlandırma Alt Komitesinden elde edilen alerjenler resmi listesi (Official List of Allergens from the International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-Committee) (www.allergen.org) gibi alerjen veri tabanlarından sağlanabilir. Bununla birlikte, polen alerjenlerinin sistematik bir sınıflandırması (taksonomik ve moleküler yaklaşımları içeren) şimdiye kadar uygun şekilde yapılamamıştır. Polen alerjenleri arasındaki taksonomik ve moleküler ilişkilerin böyle bir derlemesi, klinik pratik, temel araştırmalar ve düzenleyici kaynakça olarak çeşitli alanlarda değerli bir araç olabilir [11].

Polen alerjenleri, 2615 tohumlu bitki protein ailesi (Pfam veri tabanına göre totalde 7868 protein ailesi) içinde sadece 29 protein ailesinde sınıflandırılmışlardır. Ekspansinler, profilinler ve EF hand domain içeren kalsiyum bağlayan proteinler major polen alerjen ailelerini oluştururlar oysaki en çok bitki besin alerjeni prolamin, kupin veya profilin ailelerine aittir. Ole e 1-benzeri, pektatliyz, ribonükleaz, Bet v 1 benzeri, glikozil hidrolaz 28, FAD bağlayan domain, thaumatin benzeri, prolamin, Amb V alerjen protein aileleri daha az sayıda alerjen protein içerirler. Polen alerjenleri oldukça sık görülüyor olabilir (örneğin profilinler), sadece belirli bitki ailelerinde bulunabilirler (örneğin pektat liyz) veya tek bir taksona sınırlı olabilirler (örneğin thaumatin benzeri proteinler). Alerjenik bitki profilinleri, birbirleri arasında %70-85 diziliş özdeşliği gösteren, yüksek oranda korunmuş bir aileyi oluştururlar fakat insanında dahil olduğu diğer ökaryotların non alerjenik profilinleri %30-40 oranlarında, düşük özdeşlik gösterirler. Yine benzer olarak, alerjenik polkalsinler %64-92 dizi özdeşliğine sahiptirler fakat daha düşük özdeşlik %39-42 oranları ile vegetatif bitki dokuları ve insanların non alerjenik kalmodulin ve kalmodulin benzeri proteinleri arasında mevcuttur [11].

Allergome veri tabanında, literatürde alerjik reaksiyonları tanımlanmış polen içeren 178 bitki türü listelenmiştir. Bu bitkiler 44 taksonomik aile ve 29 takıma aittir. Bu ailelerden sadece 6 tanesi türlerin yarıdan fazlasını içerir. Alerjenik polen türlerinin yaklaşık $\frac{1}{4}$ ' ü çimen polenidir (Poaceae, 43 tür); diğer çok yaygın aileler Cupressaceae (Servis ailesi, 16 tür), Betulaceae (Huş ailesi, 12 tür), Arecaceae (Palm ailesi, 8 tür), Asteraceae (Ambrosia ailesi, 8 tür) ve Fabaceae (baklagiller, 7 tür) aileleridir. Çok miktardaki alerjik polen türünün tersine, sıralanmış polen alerjenlerinin taksonomik dağılımı 14 taksonomik aileden 52 tür ile sınırlıdır. Çok

miktarda alergen bulunduran bitki aileleri Poaceae (15 türde 71 alergen), Cupressaceae (8 türde 20 alergen), Asteraceae (5 türde 13 alergen), Betulaceae (5 türde 13 alergen) ve Oleaceae (4 türde 12 alergen) şeklindedir (Şekil 2.21) (Tablo 2.4).



Şekil 2.21: Polen ve bitki besin alergenlerinin protein aile dağılımı [11] Allergome veri tabanından elde edilen alergenler Pfam protein ailesi veri tabanıyla karşılaştırılmıştır. Sıralanmış polen ailelerindeki protein sayıları **A**, 29 aile; **B**, bitki besin alergenleri 27 aile ve tüm tohumlu bitki proteinlerinin 25 en çok yaygın ailesi (totalde 2615 aile içinden) **C**.

Tablo 2.4: Polen alerjen ailelerinin taksonomik dağılımı, alerjen protein sayıları [11]

Family	Expansin Total	Expansin C-term	EF Profilin	EF hand	Expansin N-term	Ole e 1-like	Pectate lyase	Ribonu- lease	Bet v 1-like	Glyco hydr	FAD binding	Thaumat	Prolamin	Amb V
Cupressaceae	20			1			7			3		6		
Arecaceae	1		1											
Poaceae	71	26	6	2	14	3		8		2	7			
Asteraceae	13		3				2						1	3
Plantaginaceae	1					1								
Oleaceae	12		1	3		4								
Chenopodiaceae	4		1	1		1								
Brassicaceae	8		2	4						1			1	
Betulaceae	13		2	3					5					
Fagaceae	3								3					
Platanaceae	2									1				
Cannabaceae	2		1											
Urticaceae	3		1										2	
Euphorbiaceae	2		2											

Polen ailesi ve taksonomik aile şeklinde polen alerjenlerinin düzenlenmesi, polen alerjen ailelerinin taksonomik dağılımındaki büyük farklılıkları ortaya çıkarır. Her yerde yaygın polen alerjen aileleri neredeyse tüm bitki ailelerinde bulunduğu incelenerek bulunmuş olan profilinler ve EF hand içeren kalsiyum bağlayan proteinlerdir. Birçok alerjen ailesi, az sayıda taksonomik olarak çeşitli bitki ailesinden meydana gelmiştir, örneğin Ole e 1 homologları, pektat liyazlar, poligalakturonazlar (glikozil hidrolaz ailesi 28 üyeleridir) ve spesifik olmayan lipit transfer proteinleri (prolamin süperailisinin üyeleridir) gibi. Üçüncü grup tek bir takson ile sınırlanmış protein ailelerinden oluşur. Alerjenik ekspansinler, ribonükleazlar ve Flavin adenin dinükleotid (FAD) bağlayan proteinler çimen poleniyle (Poaceae) sınırlıdır, Bet v 1 homolog alerjenleri Fagales (Betulaceae ve Fagaceae) takımından kaynaklı polenlere spesifiktir, Thaumat benzeri ve Amb V alerjenleri özel olarak sırasıyla Cupressaceae ve Asteraceae polenlerinde bulunmuştur [11].

Huş ağacı, Çayırötu ve Miskotu polen tanelerinden inflamatuvar lipit mediatörleri olan prostoglandin E₂ (PGE₂) ve lökotrien B₄(LTB₄) ile yapısal benzerliğe sahip olan maddeler salınmaktadır. Huş ve çimen polen ekstraktlarından elde edilen lipit fraksiyonları, kemotaksise ve nötrofil ve eozinofil aktivasyonuna neden olur. Huş ağacı poleninden elde edilenler, dendritik hücrelerden IL-12 üretimini inhibe etmek yoluyla Th₂ polarize edici aktivite sergilerler. Alerjenik proteinlerin yanında yine bu türlerin polenlerinden salınan endopeptidazlar, PGE₂ benzeri ve LTB₄ benzeri maddelerin alerjik hastalık patogenezisi ile ilgili olduğu düşünülmektedir [33].

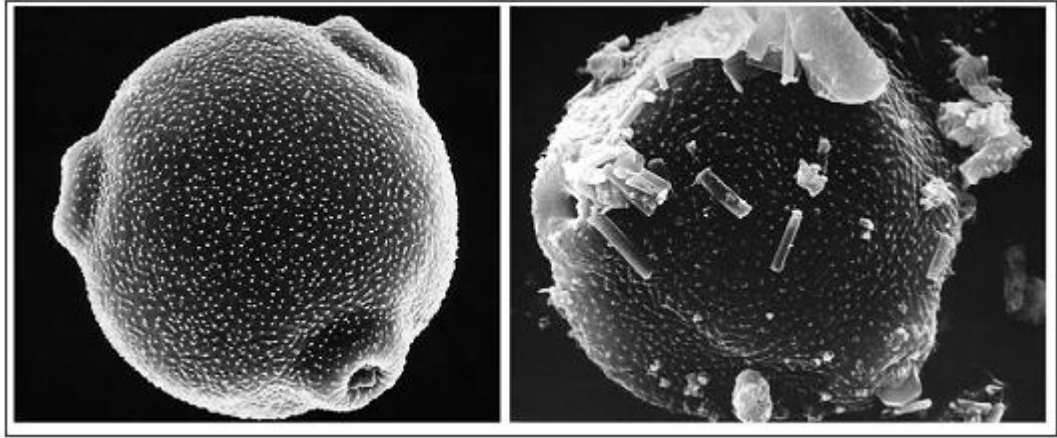
2.4 Polen Alerjisini Etkileyen Çevresel Faktörler

Birçok çalışma, solunum sağlığı üzerine çevresel hava kirliliğinin olumsuz etkilerini göstermiştir. Alerjik rinit ve bronşiyal astım gibi alerjik solunum yolu hastalıkları son 10 yılda bütün endüstrileşmiş ülkelerde gerçekten çok yaygın hale gelmiştir ve bu artışın sebebi halen tartışmalıdır. Bununla birlikte, artmış respiratuvar alerji sıklığı ile hava kirliliğinin artmış trendi arasındaki korelasyonun kanıtlarına rağmen, bağlantı ve etkileşimler halen tartışmalıdır. Çalışmaların yorumu, sigara içmenin etkisi, ev içi kirleticilere ve ev içi-ev dışı alerjenlere maruziyetin etkisi düşünülünce kafa karıştırıcıdır. Konuyu gölgeleyen diğer bir faktör, laboratuvar değerlendirmelerinin doğal maruziyet sırasında, atmosferik kirlilik karışımı inhale edildiğinde neler olduğunu yansıtmadığıdır. Sonuç olarak, çevresel hava kirliliği solunumsal alerjinin başlaması ve sıklığının artışında rol oynadığı fikri makul olsa da bunu kesin olarak ispatlamak kolay değildir. Ek olarak, kirlilik maruziyetine bireysel yanıtın iklimsel faktörler kadar kaynağa ve komponentlerine de bağlı olduğunu hatırlamak önemlidir. Aslen bazı hava kirliliği ile ilişkili astım alevlenmesi vakaları yalnızca hava kirliliğindeki artışla ilişkili değildir aynı zamanda hava kirliliğinin yer seviyesinde birikimini destekleyen iklim faktörleriyle de ilgilidir [5].

Akışkan yataklı reaktörlerin kullanımı sayesinde olan, tüm gaz ve partiküllü hava kirleticilerin polenden alerjen salınımı üzerine etkisi doz, zaman ve nem bağımlı tarzda çalışılabilir. *P. pratense* polenin yüksek konsantrasyonda SO₂' e maruziyeti, major alerjenlerin, Phl p 5, serbestleşmesinde anlamlı azalmaya neden olur, böylece, major çimen polen alerjenlerinin biyoyararlılığı, SO₂ kirliliğinin olduğu bölgelerde kirlenmemiş alanlarla karşılaştırıldığında ağır şekilde azalmış olabilir varsayımı desteklenir. Bu gözlem iyi bilinen paradoksik bir bulgu olan, 1991' de eski Doğu Almanya'daki çocukların Batı Almanya' dakiler ile karşılaştırıldığında, Doğu Almanya' nın SO₂ ile ağır şekilde kirlenmiş bölgelerinde yaşayan 5-6 yaşındaki çocuklarda düşük astım ve alerjik rinit oranlarını açıklamaya yardım edebilir. Aynı koşullarda polen taneleri NO₂' e (major bir ev içi ve ev dışı kirleticisi) maruz kaldıklarında alerjen biyoyararlılığında değişiklik olmadığı gözlenmiştir [1] (Şekil 2.22).

Yol kenarlarında biriken polenler trafik ile ilgili emisyonlar ile ağır şekilde kirlidir, bununla birlikte kırsal alanlarda biriken polenler ile karşılaştırıldığında anlamlı

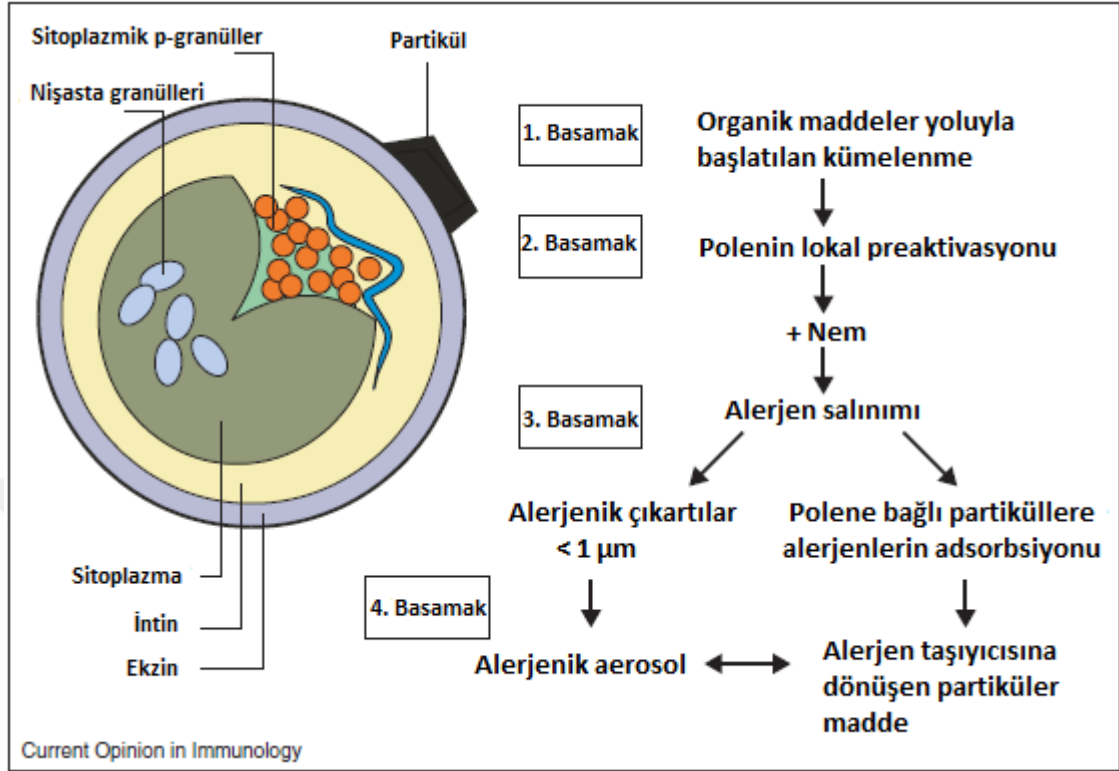
şekilde azalmış alerjen salınımı gösterirler. Trafik yoğun bölgeler üst hava yollarının alerjik hastalıklarının yüksek prevalans oranları ile ilişkilidir, bulgular polenden alerjen salınımının devamını ve serbest alerjenin havada taşınan dizel egzoz partiküllerine bağlanmasını gösterebilir. Doğal major çimen polen alerjeni Lol p 1 den yüksek oranda saflaştırılmış örneklerin dizel egzoz partiküllerine bağlanması deneysel koşullarda ilk kez Knox ve arkadaşları (1997) tarafından gözlemlenmiştir [34]. Daha ötesi, havayla yayılan partiküller, yüksek konsantrasyonda hava kirliliğinden yoksun park alanlarında değil fakat trafik yoğun bölgelerde polen yüzeyinde yığılırlar. Polen yüzeylerindeki partikül yığılması, kirlilik olan alanlarda biriken polenlerin yaygın bir özelliğidir [1] (Şekil 2.22).



Şekil 2.22: Kırsal (sol) ve kentsel (sağ) alanlardan toplanmış huş polenin taramalı elektron mikroskopik görüntüleri [1].

Bugün, partiküler çevresel hava kirliliği, özellikle dizel egzoz partikülleri en temel konudur. Endüstrileşmiş batı dünyasında havada yayılan partiküler maddeler, partikül çekirdeği de bizzat silica, demir, alüminyum, magnezyum, sülfür, mangan ve kurşun gibi minerallerden veya karbon içerikli organik materyalden oluştuğu halde bu partiküller üzerine adsorbe edilmiş 700 den fazla organik maddeden meydana gelir. Organik maddeleri adsorblayan partiküller temel olarak polisiklik aromatik hidrokarbon, fenoller veya azo-heterosiklik bileşenler grubuna aittir. Bu maddeler polen-partikül etkileşim aracılığı göstermektedir. *D. glomerata* çimen poleni, havada yayılan partiküler maddelerin sulu ekstraktlarıyla inkübe edildiğinde, nemli koşullar altında polen aktivasyonu sırasında özelliklerinde morfolojik değişiklikler izlenir. Aynı zamanda bu polen taneleri önemli bir miktar proteini doz ve zaman bağımlı tarzda salarlar. Atmosferik ince tozun organik ekstraktlarıyla

muamele edilen polen, pre-aktivasyonun lokal işaretlerini gösterir fakat protein salınımı yapmaz [1] (Şekil 2.23).



Şekil 2.23: Polen-partikül etkileşimi yoluyla oluşan alerjen taşıyan aerosolün öngörülen mekanizması [1]

Bu bulgular, nemli atmosferde polen-partikül etkileşimi yoluyla alerjen içeren aerosollerin oluşturulduğu hipotezinin oluşumuna neden olurlar. Bu görüş taramalı elektron mikroskopisi yoluyla desteklenmiştir. Havada yayılan partiküllerin ekstraktlarına maruz kalan polen, polen yüzeyinde hidrate polenden salınan alerjen taşıyan partiküllere benzeyen, küçük poligonal (çok köşeli) partiküllerin görünmesiyle karakterizedir. Bu partiküller, 1 µm' den çok küçüktürler, 'submikronik kısma' aittirler, yanma ürünleri ile çok kirlenmiş bölgelerden toplanan polenlerin yüzeyinde izlenenlere benzerler (Şekil 21). Çevresel havadaki kirleticilerinin polenle etkileşimi, polen morfolojisi, protein ve alerjen salınımı ve partiküler alerjen içeren aerosollerin oluşumu konularına ilişkin sadece kantitatif değil aynı zamanda kalitatif değişiklikleri de başlatır [1].

Polen tanesi, nemli koşullarda sadece protein ve alerjen salınımı yapmaz. Son zamanlarda polen tanesinin pH, zaman ve sıcaklık bağımlı şekilde önemli bir miktar

eikosanoid benzeri maddeler de (enzim immunoanalizde lökotrien B₄ ve prostoglandin E₂ ile çapraz reaksiyon veren) sekrete edebildiği bildirilmiştir. Huş ağacı, çimen ve miskotu polenlerinde çok yüksek miktarlar bulunmuş iken çam ağacı polenlerinde sadece çok az miktarda lökotrien B₄ benzeri sekresyon izlenmiştir. Bu proinflamatuvar maddelerin salınımı, yoğun trafikli yol kenarlarından toplanan polenlerde güçlü bir proinflamatuvar aktivitenin göstergesi olarak anlamlı şekilde yüksektir [1].

Bu bulgular, ileri çalışmalar ile daha detaylı olarak çalışılmaya ve geniş açıklamalara ihtiyaç duymaktadır. Tüm alerjik duyarlanmalardaki (duyarlanmanın başlatılması) erken olayların ve alerjenin indüklediği mekanizmalardan önce hastalığın alevlenmesinin anlaşılmasında yeni bir boyut açarlar. Alerjen taşıyıcısı-polen tanesi-bizzat kendisi, pro-inflamatuvar mediatörler sekrete ederek solunum yolunun mukozal epitelinin aktivasyonuna katkı sağlayabilir. Yüksek alerjenisiteye sahip bitkilerden elde edilen polen tanelerinin (örneğin huş ağacı, çimen ve miskotu), bu pro-inflamatuvar maddeleri çok daha az alerjenisite gösteren çam ağacı polenine göre anlamlı şekilde fazla miktarda ürettiği özellikle dikkate değerdir. Bu yüzden, ‘alerjenik potansiyel’ terimi sadece alerjen yapısını moleküler düzeyi ile ilgili değildir aynı zamanda alerjen taşıyıcısının özellikleri ile de ilgilidir ve inflamatuvar hücreleri doğrudan aktive etmek suretiyle duyarlanmayı arttırıcı yeteneği de vardır. Duyarlanmanın başlaması işlemi, alerjen ile antijen sunan hücre arasındaki temastan önce başlar ve atopik duyarlanmadaki en önceki basamak olabilir, daha sonraları T hücre aktivasyonu, antikor üretimi, immünolojik hafızanın gelişmesi ve immun yanıtı güçlendiren hücrelerin temin edilmesi meydana gelir [1].

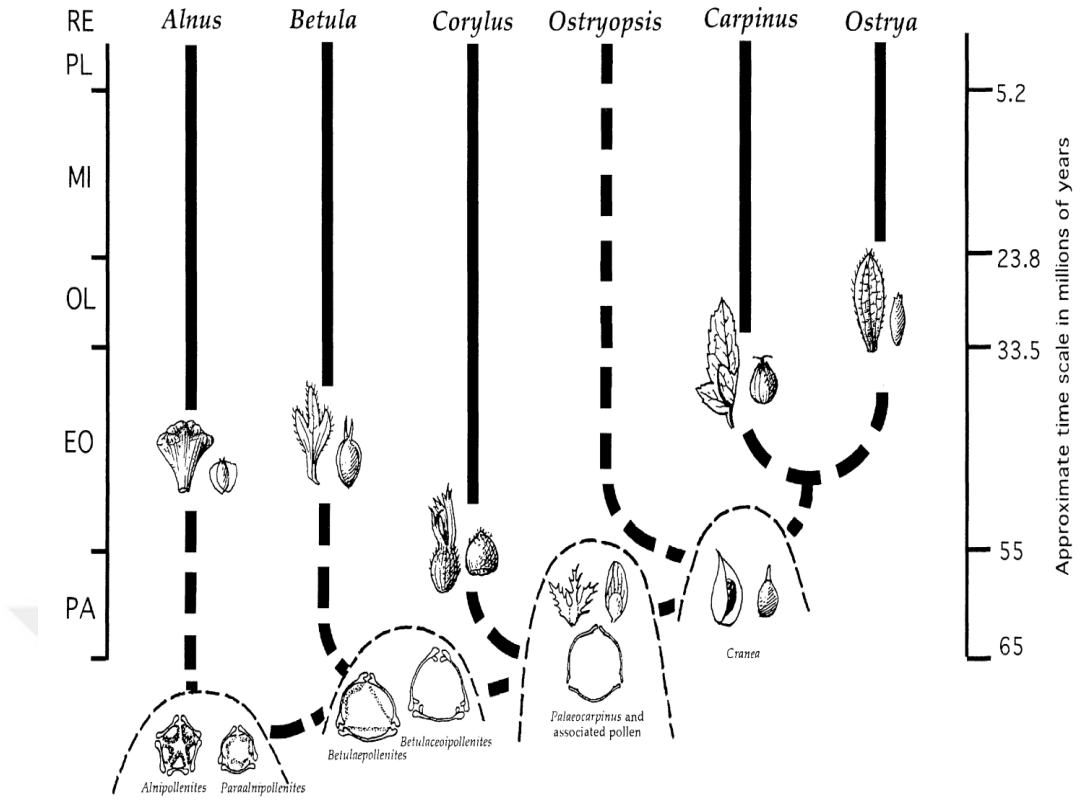
2.5 Betulaceae Ailesi Genel Özellikleri ve Alerji

Fagales takımına ait ağaç polenleri, kuzey yarımkürenin ılıman iklim kuşağında kış/ilkbahar aylarının ana alerjik rinit sebebidirler. Fagales takımı; Betulaceae, Casuarinaceae, Fagaceae, Juglandaceae, Myricaceae, Nothofagaceae, Rhoipteleaceae ve Ticodendraceae olmak üzere 8 aileden oluşmasına rağmen Betulaceae (*Alnus*, *Betula*, *Carpinus*, *Corylus*, *Ostryopsis* ve *Ostrya*) ve Fagaceae (*Fagus*, *Castanea* ve *Quercus*) ailelerinin üyeleri en sıklıkla alerji ile ilgilidirler. Fagales türlerinin çoğu, çok küçük tek cinsiyetli çiçeklere sahip ağaç veya çalı benzeri habitus olarak görünürler, sıklıkla yoğun çiçekli olarak salkım benzeri veya sivri çiçeklenme

şeklinde büyürler. Fagales takımının türleri küresel olarak yayılmıştır, halbu ki neredeyse tüm türler tercihen ılıman iklim kuşaklarında yetişirler [13].

Betulaceae familyası üyeleri kuzey yarıkürenin ılıman kuşağında oldukça yaygındır. Tropikal kuşağın dağlarında, güney yarımkürede ise And dağlarında vardır [35]. Bazı türler (örneğin *Betula platyphylla* Suk.) subtropikal bölgelerin yüksek yerlerinde 4100 m yüksekliğe kadar bulunabilir [36]. Herdem yeşil ya da yaprak döken ağaç ve çalılarıdır. Yapraklar almalı, basit, düzenli veya düzensiz çift sıra dişli kenarlıdır. Stipül vardır. Çiçekler, familyaya dahil tüm türlerde tek eşeylidir ve aynı bitkide bulunurlar. Stamen sayısı türlere göre 2-12 arasında değişir. Dişi çiçek birleşik 2 karpelden oluşur. Ovaryum alt durumludur. Meyvesi samara şeklindedir. Kuzey yarımkürede 40 tür ile yayılış gösteren cinsin ülkemizde Kuzey doğu ve Doğu Anadolu' da yayılış gösteren 18 türü bulunur. Dünyada ve ülkemizde bu familya polenlerine yoğun bir şekilde rastlanmaktadır [35]. Betulaceae familyası dünyada 6 cinsten yaklaşık 130 tür içermektedir [36].

Betulaceae' nin üreme organları fosil tabakada, polenleri ve yaprakları dahil kolaylıkla tanınabilir. Betulaceoz türlerin en evvelki yayılım ve tükenme verileri günümüzde fosil kayıtlarından anlaşılmıştır. Moleküler ve morfolojik filogenitesi fosil kayıtları ile uyumludur [36] (Şekil 2.24).



Şekil 2.24: Betulaseöz bitkilerin fosil polen, yaprak ve meyveleri (kesikli çizgilerle yarı çemberlenmiş) ve Betulaceae familyasında yayılan türün, yaprak ve meyvelerinden elde edilen güvenilir fosil kayıtlarına dayanan, en eski oluşumları (kesiksiz çigi ile gösterilmiştir). PA= Paleocene, EO= Eocene, OL= Oligocene, MI= Miocene, PL= Plio-pleistocene, RE= Yakın zaman [36]

Huş (Betula) ve takiben Akçağaç (Alder) ve Fındık ağacı (Hazel), alerjenik ağaçların bu grubunda çok yüksek alerjenik potansiyele sahiptirler. Avrupa' da, Huş alerjenlerine karşı deri prik testi pozitifliği yüzdesi Hollanda' da % 5'den, Zürih' te %54 e kadar olan bir aralıkta değişmektedir. Son yıllarda, Betula' nın süs bitkisi olarak popülaritesi mimarlar nezdinde artmıştır, bu durum özellikle peyzaj mimarlarının yeni şehir parklarında Huş ağacı kullanmasıyla kuzey İtalya' da bu alerjenlere karşı alerjenik duyarlanmada anlamlı bir artışa sebep olmuştur. Eriksson ve Holmen, Huş polen alerjenlerine karşı, 30 yaş dolaylarında başlayan en sık nazal ve daha az solunumsal semptomların dahil olduğu duyarlanmanın sıklıkla diğer alerjenlerle ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Ancak bu bulgu Bjorksten ve arkadaşlarının çalışmasında doğrulanamamıştır [12].

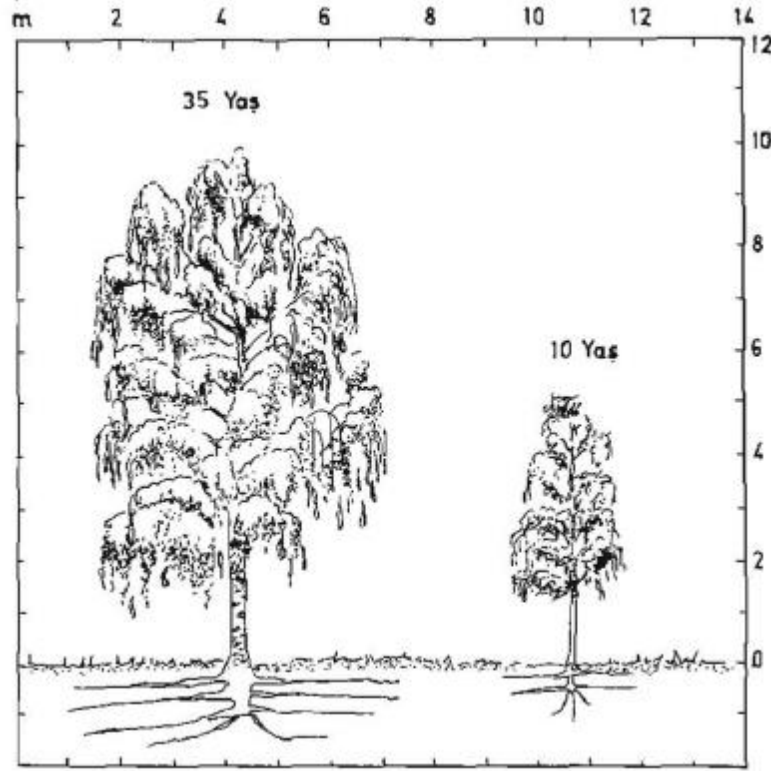
Major Fagales polen alerjenleri Bet v 1 (Birch-Huş), Aln g 1 (Alder-Akçaağaç), Car b 1 (Hornbeam-Gürgen), Ost c 1 (Hop Hornbeam-Kayacık ağacı), Cor a 1 (Hazelnut-Fındık), Fag s 1 (Beech-Kayın), Cas s 1 (Chestnut-Kestane) ve Que a 1 (Oak-Meşe) geniş bir grup aeroalerjen ve yaygın besin alerjenlerini içeren patogenezis ile ilişkili protein sınıf 10 (PR-10) protein ailesine aittir. PR-10 proteinleri çeşitli multigen ailesi ile kodlanır. Yaklaşık 160 aminoasit kadar küçük boyutta, moleküler ağırlığı 17 kDa olan, benzer sekonder yapıya sahip ve genellikle intrasellüler ve sitozolik proteinlerdir. Üç boyut katlanmaları, 7 β -kolundan oluşan antiparalel β -tabaka içine gömülü üç α -heliksten oluşur. Proteinlerin çekirdeği, yüzeyi üzerinde solvent erişebilir iki ya da üç açıklık olan (pek çok durumda) Y-şekilli ampifilik kaviteden oluşur. Bu yapısal motif, PR-10 proteinlerin biyolojik fonksiyonunun anahtar özelliği olabilir. Major Huş polen alerjen Bet v 1' in detaylı kristallografik analizi ligandların geniş bir spektrumu kullanılarak açıklığa kavuşmuştur. Bet v 1 bağlayan cep ayırım gözetmeden ligand-kompleks bağlanma alanından oluşur. Dahası, Bet v 1' in farklı bağlanma modları, diğer ligandların varlığında ve farklı izoformlara bağımlı olarak tanımlanmıştır. Son zamanlarda, kuersetin-3-O-soforisid (Q3OS) bir glukozile flavonol, Bet v 1' in fizyolojik bir ligandı olarak keşfedilmiştir. Flavonoidlerin diğer metabolitler arasında polen tüp germinasyonunu kolaylaştırarak glikozile prekürsörler olarak depolandıkları bulunmuştur. Polen içinde, kuersetin Q3OS' e glikozile olur ve Bet v 1-Q3OS kompleksi olarak depolanır, huş polen DNA' sını UV hasarına karşı korur, polen rehidrasyonundan sonra de-glikozile olup aktif forma geri dönmek için salınır. Huş alerjik bireylerin %90' ından fazlası, Bet v 1' e karşı Ig E antikorları üretir ve bu atopik insanların %60' ı alerjene özellikli reaksiyon verir. Umulmadık şekilde, son bir çalışma Bet v 1' in en çok hayvan türevli alerjenlere ait olan lipokalin protein familyasının proteinlerine benzerliği ortaya çıkarıldı. Araştırmacılar, Bet v 1' in demir-siderofor komplekslerinin bir taşıyıcısı olduğu hipotezini ortaya atarak sadece demir yüklü durumunun immunmodülatör kapasitesi olduğunu gösterdiler. Huş polen ekstreleri, yüksek oranda heterojenite gösterir ve birbirlerinden genellikle sadece birkaç aminoasit farklı olan Bet v 1 isoform türlerini içerir. Fagales takımı içindeki PR-10 alerjenlerinin homologları çapraz reaktivite gösterirler. İnhibisyon deneyleri, Betuloideae ve Coryloideae alerjenleri arasında limitli çapraz reaktiviteyi ortaya koymuştur, böylece tüm ailelerin üyelerinin, yatkın bireylerin duyarlanması için potansiyele sahip oldukları öne

sürülmektedir. %50-93 kadar Huş polen alerjenik hasta da, Rosid türden belirli besinlere karşı alerjenik bulgu ve semptomlar geliştirir. Oral alerji sendromu denilen bir durumda semptomlar aşıkardır ve oluşumu tipik olarak Fagales takımından kaynaklı olan polen alerjenlerinin pre-sensitizasyonu ile ilgilidir [12] (Şekil 2.25).



Şekil 2.25: Alerjenik Fagales cinslerinin coğrafik dağılımı. Dağılım verisi, haritaların sağlandığı www.eol.org dan alınmıştır. Fagales üyelerinin çiçeklenmelerinin fotoğrafları (Huş – *Betula verrucosa*) [12]

Bet v 1' in dışında, minör Huş polen alerjenleri Bet v 2, profilin, Bet v 3 ve Bet v 4, polkalsin ailesinin iki üyesi, Bet v 6, isoflavon redüktaz (eskiden Bet v 5 olarak adlandırılırdı) ve Bet v 7 siklofilin, tümü Ig E bağlayan proteinler olarak tanımlanmışlardır. Huş polen alerjik hastalar arasında Bet v 6 ile duyarlanma oranı %32'dir. Üstelik, homolog alerjen Cor a 6 fındık poleninde tanımlanmıştır, tipik olarak moleküler ağırlığı 34 kDa' dur. ELISA testlerinde Fındık ve Huş polen alerjik hastaların %14' ü rekombinant Cor a 6' ya reaktiftir. Şaperon Cor a 10, 70 kDa ısı-şok protein ailesinin 70 kDa luminal bağlanma proteindir, fındık poleninde tanımlanmıştır, diğer doku ve türlerin 70 kDa proteinleri ile çapraz reaktivite gösterir. Bet v 7, siklofilin A ailesinin bir üyesidir, yaralanma veya kimyasal maruziyet gibi bir stresten sonra oluşturulan bir proteindir. Bitki veya bitki dışı siklofilin A ailesi üyeleri ile immunolojik çapraz reaktivite göstermediği bildirilmiştir, bununla birlikte, rekombinant Bet v 7' e karşı tavşanda Ig G yüksekliği görülür ve diğer bitki türevi siklofilinler ile çapraz reaktivite görülebilir. Çok yakın zamanda, huş polen glutatyon-S-transferaz (GST) özgün bir Ig E bağlayan protein olarak tanımlanmıştır, huş polen alerjenik hastaların bir kohort çalışmasında duyarlanma oranı %13 olarak gösterilmiştir. GST huş poleninde çok bol bulunduğu



Şekil 2.27: Huş ağacının yıllara göre gelişme durumu [37]

Genç sürgünlerde önceleri çok miktarda yağ bezleri bulunur. Bu yüzden genç sürgün uçları hafif yapışkan özelliktedir. Sürgünler yaşlandıkça reçine bezeleri kurur ve dallar üzerinde beyaz lekeler meydana gelir. *Betula* yaprakları 3-7 cm uzunlukta, 2,5-4 cm genişlikte olup genç iken üç köşeli, ucu sivri, yaşlandıkça yumurta biçimini almaktadır. Yaprak kenarları kaba dişli, yaprak sapı 2-3 cm boyunda olup, yeni yapraklar reçineli olduğundan yapışkandır ve ezilince güzel bir koku vermektedir. Yaprığın üst yüzü parlak yeşil, alt yüzü ise açık yeşildir [37].

Betula alba erkek ve dişi çiçekleri silindir şeklindedir. Erkek çiçeklerin uzunluğu 10 cm' e kadar çıkmakta ve başakları tek veya birkaçı bir arada sarkık olarak bulunmaktadır. Dişi çiçekler 2-4 cm uzunlukta olup, önceleri sarımsı yeşil, sonraları açık kahverengidir. Dişi başaklar önceleri dik, döllendikten sonra sarkık durumdadırlar [37] (Şekil 2.28).

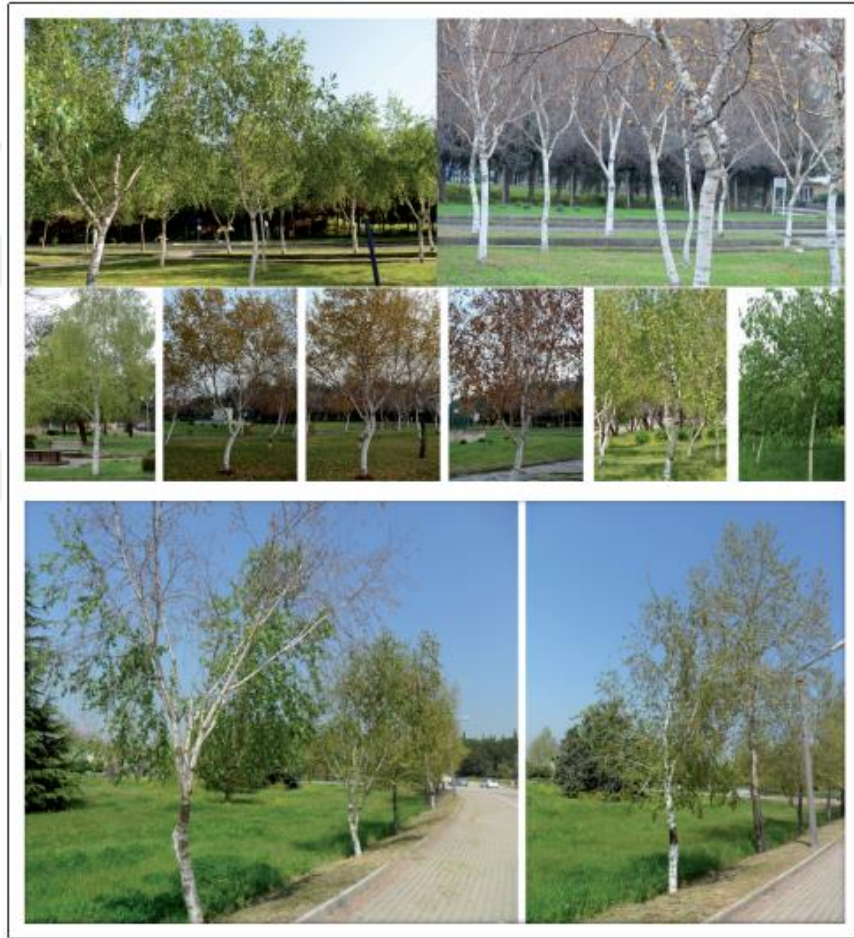
Tablo 2.5 *Betula alba* L. Türünün Sistematik Şeması

TAKSONOMİK SINIFLANDIRMA

Kingdom: Plantae
Subkingdom: Tracheobionta
Division: Magnoliophyta
Class: Magnoliopsida
Subclass: Hamamelidae Takhtajan
Order: Fagales
Family: Betulaceae
Genus: <i>Betula</i>
Species: <i>Betula alba</i> L.

Ülkemizde Doğu Anadolu’ da 1500-2500 m yükseklikte saf veya gruplar halinde titrek kavak (*Populus tremula* L.) ve sarı çamlarla (*Pinus silvestris* L.) karışık halde bulunur. Kars ve Göle ormanlarında 1800 m yükseklikteki sulak vadilerde küçük gruplar halinde sarı çamlarla birlikte bulunur. Allahuekber Dağlarında, özellikle Sarıkamış-Ardahan yaylalarında 2000 m yükseklikte sarı çam ormanları içinde tek veya titrek kavaklarla birlikte bulunurlar. Şavşat-Posof hattında 1800-2000 m yükseklikte yalnız çam ormanlarında ladinlerle (*Picea* ssp.) birlikte tek tek veya gruplar halinde dağılım gösterirler. Küçük Ağrı Dağı’ nın kuzeye bakan yamaçlarında 2700-3000 m yüksekliğe çıkabilmekte ve küçük çalı grupları halinde dağılım göstermektedir. Yaylacıların aşırı kesimleri nedeniyle ağaç ve ağaçcık formunu kaybeden huşlar küçük çalılara dönüşmektedir. Doğu Anadolu Bölgesin’de özellikle Erzurum’ da Palandöken dağlarının Güneydoğu yamaçlarında ve bölgenin diğer önemli dağ gruplarında (Kop, Pülümür, Nemrut dağları gibi) ve Tunceli Ovacık’ ta küçük gruplar halinde vadi, taban ve yamaçlarda, akarsu boylarında gevşek gruplar halinde sık sık rastlamak mümkündür [37].

Beyaz huşların, düzgün gövdeli oluşu, gövde kabuğunun başlangıçtaki çok güzel beyaz görüntüsü daha sonraki gri kahverenkli, gençken piramidal dallı, yaşlanınca salkım formu nedeni ile beyaz huşlar gerçekten dekoratif ağaçlardır. İlkbaharda açık yeşil, sonbaharda altın sarısı yaprakları ile huşlar renk gösterisi yaparlar. Erkek çiçekler kış aylarında huşların görünümüne ayrı bir güzellik katar. Tüm bu sebeplerle şehir parklarında çim alanlar üzerinde, merdiven, teras, duvar, yol kenarlarında, giriş kapılarında, kampüs ve lojman sahalarında tek ve gruplar halinde sıklıkla yetiştirilen bir süs bitkisi olarak dikkat çekmektedir [37-38] (Şekil 2.29).



Şekil 2.29. Park, bahçe ve yol kenarlarında dikilmiş *Betula* türüne ait ağaçlar [38]

Ayrıca şehir içi yolların orta ve kenar refüjlerinde estetik amaçlı tek ve küçük gruplar halinde kullanılabilecek bir ağaçtır. Park ve bahçelerde küçük gruplar halinde estetik ve şekil özellikleri nedeni ile kullanılabilir. Yine karayolları orta refüjlerinde görüşü kısmen ya da tamamen sınırlandırmak için kullanılabilmektedir [37] (Şekil 2.30-2.31).



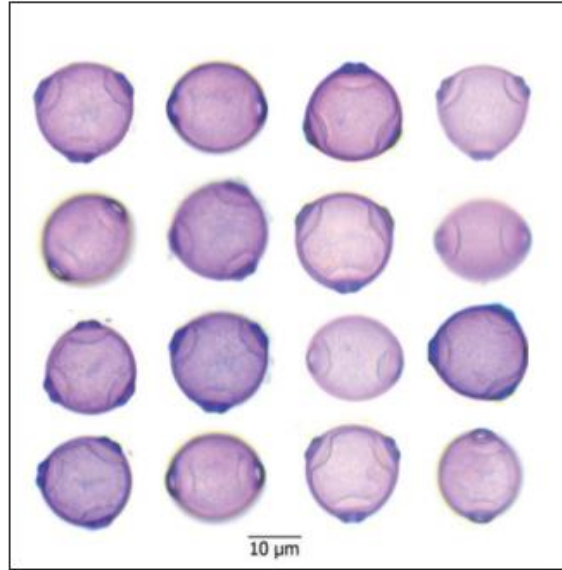
Şekil 2.30. Sonbahar aylarında *Betula alba* ağaçları



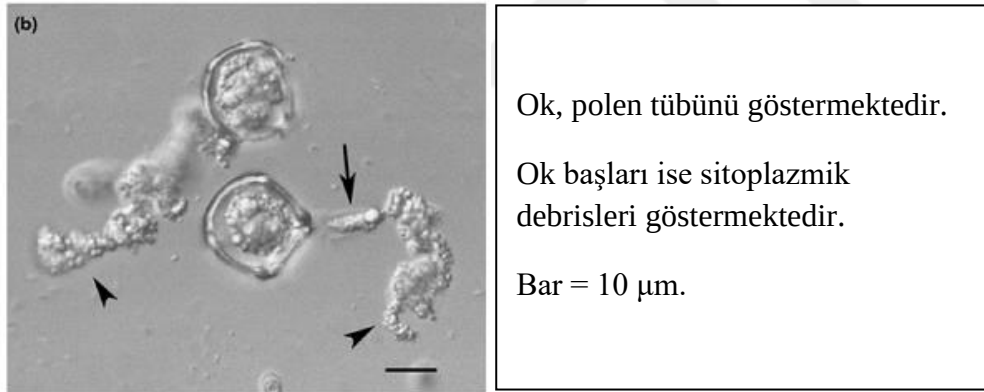
Şekil 2.31. *Betula alba* yaprak ve dişi organ fotoğrafları (kaynak: <https://alergia.leti.com>)

Huş ağacı rüzgarla tozlaşmakta ve silindir şeklindeki eksen üzerindeki erkek çiçeklerde çok fazla miktarda polen üretilmektedir. Bir huş ağacında silindir şeklindeki çiçek kurullarında 8 milyondan fazla, bir ağaçta ise 90-110 milyar civarı polen üretilmektedir. Atmosferik polen çalışmalarında teşhisler genellikle *Betula* olarak, bazı çalışmalarda ise *Betula* cinsinin ait olduğu *Betulaceae* familyası şeklinde

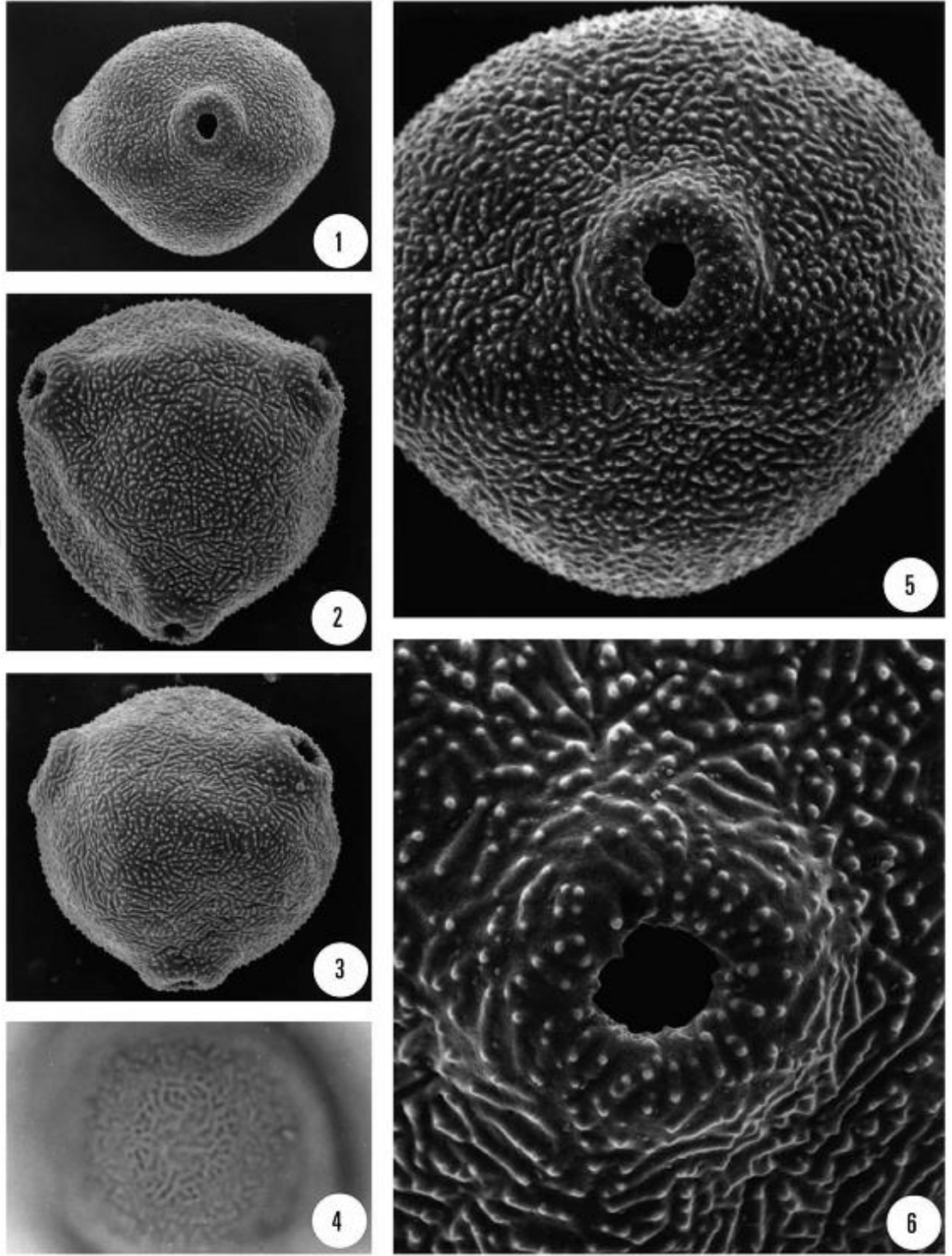
yapılmaktadır. Betula polenleri genelde 20-30 μm büyüklüğünde ve 3 apertürlü (triporat) olup, yüzeyleri ise ince granüllüdür [38] (Şekil 2.32-2.35).



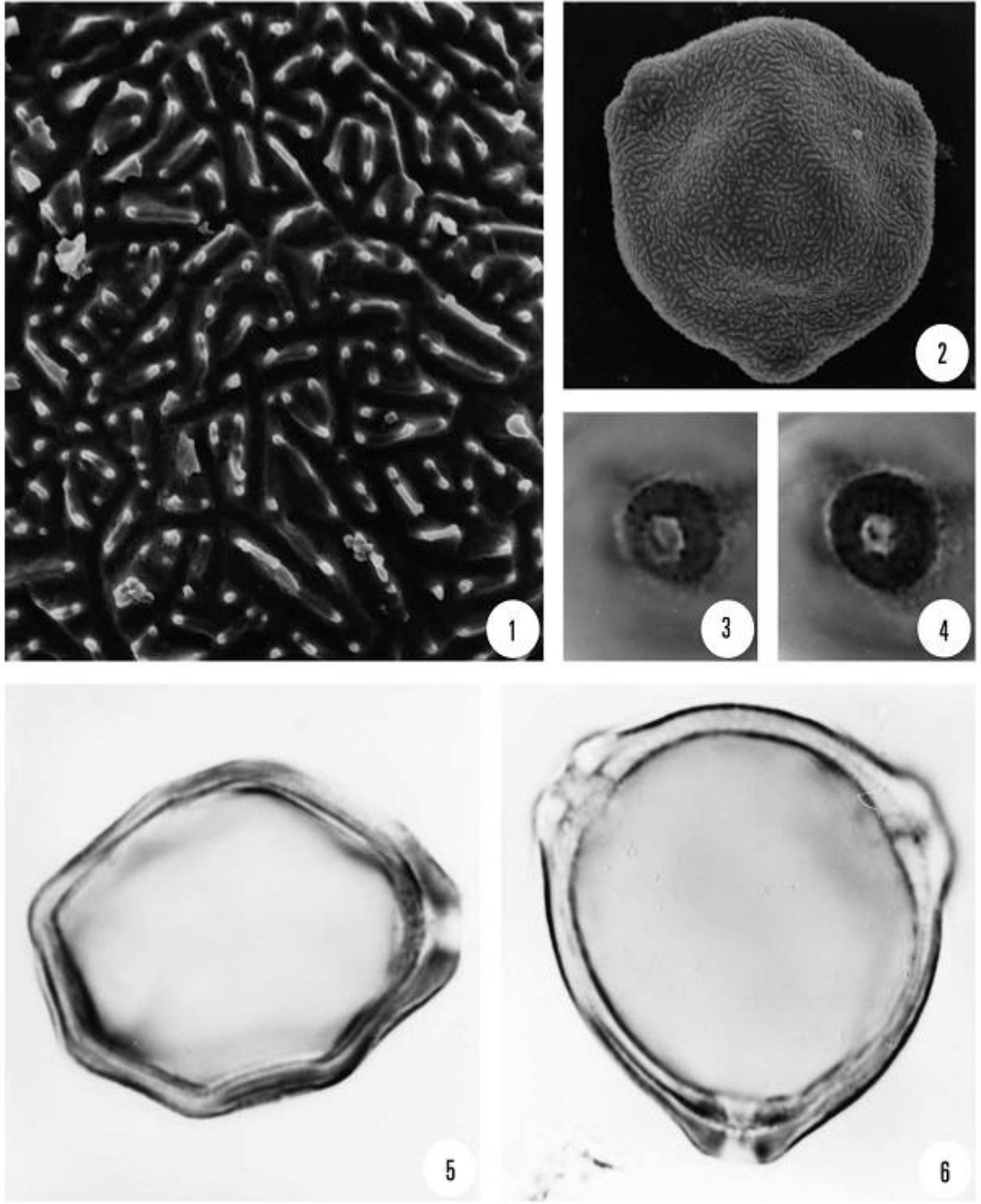
Şekil 2.32: Atmosferik örneklerin ışık mikroskopik incelemesi ve sayımı esnasında preparatlarda tespit edilen bazı huş ağacı polenleri [38].



Şekil 2.33: Rüptüre polen. 3 saat su içinde germinasyondan sonra polen rüptüre olmuştur [40].



Şekil 2.34: *Betula pubescens* Ehrhart tipinin taramalı elektron mikroskopik fotoğrafları: *Betula pubescens* Ehrhart ssp. *pubescens*, 1, 2, 4-5; *Betula pubescens* Ehrhart ssp. *carpatICA*, 3; *Betula pubescens* Ehrhart ssp. *tortuosa*, 6 [39].



Şekil 2.35: *Betula pubescens* Ehrhart tipinin taramalı elektron mikroskopik fotoğrafları: *Betula pubescens* Ehrhart ssp. *pubescens*, 1, 5-6; *Betula pubescens* Ehrhart ssp. *tortuosa*, 2-4 [39].

2.6 Fagaceae Ailesi Genel Özellikleri ve Alerji

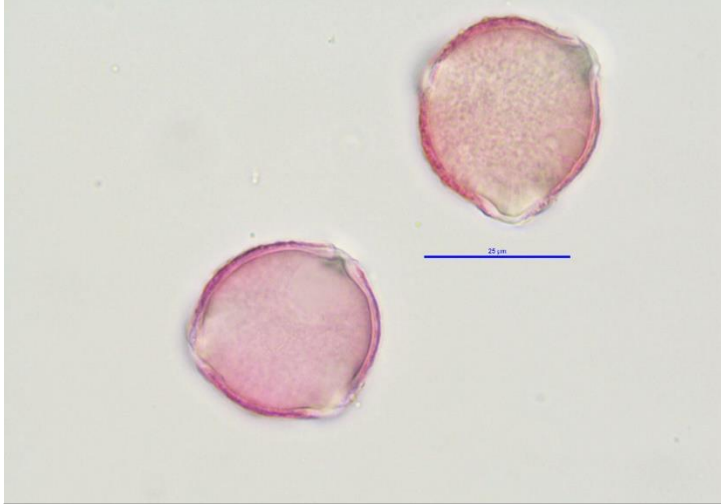
Fagales takımının 8 ailesinden bir diğeri de Fagaceae ailesidir. Fagaceae ailesi de Betulaceae ailesi ile birlikte en sıklıkla alerjik türler içeren bir ailedir. Fagaceae ailesi *Fagus*, *Castanea* ve *Quercus* türlerini içerir. Fagaceae familyası önemli bir ılıman ve tropikal kuşak familyasıdır. Geniş yapraklı, yaprak döken ormanların baskın grubudur. Avrasya ve Kuzey Amerika'nın karışık ormanlarında Kayın (*Fagus*), meşe (*Quercus*), Kestane (*Castanea*) yaygındır. Avustralya ve Güney Amerika' da ise Güney Kayını (*Nothofagus*) bulunur. Familyanın birçok türü ise herdem yeşildir. Bu türler özellikle Güneydoğu Asya'da ormanlar oluşturlar. Fosil kayıtlarına göre familya üyeleri Orta Kretase'de (90 milyon yıl önce) ortaya çıkmıştır. Ayırıcı özellikleri: yaprak döken ya da herdem yeşil ağaçlardır, nadiren çalı formundadırlar. Yapraklar almalı, basit, tam kenarlı ya da pinnat lobludur. Stipül vardır ve dökülür. Çiçekler tek eşeyli, amentüm ya da spika durumundadır. Bazı cinslerde erkek ve dişi çiçekler aynı çiçek durumunda toplanmıştır. Amentumun alt kısmında dişi, üst kısmında ise erkek çiçekler yer alır. Bazılarında ise stamen sayısı 40' a kadar çıkar. Dişi çiçekler ikili, üçlü gruplar halindedir. Ovaryum alt durumlu, 3-6 lokuluslu ve stilusludur. Her lokusta bir ovül bulunur. Meyve bir tohumlu nukstur. Bazı cinslerde meyvenin alt tarafı, 'kupula' denilen sert bir kısım ile örtülüdür. Tohumlar endospermsizdir. Polen, kuvvetli kokulu çiçek durumu gibi bazı özellikler Fagaceae'de böceklerle tozlaşmanın atasal bir karakter olduğunu gösterir. Bu özellik birçok türde korunmuştur. Fagaceae' nin Türkiye'de 3 cinsi (*Fagus*, *Castanea* ve *Quercus*) vardır. Bu cinslerden en çok *Quercus* ' un türü bulunmaktadır [35].

Bu botanik ailenin farklı cinsleri İlkbahar ve erken Yaz ayları boyunca polen taneleri üretirler. Bu polen taneleri bahar mevsiminde ağaçlardan kaynaklanan alerjenlerin ana kaynağıdırlar. Çapraz duyarlılığın farklı prosesleri sıklıkla Fagales takımının 3 ailesi arasında gerçekleşir: Betulaceae, Corylaceae ve Fagaceae, çünkü *Betula* antijenlerine pozitif reaksiyon veren kişiler ilişkili türlere ait olan diğer cinslerin antijenlerine karşı da pozitif reaksiyon verirler. Bununla birlikte, Fagaceae ailesi, cinslerinden bazılarının büyük miktarda polen üretimine rağmen, sadece havadaki polen taneleri çok aşırı fazla olduğu zaman alerjenik semptomlardan sorumlu olabilirler, bu yüzden Avrupa' daki polinozisin (alerjik rinitin) indüklenmesinde sadece destekleyici rol oynarlar [41].

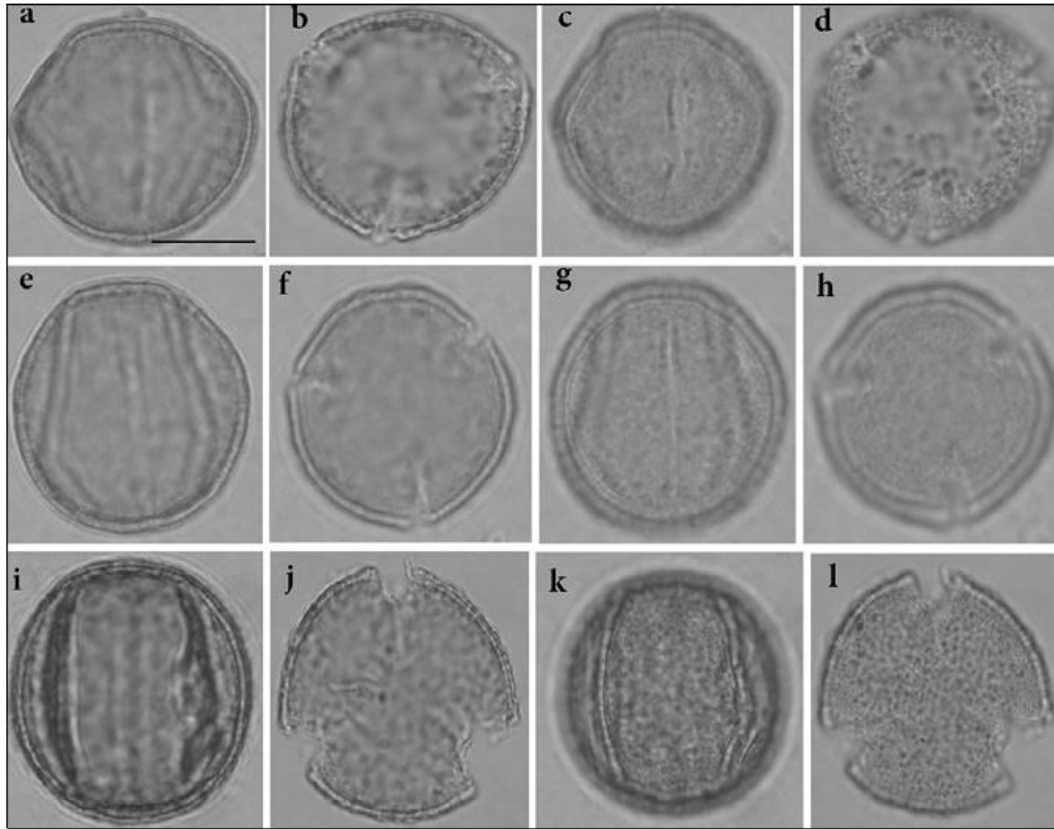
Huş ve Çimen polenleri gibi Meşe poleninin de apertürleri vardır, içerisinde var olan protein içeriği dışarıya sızdığında alerjenik partiküllerin artışına sebep olurlar. Yüksek alerjen konsantrasyon değerleri, Bet v 1 ile çapraz reaktif Que a 1 alerjenlerine karşı tavşan poliklonal antikorlarında artış ile sonuçlanabilir. Sırasıyla Fagales takımının farklı ailelerine ait olan Huş ve Meşe cinsinin polenlerinin major alerjenleri immünolojik olarak kısmi identiktir (özdeştir). Bu çapraz reaktivite, diğer *Quercus* türlerinden köken alan birbirine eş alerjenler arasında da var olmak zorundadır. Ek olarak, doğal Huş ve Meşe polen alerjenleri rekombinant Bet v 1 Ig E epitoplarını paylaşırlar ve Bet v 1 spesifik insan serum Ig E ve tavşan anti-rBet v antikorları Meşe polen alerjenleri ile çapraz reaksiyon verir. Bu bulgular, meşe alerjenlerinin kantitatif tayini için kalibratör standardı olarak Bet v 1' in kullanımını meşru kılar. Huş ve Meşe polen alerjenleri arasındaki immünolojik benzerlik (analoji), meşe poleninin yüksek bir duyarlılama potansiyeline sahip olması, meşe polen ekstraktlarına karşı reaktif olan %80' den fazla kişinin huş polenine karşı da alerjik olmasına neden olduğu gözlemi yoluyla ifade bulur [42].

Quercus, Fagaceae ailesindeki en geniş cinstir, bazı sınıflandırmalarda 400' den fazla tür içermektedir, fakat modern taksonomik yaklaşımda bu sayı muhtemelen daha azdır. *Quercus* cinsinin üyeleri geniş bir coğrafik dağılıma sahiptir, Kuzey Yarımkürede Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya' nın dahil olduğu çok geniş alanları işgal eder. Çok büyük boyutları, geniş dağılımı, heterofil oluşu, altcins taksonlar arasındaki yaygın hibridizasyon ve morfolojik özelliklerdeki değişiklikler sebebiyle *Quercus* cinsinin problemlili bir taksonomisi vardır. *Quercus* sınıflandırılmasına dair bilgilerin çoğu, yaprak ve meyve özellikleri üzerine vurgu yapan taksonomik çalışmalardan gelir. Bütün olarak tür karakteristiklerinin değerlendirilmesi temel alındığında, uzmanların çoğu altcins, tür, varyeteler ve formlar için spesifik sınıflandırma kabul etmezler. *Quercus*, İran ormanlarının en sık Fagaceae cinsidir. İran *Quercus* taksonlarının çoğu, temel olarak Türkiye, Irak ve Kafkasya bölgesini içeren komşu ülkelerde de dağılmıştır [43].

Polen taneleri sıklıkla isopolar, radial simetriktir. Porları bazen belirsiz, apertürleri trikolpat, trikolporoidat veya tricolporat formda olabilir. Bazen genikulus mevcuttur. Polen şekilleri hatları itibarı ile suboblat, oblat-sferoidal, prolat-sferoidal olabilmektedir. Ekzin süslenmesi mesokolpium ve apokolpium sıklıkla benzerdir [43] (Şekil 2.36-2.38)

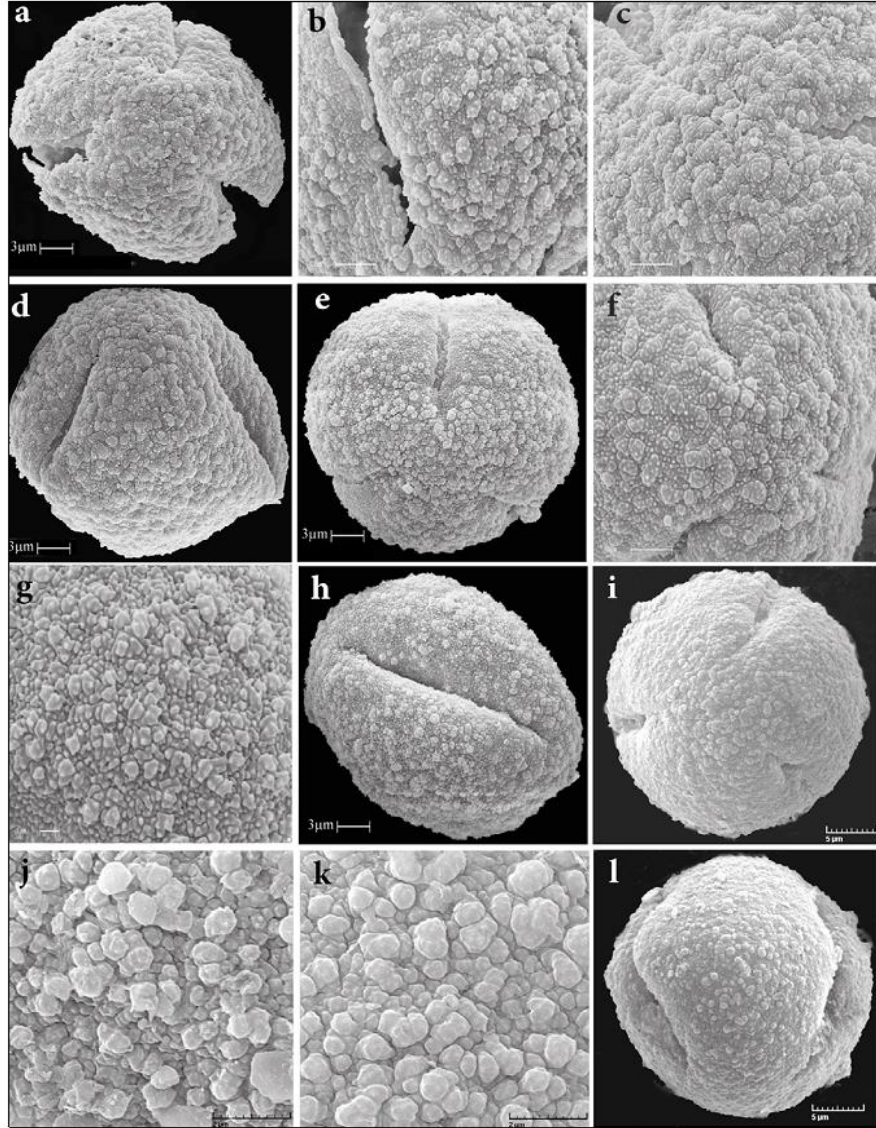


Şekil 2.36: Quercus polenlerinin ışık mikroskopik incelemesi Bar = 25 µm
(<http://allergenscienceandconsulting.com>)



Şekil 2.37: Quercus polen tanelerinin ışık mikroskopik fotoğrafları. (a-d) *Q. macranthera*, (e-h) *Q. longipes*, (i-l) *Q. patraea* subsp. *iberica*. (a,c,e,g,i,k) ekvatoryal bakış. (b,d,f,h,j,l) polar bakış. Ölçek barı : 10 µm [43].

Suprasculptural özellikleri mikrogemmat, microscabrat, mikrosbrat-mikroverrukat, mikroverrukat veya mikroverrukat-mikroekinat şeklinde olabilir. Bu süslenmeler, incelenen taksonlar arasında varyasyonlar gösterir, fakat bir takson içerisinde sabittir. *Quercus* taksonlarının ışık ve taramalı elektron mikroskopik görüntülerinden elde edilen değerli veriler ile taksonların özellikleri anlaşılabilir ve türlerin tanımını yaparken kullanılabilir [43] (Şekil 2.38).



Şekil 2.38: *Quercus* polen tanelerinin taramalı elektron mikroskopik fotoğrafları. (a-d) *Q. macranthera*. (e-h) *Q. patraea* subsp. *iberica*. (i-l) *Q. robur* subsp. *pedunculiflora*. (a,e,i) Polar, (d,h,l) Ekvatoryal görünüm. (b,c,f,g,j,k) Mesokolpium ve apokolpium.

Meşe polenine karşı alerji Avrupa ve Kuzey Amerika' nın bazı bölgelerinde büyük bir problemdir. İspanya' da, Madrid' te, polen alerjik hastaların %14' ü Meşe (*Quercus*) polenine karşı duyarlanmıştır. İsveç' te bu rakam polen alerjik bireylerde bahar aylarında %70-80' lere çıkmaktadır. Que a 1, önemli bir meşe (*Quercus*) polen alerjenidir ve PR-10 (veya Bet v 1 benzeri) protein ailesine aittir. İlgili ağaç polenlerinden (Bet v 1, Aln g 1, Cor a 1, Car b 1), meyvelerden (Mal d 1, Pru av 1, Pyr c 1), ve sebzelerden (Api g 1 Dau c 1) elde edilen diğer PR-10 alerjenlerine benzer Ig E bağlanması ile ilişkili olarak Bet v 1 ile yüksek oranda çapraz reaktivite gösterirler. Pek çok PR-10 alerjeni rekombinant alerjenler olarak klonlanmış, dizilimi anlaşılmış ve eksprese edilmiş olmasına rağmen, Que a 1' in biyokimyasal ve immünolojik özelliklerine ait bilgi sınırlıdır. İpsen ve Hansen (1991), polen ekstraktından Que a 1' i saflaştırmışlar ve çeşitli ayrılmış alanlarla birlikte 24 rezidü uzunluğundaki N terminal aminoasit dizilimini tanıtmışlardır [44]. Daha sonraları Moverare ve arkadaşları (2008) meşe polen ekstraktlarından native (n) Que a 1' i, Bet v1' e karşı geliştirilmiş monoklonal antikolar ile afinite kromatografisi kullanarak saflaştırmışlar, biyokimyasal ve immünolojik olarak özelliklerini tespit etmişlerdir [45].

2.6.1 *Quercus ithaburensis* Türünün Genel Özellikleri ve Alerji

Quercus ithaburensis Decne. türünün sinonimleri '*Quercus aegilops* var. *ithaburensis* (Decne.) Boiss', '*Quercus aegilops* subsp. *ithaburensis* (Decne.) Eig' ve '*Quercus macrolepis* subsp. *ithaburensis* (Decne.) Browicz' şeklindedir. 'Anadolu palamut meşesi' veya 'Tabor Dağı meşesi' olarak bilinen türdür. *Quercus ithaburensis* (Decne.) Doğu Akdeniz yaprak döken meşesi iki alt türü mevcuttur: *Quercus ithaburensis* subsp. *macrolepis* (Kotschy) Hedge & Yalt. ve *Quercus ithaburensis* Decne subsp. *ithaburensis*. Tabor Dağı Meşesi, Akdeniz havzası içinde göreceli olarak geniş bir alan aralığına sahiptir: uzakbatı sahası Salentina yarım adasında, İtalya 'nın topuğundadır. Güney Arnavutluk' ta, Yunanistan' da, bir çok Ege Adasında, Batı Anadolu boyunca, İsrail' de ve Kuzeybatı Ürdün' de de görülür. Yayılımının enlemsel genişliği sebebiyle, *Q. ithaburensis* Doğu Akdeniz' deki yaprak döken meşe türlerinden uzak kuzey ve uzak güneydeki en sık olanıdır [46].

Palamut meşesi 20 m boy ve 1m' den fazla çap yapabilen geniş ve büyük tepeli, kalın dallı, kışın yaprağını döken bir ağaçtır. Halk dilinde 'Pelit', 'Palamut' gibi

isimler alan meyveleri fiziksel olarak pelit, kadeh ve tırnak olarak 3 kısıma ayrılır [47].

Türkiye, *Quercus* cinsinin yayılışı ve tür sayısı bakımından dünyanın en zengin merkezlerinden birini oluşturur. Bu genus ülkemizde 18 tür ve 22 taksa ile temsil edilmektedir. *Q. ithaburensis* Decne. subsp. *macrolepis* dünyadaki yayılış alanları incelendiğinde en geniş yayılış alanını Türkiye teşkil etmektedir ve bu tür ülkemizin doğal ve ekonomik zenginliklerinden biridir [48] (Şekil 2.39- Şekil 2.40).



Şekil 2.39. *Quercus ithaburensis* Decne. türüne ait palamut (flora.org.il)



Şekil 2.40. *Quercus ithaburensis* Decne.(flora.org.il)

2.7 Tiliaceae Ailesi ve *Tilia Cordata* Türünün Genel Özellikleri ve Alerji

Tiliaceae (İhlamurgiller) familyasının yaklaşık 50 cinsi ve 450 türü bulunmaktadır. Familya üyeleri tropik bölgelerde geniş yayılışa sahiptir. Özellikle Amerika, Afrika, Güneybatı Asya' da yoğunlaşmıştır. Şehir kirliliğine toleransından dolayı sıklıkla sokaklar, parklar ve çim alanlarda kullanılır. Kurumuş çiçeklerinden lezzetli bitki çayı yapılır. Ayırıcı özellikleri: Çoğunluğu yaprak döken ağaç, çalı veya nadiren otsu bitkilerdir. Parankimatik dokularında karakteristik müsilaj hücreleri ya da müsilaj boşlukları bulunur. Yapraklar almalı, basit, çoğunlukla dişli ya da loblu, tabanı asimetriktir. Stipül vardır. Çiçekler düzenli, iki eşeyli, bazı türlerde tek eşeyli, alt durumlu, çeşitli kimöz durumlu, aktinomorf simetridir. Stamenler 10'dan çok, filamentler 5' li veya 10' lu gruplar şeklindedir [35].

İhlamurlar 40 m boylanabilen, yaprak döken ağaçlardır. Dünyada 25 kadar, ülkemizde Marmara ve Karadeniz bölgelerinde 4 türü, *T. rubra* DC. (kırmızı ıhlamur), *T. cordata* (kış ıhlamuru, küçük yapraklı ıhlamur), *T. platyphyllos* Scop. (yaz ıhlamuru), *T. argentea* Desf. Ex DC bulunmaktadır [35].

T. cordata ekstraktı, normal murine lenfositler ve lenfoma hücre hatları üzerine anti-proliferatif aktiviteye sahiptir. *T. cordata*, 1000 yılı aşkın ömrü ile uzun ömürlüdür. Yaprakları tek dişli, oblik olarak kalp şekillidir, 4-8 cm uzunluğundadır, üzeri koyu yeşil altı açık yeşildir. Çiçekleri sarımsı beyaz, pedikül ile uzun solgun brakta eklenmiştir. Polen yayma dönemi Haziran'dan Temmuz'a kadardır, bazen Ağustos kadar uzayabilir. Pollinasyonu temel olarak entemofildir: arılar ve sinekler yoluyla olur, bununla birlikte, hava yolu ile yayılacak olan çok miktarda polen de üretir. *Tilia* sp.'ye karşı duyarlanma, rinit ve astım ile Türk çocuklarında %5,5 bulunmuştur, Portekiz' de alerjik çocuklarda %11,4 ve Türkiye' de alerjik erişkinlerde %42,5 olarak bulunmuştur [49].

Eski aile adlandırması olan Tiliaceae, Malvaceae içine birleştirilmiştir. *T. cordata*' ya karşı allerjik rinit, rinokonjunktivit, öksürük ve allerjik kontakt dermatit tanımlanmıştır. İhlamura karşı kontakt ürtiker de bildirilmiştir [49].

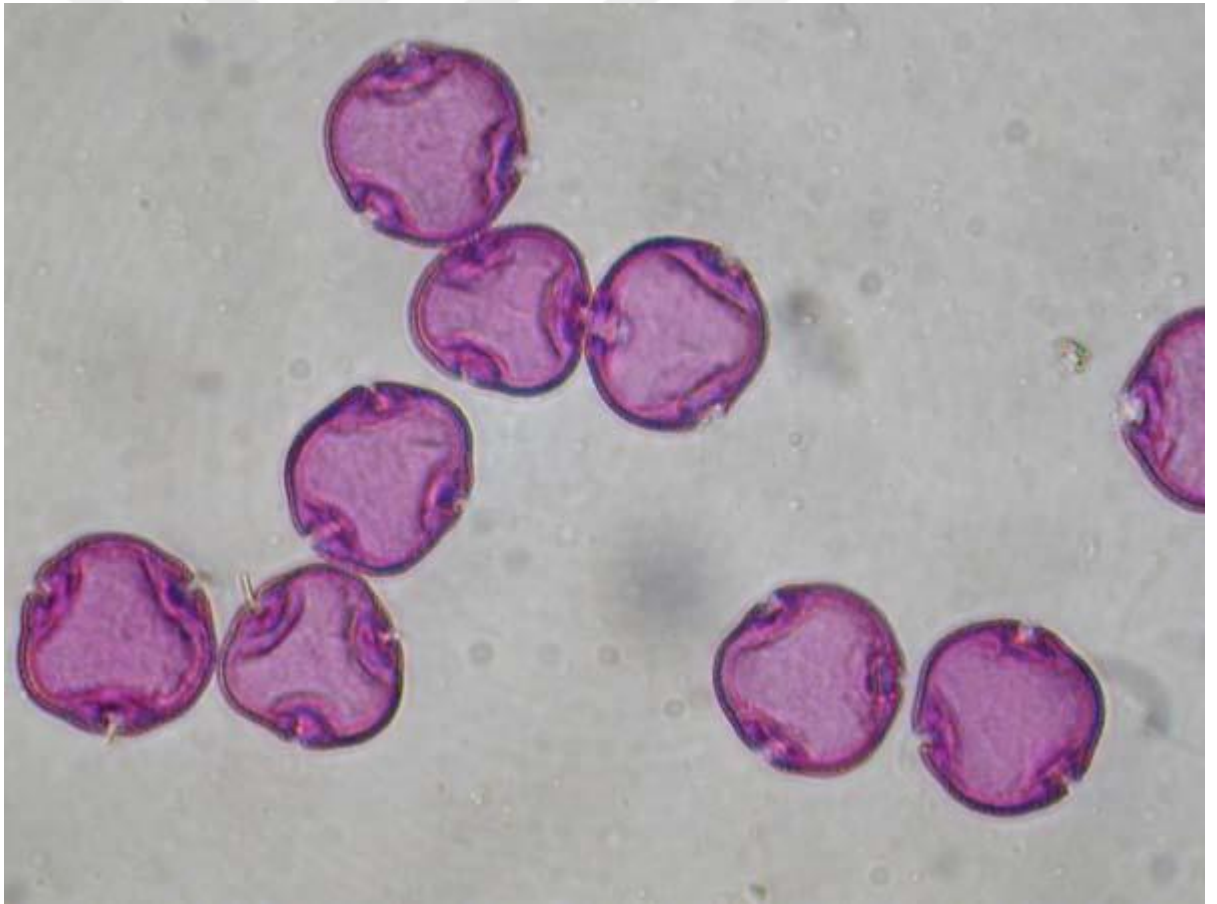
T. cordata polen tanesi yuvarlatılmış üçgen bir görünüme sahiptir, ekvatoryal çapı 25-37 μm ' dir. Polen taneleri trikolporat, porlar düzleşmiş alanın ortası boyunca uzanırlar, açılanmanın köşesinde bulunmazlar. Oluklar kısa elipslerdir, 10-16 μm uzunluğunda 3-5 μm enindedirler ve düzensiz sınırlara sahiptirler. Por lümen konileri polen tanesinin yüzeyine doğrudur. Sekzin ve nekzin benzer kalınlıktadır, kolpi yanındaki yaklaşık 4-7 μm kalınlığındaki nekzin hariç, totalde yaklaşık 3 μm kadardır. İntin apertürlerin altında incedir, onkus oluşturur. Duvar yapısı, dallanmış mikropilanın kolumellasıyla birlikte tektattır. Yüzey yapısı düzensiz mikroretikülattır [49] (Şekil 2.41-2.45).



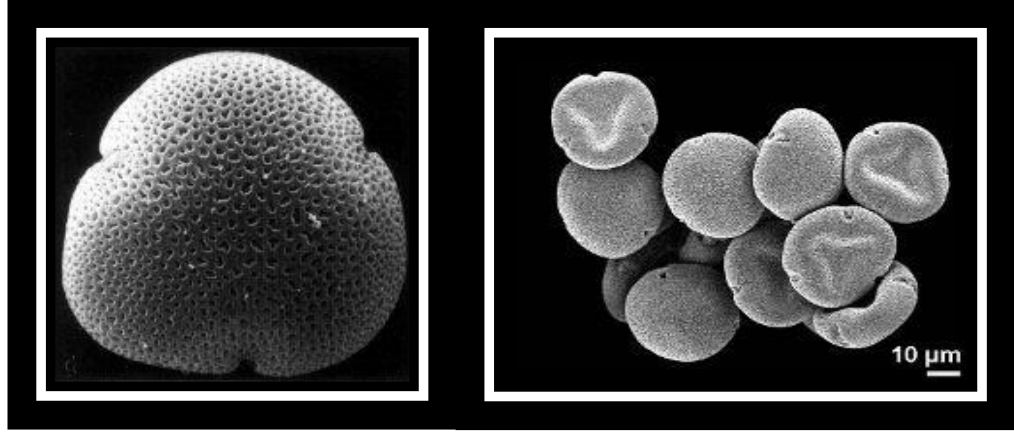
Şekil 2.41: *T. cordata* türüne ait yaprak, çiçek ve meyve yapıları (<http://www.herboristerie-grenoble.com>)



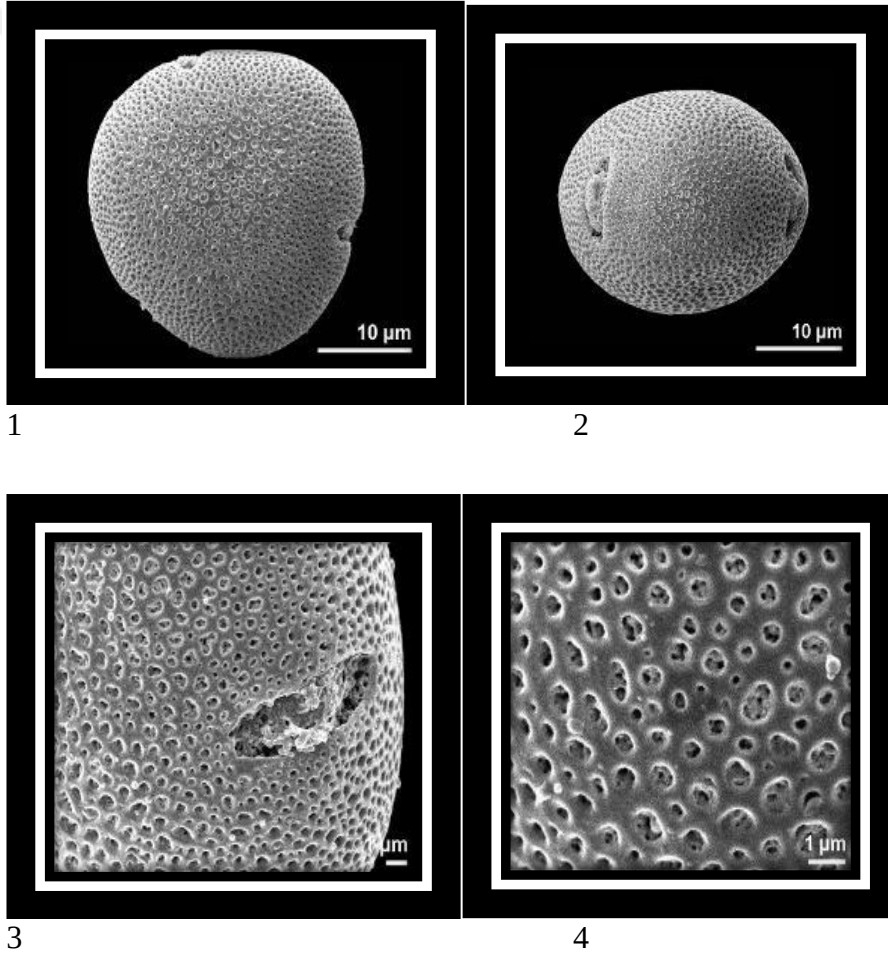
Şekil 2.42: *T. cordata* (<https://it.wikipedia.org>)



Şekil 2.43: *T. cordata* polenlerinin ışık mikroskopik fotoğrafı (<http://www-saps.plantsci.cam.ac.uk>).

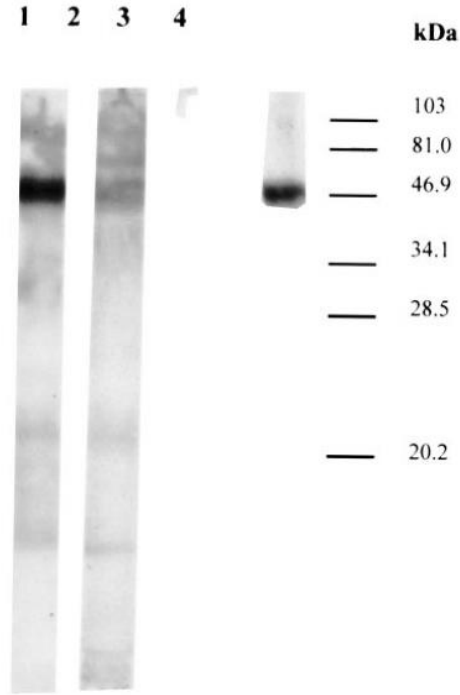


Şekil 2.44: *T. cordata* poleni taramalı elektron mikroskopik fotoğrafları, soldaki resim polar görünüş, sağdaki resim kuru polen taneleri (<https://www.paldat.org>)



Şekil 2.45: *T. cordata* poleni taramalı elektron mikroskopik fotoğrafları. (1) polar görünüm (2) ekvatoryal görünüm (3) apertür (4) ekzin yüzeyi (<https://www.paldat.org>).

2001 yıl öncesine kadar İhlamur polenine karşı alerji dökümente edilmemiştir. Ancak Mur ve arkadaşları ilk kez 2001 yılında, 21 yaşında bir kadında *T. cordata*' ya karşı tespit ettikleri alerjik reaksiyonlarını rapor etmişlerdir[16]. Bu raporda hastanın evinin yakınındaki çiçeklenmekte olan ıhlamur ağacının polenlerine karşı her haziran ayında burun, göz, damak, kulak ve farenkste kaşıntı, konjunktival hiperemi, hapşıрма ve gece öksürüğü bulguları ile giden bir alerji tablosu olduğunu saptamışlardır. Yaptıkları laboratuvar incelemelerinde total Ig E düzeyini yüksek ve *T. cordata* polen ekstraktına karşı deri prik testini (%5 w/v) pozitif olarak tespit etmişlerdir. Deri prik testi aynı zamanda *Lolium* sp. , *Olea* sp., *Plantago* sp., *Artemisia* sp., *Platanus* sp., *Chenopodium* sp. ve *Parietaria* sp. için de pozitif olarak saptanmıştır. Aynı hastada konjunktival provokasyon testi (0,5 mg/mL miktar ile) ve *T. cordata*' ya karşı spesifik Ig E de (27,7 kUA/L) pozitif bulunmuştur. *Lolium perenne* (13,8 kUA/L), *Artemisia vulgaris* (10,8 kUA/L), *Plantago ovata* (9,6 kUA/L) ve *Platanus acerifolia* (15,5 kUA/L) polenlerine karşı spesifik Ig E değerleri de pozitif bulunmuştur. Non spesifik ve *T. cordata*' ya karşı spesifik bronşiyal provokasyon testleri negatif bulunmuştur. Çapraz reaktivite değerlendirmek için kağıt diskler ile RAST (radyoalergosorbent test) inhibisyonu deneyi yapılmış ve *Lolium*, *Olea* ve *Plantago* ekstraktları ile inhibisyon olmamış; *T. cordata* ile inhibisyon olmuş, *Artemisia* ve *Platanus* polen ekstraktları ile parsiyal inhibisyon (~%30-40) gözlemlenmiştir. *T. cordata* ekstraktına sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) sonrası Ig E immün dedeksiyonu ile birkaç bant, moleküler ağırlığı ~10 kDa ve ~23 kDa seviyesinde non spesifik ve esasen ~50 kDa seviyesinde spesifik bir alerjen protein bandı tespit edilmiştir. *P. acerifolia* ekstraktına karşı da benzeri bantlar tespit edilmiştir fakat ~50 kDa' luk bant çok zayıftır. *P. acerifolia* ekstraktı ile *Tilia*-Ig E immüdedeksiyonunun inhibisyonu küçük bantlarda çapraz reaktivitenin varlığını göstermiştir fakat ~50 kDa luk bantta bu çapraz reaktivite yoktur (Şekil 46). *T. cordata*' ya ait bu spesifik alerjen protein (**Til c**) için daha ileri analizin yapıldığı bir çalışmaya şu ana kadar yayınlanmış literatürlerde rastlanmamıştır ve bu açıdan aydınlatıcı ileri araştırmalara ihtiyaç duyulduğu açıktır [16].



Şekil 2.46: Ig E immundedeksiyon deneyi: hat 1) *Tilia* ekstraktı 2) *Platanus* ekstraktı 3) Negatif kontrol 4) *Platanus* ekstraktı ile *Tilia*-Ig E immundedeksiyonunun inhibisyonu [16]

BÖLÜM 3

MATERYALLER VE METOTLAR

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Aseton (Merck, Almanya)
- Etanol (%96, Merck, Almanya)
- Bakır II sülfat (Tekkim, Türkiye)
- Gliserin (%99.5, Tekkim, Türkiye)
- Asetik fenil (Tekkim, Türkiye)
- Bazik fuksin (Tekkim, Türkiye)
- Silika jel 60 (Merck, Almanya)
- Bovine Serum Albumin (BSA, Serva, Almanya)

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Desikatör (ISO Lab, Almanya)
- Vakumlu Desikatör (ISO Lab, Almanya)
- İnvert Mikroskop (Nikon Eclips, ABD)
- Pasteur Pipet Tabancası (Capp Aid, Danimarka)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD)
- Vorteks (Velp Scientifica, İtalya)
- Santrifüj (Hettich, Almanya)
- Buzdolabı (+ 4 °C, Vestel, Türkiye)
- Hassas Terazî (Denver instrument, Precissa, İsviçre)
- Otoklav (HMC Hiroyama, Japonya)
- Etüv (Selekta, İspanya)
- Saf Su Cihazı (Merck, ABD)
- Otomatik Pipet (Eppendorf, Research Plus, Almanya)
- Elek (Test eleği, Aslan, Türkiye)

3.1.3 Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

- Falkon Tüp (ISO Lab, Almanya)
- Eppendorf Tüp (ISO Lab, Almanya)
- 96 Kuyucuklu Plate (SPL, Life Sciences, Kore)
- Parafilm
- Lam – Lamel (ISO Lab, Almanya)
- Enjektör filtresi (ISO Lab, PVDF 0,45 µm, Almanya)
- Enjektör (ISO Lab, Almanya)

3.1.4 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

- Coca Çözültisi (NaCl, NaHCO₃, C₆H₅OH, distile su)
- Bişikoninik Asit (BCA, Serva, Almanya)

3.2 MATERYALİN TEMİNİ

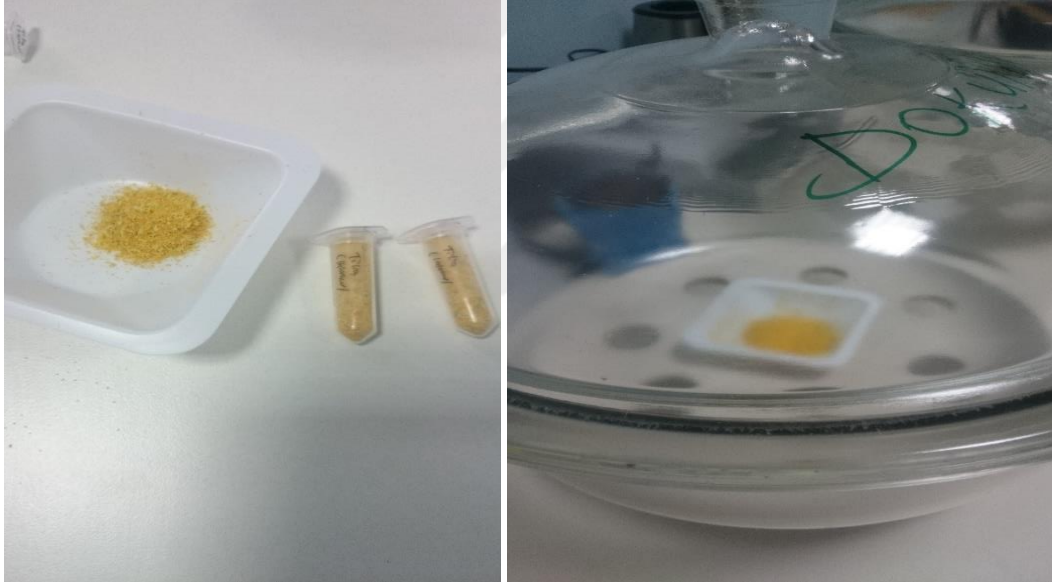
Bu tez kapsamında incelenen *Tilia cordata* (Ihlamur), *Quercus ithaburensis* (Anadolu Palamut Meşesi), *Betula alba* (Tüylü Huş) türlerine ait polen örnekleri Gaziantep ilinde bulunan Gaziantep Üniversitesi kampüsü içindeki ağaçlandırılmış alanlarda, tozlaşma dönemindeki ağaçlardan temin edilmiştir. Tür teşhisleri Botanik ABD Öğretim Üyesi Dr. Hüseyin TEKİN tarafından yapılmıştır. Deri prik testinde kullanılmak üzere hazırlanmış olan Allergopharma markalı ticari polen ekstraktları Asistan Med. San. Tic. Ltd. Şti.' den temin edildi.

3.3 MATERYALİN TOPLANMASI

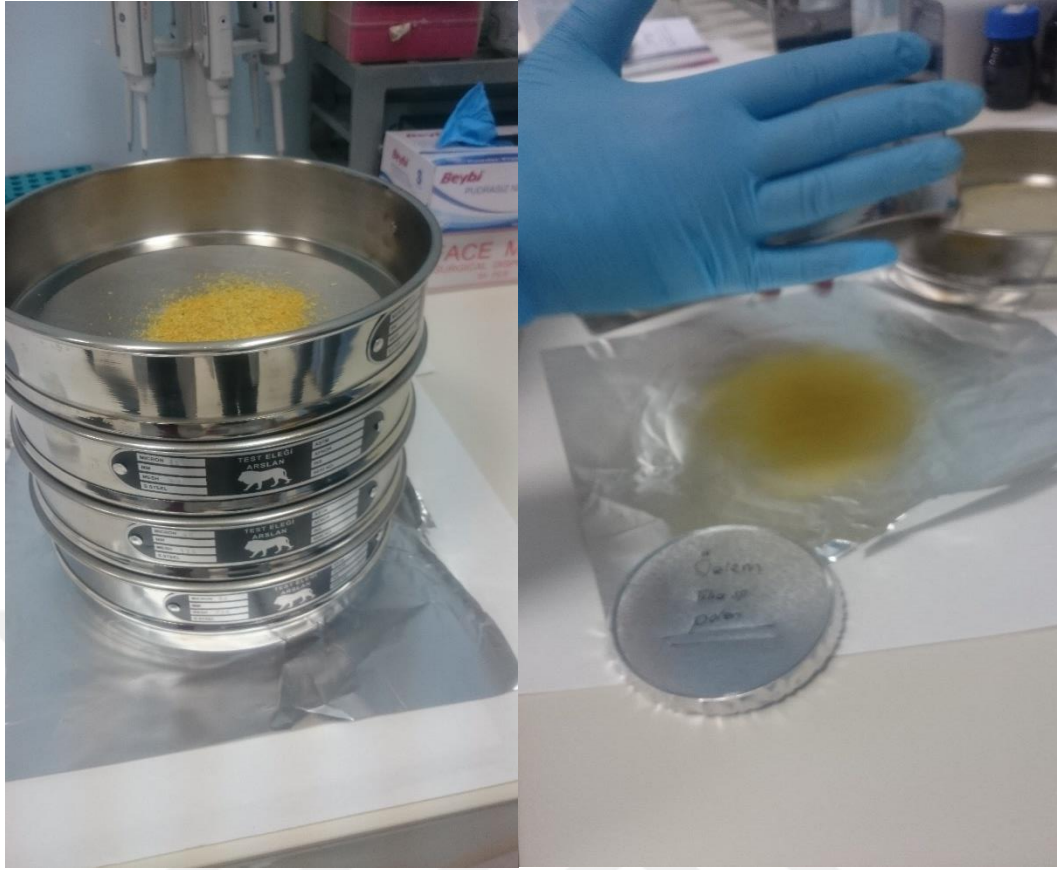
İncelenen polenlerin toplanma şekli çok büyük önem taşımaktadır. Polen çalışması için ekstraksiyon yapmak amacı ile toplanan polenler, Aytuğ ve Peremecinin (1987) belirttiği gibi taze polenler olmalıdır [50]. Polen toplamak için en uygun zaman polen keselerini içeren stamenin açılmasından hemen sonraki evredir.

Bu tez çalışması için belirlenen üç farklı bitki türünün çiçeklenme zamanları dikkate alınarak polenleri toplandı. *Tilia cordata* (Ihlamur) polenleri Haziran-Temmuz 2017'de, *Quercus ithaburensis* (Anadolu Palamut Meşesi) polenleri Ağustos-Eylül 2017'de, *Betula alba* (Huş Ağacı) polenleri Nisan 2017'de Gaziantep Üniversitesi

kampüsü arazisinde bulunan ağaçlandırılmış alanlarından, steril eldiven kullanılarak toplandı. Toplanan materyal, kontaminasyona engel olmak için farklı odalarda 1 gün süreyle kurutma kağıtlarına serilerek kurumaya bırakıldı. Daha sonra kuruyan erkek çiçeklerin üzerine steril bir çubuk yardımıyla vurularak polenlerin kağıt üzerine dökülmesi sağlandı. Dökülen polenler spatül ile toplanarak renkli cam şişelere konuldu. Polenlerin kurumasını sağlamak amacıyla 24 saat desikatörde tutuldu. Kurutma işleminin en iyi şekilde sağlanması için desikatör içerisine nem alıcı (desikant) olarak silika jel konuldu. Kurutma işleminden sonra kuruyan polenler, farklı por çaplarına (250, 180, 90, 63 milimikron) sahip steril eleklerden geçirilerek diğer partiküllerden kurtarıldı. Eleme işlemine 250 milimikron (= nm) por çapına sahip elek kullanılarak başlandı. Son olarak 63 milimikron (nm) elekten geçirildikten sonra altta kalan polenler toplama kabında biriktirildi (Şekil 3.1- 3.2).



Şekil 3.1: Polen örneklerinin kurutulması



Şekil 3.2: Toplanan Polenlerin Elenmesi

Eleme işleminden sonra polenlerin içerisinde bulunan yabancı partiküllerden ayırmak için asetonla yıkama yöntemi uygulandı. Bu yöntemle göre hassas terazide tartılan polenler aseton ilave edilip çalkalandı, yabancı partiküllerin yüzdürülerek polenlerden ayrılması sağlandı. Polen aseton karışımı mikroependorflara bölünerek 1 saat santrifüj (Hettich Zentrifugen Mikro 200, + 4 °C’ de 11.000 rpm’de) edildi. Santrifüjden alınan örneklerin süpernatant kısımları ayrılarak + 4 °C’ de muhafaza edildi. Kalan pellet kısmı ise 37 °C’ ye ayarlanmış etüvde 1 gün süreyle kurumaya bırakıldı. Daha sonra küflenmeye engel olmak için etüvden alınan polenler desikant silika jel konulan vakumlu desikatörde 48 saat boyunca kurutuldu. Elde edilen polenler steril cam kaplara konuldu, ağzı parafilm ile sarılarak kapağı kapatıldı. Cam kapların dış kısmı ışık görmeyecek şekilde alimünyum folyo ile kaplandı ve polenler çalışmada kullanılmaya hazır halde + 4 °C’ de muhafaza edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Polenlerin asetonla yıkama ve etuvde kurutulması işlemi

3.4 Polen Morfoloji Çalışmaları

Bu çalışmada kullanılan üç farklı türe ait polen örneklerinden aynı zamanda Wodehouse yöntemine [51] göre mikroskopta incelemek ve fotoğraflamak üzere preparatlar hazırlanmıştır.

3.4.1 Wodehouse Yöntemi

Çiçek anterlerinden alınan ve saflaştırılan polenler, temiz bir lam üzerine konarak, üzerine reçine ve yağların erimesi için %96' lık alkolden 2-3 damla damlatıldı. Preparat ısıtıcı üzerinde alkol buharlaşınca kadar bir süre bekletildi. Daha önce hazırlanan bazık fuksin eklenmiş gliserin jelatinden 2 mm³ kadar alınarak lam üzerine konuldu ve ısıtıcıda erimesi sağlandı. Polenlerin gliserin jelatin ile iyice karışmasını sağlamak amacıyla steril iğne ucu kullanılarak hafifçe karıştırıldı. Lam üzerine 45 °C' lik açılı ile lamel kapatıldı, etrafına entellan (kanada balsamı) sürülerek kurumaya bırakıldı ve daimi preparat haline gelmiş oldu. Hazırlanan preparat üzerine

polenlerin hangi bitki türüne ait olduğu ve hangi tarihte yapıldığını gösteren etiketler yapıştırıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Polen preparatlarının hazırlanışı

3.4.2 Gliserin Jelatin Hazırlanması

7 g toz şeklinde jelatin tartılarak steril edilmiş erlen içine konuldu. Üzerine 42 mL distile su ilave edildi ve 2 saat şişmesini sağlamak için bekletildi. Jelatinin erimesi için 80 °C' ye ayarlanmış su banyosunda 15 dk süreyle cam baget yardımıyla karıştırıldı ve ısıtıldı [52]. Isıtma işlemi homojen bir hal alınca kadar devam edildi. Sürenin sonunda karışıma 50 mL gliserin eklendi ve birbirleriyle iyice karışmaya kadar 15-20 dk daha su banyosunda tutuldu. Bakteri ve mantar kontaminasyonundan korumak için karışıma %2' lik asetik fenil' den 1 mL ilave edildi [53]. Gliserin-jelatin karışımına polenlerin görünürlüğünü artırmak için boya maddesi olarak 2 mL bazik fuksin eklendi. Steril cam petri kaplarına eşit miktarlarda dökülerek soğumaya bırakıldı. Petri kaplarına, hazırlanma tarihini belirten etiketleme işlemi yapıldıktan sonra, kullanılmak üzere + 4 °C' de muhafaza edildi. Katılaşmış donan karışım kullanılmak istendiği zaman temiz spatül yardımıyla bir miktar alınarak lam üzerine

sürüldü. Daha sonra homojen bir hal alması için lam ısıtıcı üzerine konarak 5 dk kadar tutuldu. Bu sayede homojen olarak dağılmış olan karışımdaki polenler daha net şekilde görüldü.

3.5 Polenlerin Ölçümü

Wodehouse yöntemine göre hazırlanmış daimi preparatlarda, çalışma için kullanılan her bir türe ait polenlerin ölçümleri yapıldı; polen çapı, ekzin kalınlığı ve apertür çapı ölçülerek kaydedildi. Işık mikroskobunda polenlerin morfolojik analizleri Nikon ECLIPSE TS 100 marka mikroskop ile yapılmış olup, ölçümler için X 40' lık objektif kullanılmıştır.

3.6 Polen Fotoğraflarının Çekilmesi

Bu çalışma kapsamında incelenen üç farklı türe ait polenlerin mikro fotoğrafları Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümündeki Nikon ECLIPSE TS 100 marka mikroskoba bağlı tam otomatik mikrofotografi cihazı ile çekilmiştir. Elde edilen polen mikrofotograflarının büyütmesi X 40' tır.

3.7 Ekstraksiyon İçin Gerekli Olan Reaktifler

3.7.1 'Coca' Çözeltilisinin Hazırlanması

Polenin içindeki etken maddenin ekstraksiyon materyaline geçebilmesi için 'coca' çözeltisi kullanıldı. 'Coca' çözeltisi Pasteur Enstitüsünde uygulanan yöntemine göre, aşağıda gösterildiği gibi hazırlandı [54].

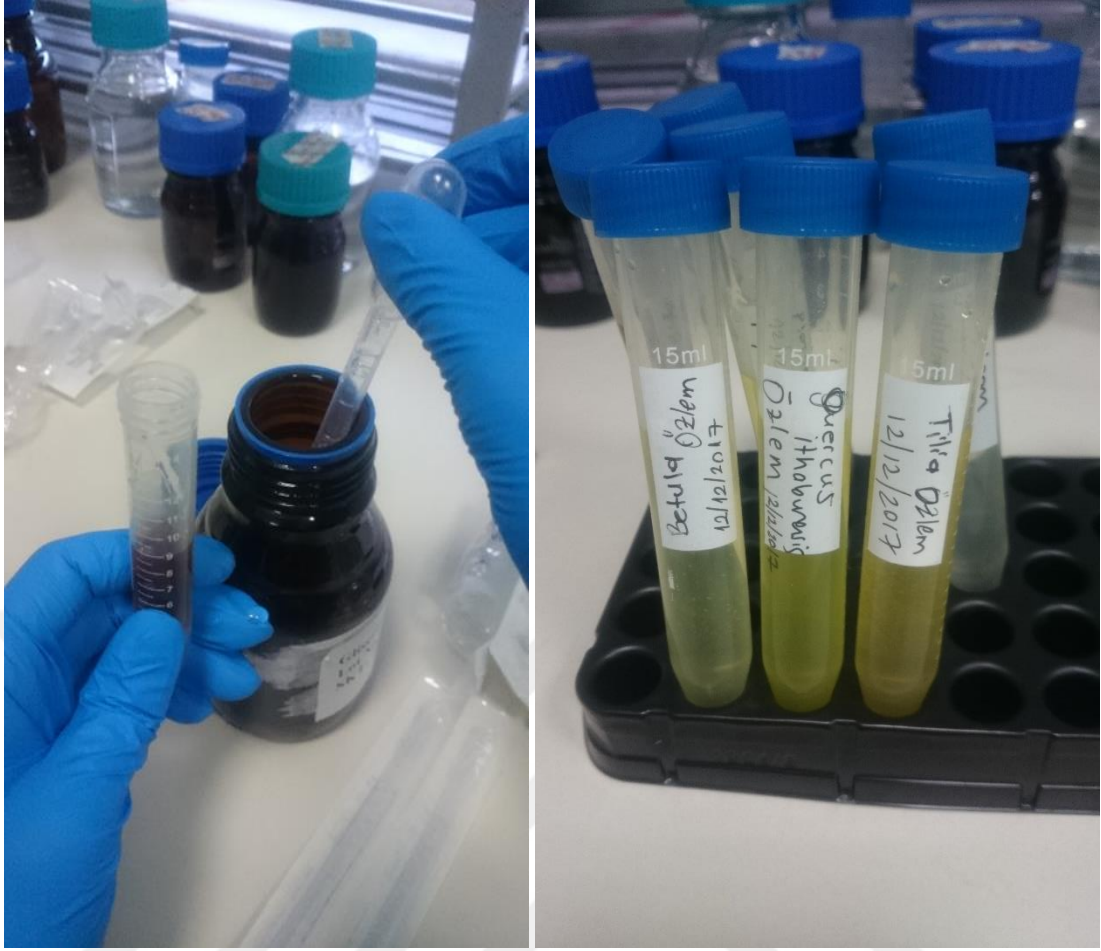
Tablo 3.1. Coca çözeltisi içeriği

NaCl	9 g
NaHCO₃	3 g
C₆H₅OH	5 g
+ Distile Su	
TOPLAM:	1000 mL

Distile su içerisinde sırasıyla NaCl, NaHCO₃ ve C₆H₅OH Çözüldü. Hazırladığımız 'coca' çözeltisinin pH' sı % 10' luk NaOH den birkaç damla ilave edilerek 8,2' ye ayarlandı [54].

3.8 Polen Ekstrelerinin Hazırlanması

Gaziantep Üniversitesi kampüsüne ait araziden temin edilen polenlerin etken maddelerin ekstre edilebilmesi için Aytuğ B. ve arkadaşlarının (1996) tarif ettiği ekstraksiyon yöntemi kullanıldı [54]. Her bir türe ait polenden hassas terazi (Denver Instrument) ile 500 mg tartılarak steril tüplere konuldu. Üzerine önceden hazırlanan ‘Coca’ çözeltilisinden 4,5 mL ilave edildi. Elde edilen karışım + 4 °C’ de manyetik karıştırıcıda 1 gün süreyle karıştırıldı. Bu sürenin sonunda karışım 10 mL kapasiteli santrifüj tüplerine alınarak Hettich Universal 320R markalı santrifüj cihazında 2750 devir/dakika (rpm) ayarlanmak suretiyle 10’ ar dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin sonunda çökelen polenlerin üst kısmında kalan sıvı tekrar santrifüj edilmek üzere ayrıldı. Bu uygulama sıvı kısmında çökelen polen kalmayınca kadar 10 ile 12 kez tekrar edildi. Ekstraksiyon işleminin amacı polenin içerdiği etken maddenin açığa çıkarılmasıdır. Uygulama sonunda çöken polen artığı gözlenmemesine rağmen diğer tortulardan da arındırılabilmesi için süzme (filtrasyon) işlemi uygulandı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Polen ekstratelerinin hazırlanışı

3.9 Süzme (Filtrasyon) Yöntemi

Ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen polen ekstratelerine Aytuğ ve ark. (1991)'nın belirttiği şekilde filtrasyon işlemi uygulandı [55]. Bu işlemde polen ekstraktı üzerine 5 mL'ye tamamlanacak şekilde 'Coca' çözeltisi eklendi. Enjektör filtresi (Isolab PVDF 0.45 µm) yardımıyla her polen ekstraktı için süzme işlemi yapıldı ve 15 mL kapasiteli steril flakonlara konuldu. Daha sonra ekstratlara %50 oranında gliserin karıştırılarak ağızları kapatıldı. Bu şekilde gliserin eklenerek hazırlanmış ekstrateler buzdolabında + 4 °C' de 3 yıl kadar muhafaza edilebilir.

3.10 Polenin Kuru Ağırlığının Hesaplanması

Çalışma için elde edilen polenlerin kuru ağırlığını tespit etmede kullanılan dara kaplarının ağırlıkları hassas terazi ile tartıldı. Dara kapları 110 °C' ye ayarlanmış etüvde 2 saat süreyle tutuldu. Sürenin sonunda soğutulan kaplar tekrar tartıldı. Polen örneğinden 10 mg tartıldı ve üzerine 3 mL saf su ilave edildi. Bu karışımdan 1'er mL alınarak dara kaplarına konuldu. İçerisine desikant konularak 110 °C' ye ayarlanmış bir etüve konularak suyu buharlaştırıldı. Karışımdaki suyun buharlaşmasının kolaylaştırmak için etüve nem çekici özelliği olan kuru bakır (II) sülfat (CuSO₄) konuldu. Bu sürenin sonunda kaplar soğutuldu ve tekrar tartıldı (alt kapak 70,003 g, üst kapak 71,006 g). Sonuç olarak polenlerin kuru ağırlığı hesaplanarak bulundu.

1. Petri kabının alt kapağında tartılan polen kuru ağırlığı: 0,003 g
2. Petri kabının üst kapağında tartılan polen kuru ağırlığı: 0,006 g

3.11 Polen Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çalışmada sensitif protein tayin yöntemlerinden birisi olan 'bişinkoninik asit (BCA)' temelli protein analizi kullanıldı. Total protein kantitatif tayininde ve kolorimetrik tespitinde çok sensitif ve deterjan uyumlu bir metottur. Bu metod, iyi bilinen Biuret reaksiyonunun bir kombinasyonudur, alkali ortamda proteinlerin Cu⁺², nin Cu⁺¹, e indirgemesi, kupröz (Cu⁺¹) katyonun bişinkoninik asit içeren reagent ile birlikte çok sensitif ve selektif olarak kolorimetrik tespitini içerir. Bu analizin mor renkli reaksiyon ürünü, iki molekül BCA nın bir Cu⁺¹ iyonu ile şelasyonu yoluyla meydana gelir. Bu suda çözünür kompleks 562 nm' de çok güçlü bir absorbans gösterir [57].

BCA protein reaksiyonu:

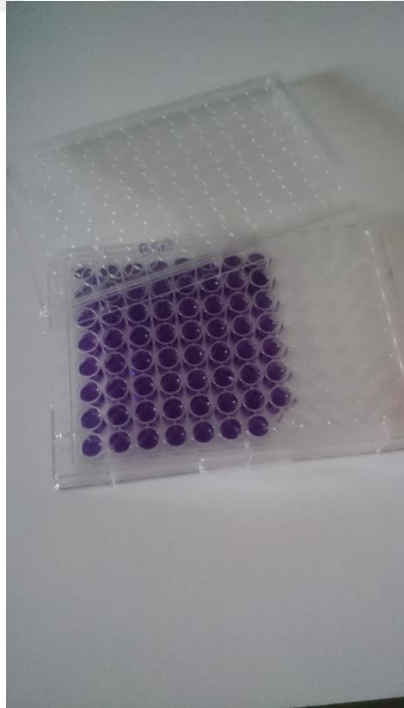
1. Protein (peptid bağları) + Cu⁺² → Cu⁺¹ Biuret kompleksi
2. Cu⁺¹ + 2 Bişinkoninik asit → BCA - Cu⁺¹ kompleksi (mor renkli, 562 nm' de okunur)

İyi şekilde standardize reaktifler, reaksiyon ürünlerinde 562 nm' de, 25-1000 µg/mL kadar geniş bir aralıkta, artan protein konsantrasyonları ile lineer bir artış sağlarlar. Makromoleküler protein yapısı, peptid bağlarının sayısı ve 4 aminoasidin varlığının (sistein, sistin, triptofan ve tirozin) BCA ile renk oluşumundan sorumlu olduğu bildirilmiştir [57].

Bu çalışma kapsamında Gaziantep Üniversitesi kampüsünün arazisinden elde edilen polen örneklerinin ekstraksiyonu işleminden sonra, total protein konsantrasyonunu saptamak için bişinkoninik asit (BCA) yöntemine [56] göre çalışan BCA Protein Macro Assay Kit (Serva Electrophoresis GmbH) kullanıldı. BCA yönteminin ilkesi proteinlerin, alkali bir çözeltide (biüre reaksiyonunda) Cu^{+2} yi Cu^{+1} e indirgeyebilmesi ve bişinkoninik asit ile mor renge dönüşmesine neden olmasıdır. Polen örnekleri saf su içerisinde 5:1 (ağırlık:hacim) oranında çözündürüldükten sonra 96 kuyucuklu plakalara 3 tekrarlı ve her bir kuyucukta 20 μL olacak şekilde eklendi. Üzerine 200 μL , kit içeriğindeki A reaktifi (BCA Solüsyonu) ile B reaktifinin (Bakır Sülfat Solüsyonu) 50:1 oranında karıştırılmasıyla (100 mL reaktif A' ya 2 mL reaktif B eklendi) hazırlanan çalışma solüsyonu kuyucuklara eklenerek plaka 37 °C' de 30 dk bekletildi. Ardından 562 nm' de kör örneğe (saf su) karşı absorbens ölçümü alındı (Thermo Scientific Multiskan Go). Bu işlemlerin öncesinde standart grafiğin oluşturulmasında ise kit içerisindeki sığır serum albumini ("Bovine Serum Albumin", BSA) standartı ve kör örnek olarak saf su kullanıldı. Farklı konsantrasyonlarda (1, 0.75, 0.50, 0.25, 0.10, 0.05, 0.025 mg/mL) hazırlanan standart protein örneklerinin konsantrasyon ve absorbens değerleri kullanılarak standart grafik oluşturuldu. Oluşturulan standart grafiğin matematiksel ifadesi, lineer regresyon doğrusunun denklemi şeklindedir. Polen ekstraktlarının protein konsantrasyonu bu lineer regresyon grafiği için elde edilen doğrunun denklemi yardımıyla hesaplandı (Şekil 3.6-3.7).



Şekil 3.6: Polenlerin total protein konsantrasyonun ölçümü



Şekil 3.7: Polen ekstratlarının protein konsantrasyonlarının ölçümü

BÖLÜM 4

BULGULAR

4.1 Polenlerin Mikrofotoğrafları

4.2 Bitki Türlerinin Mikrofotoğrafları

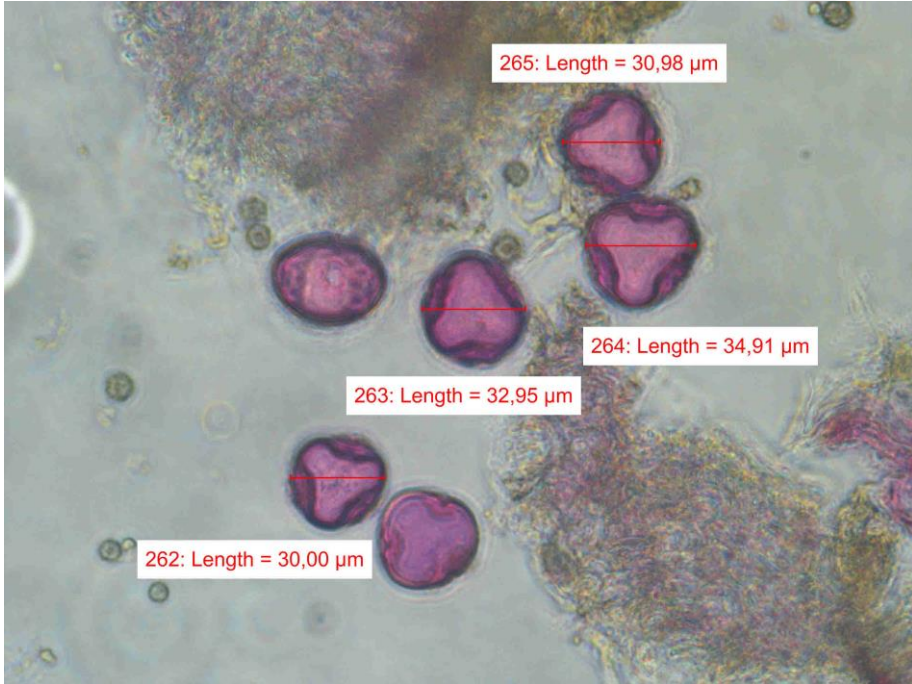
Betulaceae ailesine ait *B. alba*, Fagaceae ailesine ait *Q.ithaburensis* Tiliaceae ailesine ait *T. cordata* türlerinin polinizasyon dönemlerinde toplanan çiçeklerinden polenler saflaştırıldı. Daha sonra Wodehouse metodu kullanılarak polen preparatları hazırlandı. Nikon ECLİPSE TS100 marka ışık mikroskopuyla polen mikrofotoğrafları çekildi. Polenlerin, ekzin, por çapı ve polen çapları ölçüldü.



Şekil 4.1: *B.alba* 'nın polen mikrofotoğrafları Nikon ECLİPSE TS100 marka mikroskop ile yapılmış olup ölçümler için ise X40' lık objektif kullanılmıştır.



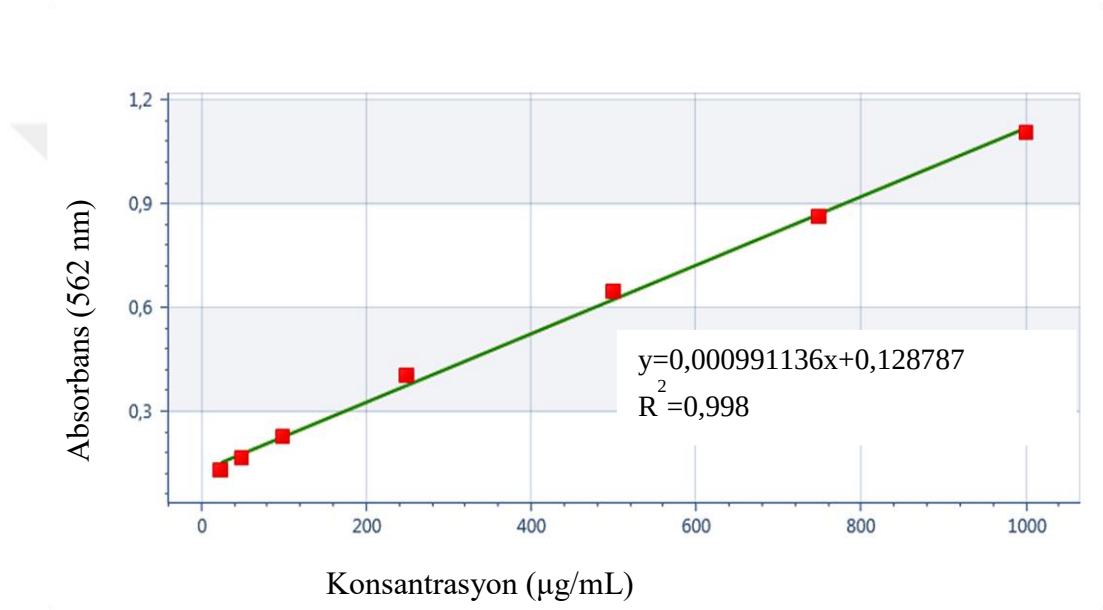
Şekil 4.2: *Q. ithaburensis* 'in polen mikrofotografı Nikon ECLİPSE TS100 marka mikroskop ile yapılmış olup ölçümler için ise X40' lık objektif kullanılmıştır.



Şekil 4.3: *T. cordata* 'nın polen mikrofotografı Nikon ECLİPSE TS100 marka mikroskop ile yapılmış olup ölçümler için ise X40' lık objektif kullanılmıştır.

4.3 Polen Ekstreleri ve Protein Konsantrasyonu

Polen ekstrelerindeki protein konsantrasyonu BCA Protein Macro Assay Kit (Serva Electrophoresis GmbH) kullanılarak belirlendi. Çalışma süresince hazırlanan ekstrelerin protein konsantrasyonları sığır serum albümin (BSA) standartları (0.0313, 0.0625, 0.125, 0.250, 0.5, 1 mg/mL) ile çizilen standart grafik yardımı ile saptandı. Oluşturulan standart grafiğin matematiksel ifadesi, lineer regresyon doğrusunun denklemi şeklindedir. Polen ekstrelerinin protein konsantrasyonu bu grafik için elde edilen doğru denklemi yardımıyla hesaplandı (Şekil 3.17).



Şekil 4.4: Protein konsantrasyonun belirlenmesinde kullanılan standart grafik ($R^2=0.998$). Sığır serum albümin (BSA) standartlarının (0.0313, 0.0625, 0.125, 0.250, 0.5, 1mg/mL) 562 nm absorbans değerleri kullanılarak çizilmiştir.

Çalışmalar sırasında kullanılan polen ekstrelerinin protein konsantrasyonları, polen örnekleri saf su içerisinde 5:1 (ağırlık:hacim) oranında çözündürüldükten sonra *Betula alba* poleni için 1156,7067 µg/mL olup, aynı hacimdeki su içinde çözündürülen *T. cordata* örneği için 1259,2826 µg/mL ve *Q. İthaburensis* türü için 919,941 µg/mL olarak saptandı. Elde edilen veriler doğrultusunda, çalışılan üç polen örneğinden *T. cordata* türüne ait polenlerin diğer polen türlerine göre daha yüksek oranda protein içerdiği belirlendi.

Deri prik testinde kullanılmak üzere hazırlanmış olan Allergopharma markalı ticari polen ekstraları kontrol grubu olarak kullanıldı ve protein konsantrasyonları

ölçüldü. *B. alba* türü için 788,44242 µg/mL, *Q. İthaburensis* türü için 757,83781 µg/mL olup, *T. cordata* türü için ise 815,347 µg/mL olarak saptandı (Tablo 4.6).

Tablo 4.1: Polen ekstrelerimiz ile ticari polen ekstrelerinin protein konsantrasyonlarının karşılaştırılması

	Ölçümler	Ortalama	Standart Sapma	SONUÇLAR µg/mL
<i>B.alba</i> TİCARİ	0,645/0,635/0,678	0,653	0,018373	788,44242
<i>B.alba</i> SAF	0,911/1,209/0,933	1,018	0,135591	1156,7067

	Ölçümler	Ortalama	Standart Sapma	SONUÇLAR µg/mL
<i>Q.robur</i> TİCARİ	0,611/0,619/0,637	0,622	0,010873	757,83781
<i>Q.ithaburensis</i> SAF	0,766/0,765/0,818	0,783	0,024752	919,94136

	Ölçümler	Ortalama	Standart Sapma	SONUÇLAR µg/mL
<i>T.cordata</i> TİCARİ	0,655/0,691/0,692	0,679	0,017211	815,34757
<i>T.cordata</i> SAF	1,110/1,145/1,103	1,119	0,018373	1259,2826

5. BÖLÜM

TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, aeroalerjenlerden kaynaklanan alerjik hastalıklara sahip bireylerin sayısında anlamlı bir artış olduğu gösterilmiştir [3-4]. Alerjik duyarlanmaya ve alerjik hastalık bulgularının ortaya çıkmasına neden olan en önemli alerjenlerden biri polenlerdir. Birçok alerjik protein içeren, hassas bireylerde duyarlılık gelişmesine ve bunu takiben hastalık bulgularının oluşmasına neden olan polenlerin, çiçekte erkek organ (stamen) içerisinde oluştuktan ve olgunlaştıktan sonra döllenme için dişi organa taşınmaları gerekmektedir. Polinizasyon adı verilen bu olayda polenler en sık rüzgar ve böceklerle taşınmaktadırlar. Böceklerle tozlaşan bitkiler genelde az miktarda ancak yüzeyleri girinti çıkıntılı ve yapışkan polenler üretirken; rüzgarla tozlaşan bitkiler, çok miktarda, küçük, hafif, kuru, yüzeyleri düz olan polenler üretmektedirler. Bunun amacı, rüzgar ile uzak mesafelere taşınabilirliği sağlayıp döllenmenin garanti altına alınabilmesi olarak yorumlanabilir [58].

Bu polenlerin bir kısmı dişi organa ulaşır tozlaşmayı garanti altına alırken, takip eden döllenme ve tohum oluşumu ile bitkinin soyunun devamı sağlanır. Bir kısmı da gerek polen gerekse alerjenik proteinleri olarak, solunum sistemimizin burundan başlayarak akciğer bronşlarının en küçük bronşiyollerine varıncaya kadar ulaşabilmekte; böylelikle de duyarlı bireylerde alerjik rinokonjunktivit ve alerjik astım bronşiyale gibi solunum yolu hastalıklarına neden olabilmektedirler [58].

Polen alerjenleri, suda çözünebilen stabil proteinler ya da sıklıkla glikoproteinlerdir ve polenin dişi organa ulaşarak gerekli sıcaklık ve neme ulaşmasıyla meydana gelen uyum-tanım reaksiyonlarında, polen tüpünün oluşması, büyümesi ve gelişmesinde kritik role sahip proteinlerdir [2, 58].

Proteinlerin alerjenisitesi mukozal bariyerleri aşmasına, çözünebilirliğine ve moleköl büyüklüğüne bağılı olarak değışiklik göstermektedir [9]. Son 2 dekatta polen türevi alerjik proteinlerin moleköler özelliklerinin anlaşılmasında büyük gelişmeler yaşanmıştır. Polen alerjenleri üzerine geniş miktarda bilgi Allergome (www.allergome.org) veya Allergen (www.allergen.org) veri tabanlarından sağlanabilmektedir [11]. Polen alerjen proteinleri, totalde 7868 protein ailesi içinde sadece 29 aile içinde sınıflandırılmış olan, aile içi benzer diziliş özelliğı gösteren proteinlerdir [11]. Ig E epitop bağlanma bölgelerindeki diziliş benzerliğı, belirli türler arasında var olan çapraz reaktivitenin nedeni olarak gözlemlenmektedir [45].

En çok alerjenik ağaç poleni Kuzey, Orta ve Doğı Avrupa da Huş ağacı (*Betula*) tarafından salınır [12]. Fagales takımına ait ağaç polenleri, ılıman iklim kuşağında Kış/İlkbahar aylarının ana alerjik rinit sebebidirler. Fagales takımı; Betulaceae ve Fagaceae' nin de dahil olduğı toplam 8 aileden oluşmasına rağmen Betulaceae (*Alnus*, *Betula*, *Carpinus*, *Corylus*, *Ostryopsis* ve *Ostrya*) ve Fagaceae (*Fagus*, *Castanea* ve *Quercus*) ailelerinin üyeleri en sıklıkla alerji ile ilgilidirler. Tiliacea türleri ile alerjiye daha nadiren rastlanmaktadır [13-16].

Betulaceae ailesine ait *Betula* türleri Avrupa' da ve ülkemizde hem doğıal yayılış gösteren hem de şehir parkları, bahçeler, yol kenarları ve refüjler gibi pek çok alanda gerek estetik dış görünüşü gerekse soğığa olan direnci gibi sebeplerle dikimi tercih edilen ağaçlardır [37, 58]. Huş ağacı polen alerjenlerinin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda *Betula verrucosa* türünde 9-35 kDa arasında (Bet v 1-7) alerjen proteinler saptanmıştır [12, 58]. *Betula* polen alerjisi bulunan hastaların %90' ından fazlasında major alerjen Bet v 1' dir [12, 58].

İzlanda, Norveç, Danimarka, İsveç, Estonya, Litvanya ve Rusya' yı kapsayan 7 ülkeden 24 alerji kliniğindeki astım ve/veya alerjik rinitli 407 çocuk, 1706 erişkin toplam 2113 duyarlı bireyde gerçekleştirilen deri prik testi sonuçlarına göre *Betula* polen duyarlılığının; erişkinlerde %9-78, çocuklarda %43-51 arasında olduğu tespit edilmiş, tüm çalışma değerlendirildiğinde ise bu bireylerin %43' ünün *Betula* polenlerine duyarlı olduğu görülmüştür [58, 59]. İspanya' da polen alerjisi bulunan 222 hastanın, %10,75' i monosensitizasyon şeklinde olmak üzere, %41,89' u *Betula alba*' ya karşı pozitif reaksiyon vermiş; pozitif reaksiyon verenlerinde %41,93' ünde alerjik astım bronşiyale rapor edilmiştir [58,60]. Zagreb' te yapılan bir çalışmada Peternel ve ark. (2002) alerji şikayeti ile başvuran 18-80 yaş arası 864 hastada yaptıkları deri prik testleri sonucu %26,7 oranında *Betula* polen duyarlılığı tespit etmişlerdir, ancak monosensitizasyon oranı %2,67' de kalmıştır [61]. Bazı ülkelerde *Betula* polenlerine karşı duyarlılığın zaman içinde arttığı tespit edilmiştir. Belçika' da *Betula* polen duyarlılığı 1975-1979 yılları arasında %13 iken, 1992-1995 yılları arasında %34 olarak bulunmuştur [62]. İtalya' nın kuzeyinde peyzaj mimarlarının son yıllarda estetik güzellikleri nedeni ile şehir parklarında *Betula* türünden ağaçları yaygın şekilde kullanmaya başlamalarıyla birlikte *Betula* polen duyarlılığında artış olduğu tespit etmişlerdir [63]. Çok sayıda makalede de belirtildiği gibi *Betula* cinsi ağaçlar son derece yüksek alerjenisiteye sahip polenleri ile duyarlı kişilerde alerjik hastalıklara yol açabilen veya mevcut hastalıkları tetikleyebilen ağaçlardır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar sıcaklık artışı ile *Betula* polen sayısı artışı arasındaki ilişkiyi de ortaya koymuştur. İsveçre' de Frei ve ark. (2008) yaptığı çalışmada 38 yıllık izlemde sıcaklık artışı ile *Betula* polen miktarlarının arttığını tespit etmişlerdir [64]. 1 m³ havadaki polen miktarı 20-30 adet arasında olduğunda alerjik bireylerde semptomların görülmeye başlandığı, 80 ve üstü olduğunda hastaların %90' nında hastalık semptomlarının net şekilde görüldüğü tespit edilmiştir [65- 66]. Ülkemizde de alerjik rinit ve/veya astımlı bireylerin *Betulaceae* polen duyarlılığı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. 2012 tarihli Bıçakçı ve ark. (2016)' nın yapmış oldukları çalışmada Bursa ili atmosferinde, ana polen sezonunda havadaki alerjenik *Betula* polenlerinin günlük değişimlerini tespit etmişlerdir, semptomların başlaması için 1 m³ havadaki polen miktarı eşik değerinin 30 ve üzeri olduğu kabul edildiğinde, 18-21 Mart günlerinin duyarlı bireyler için hastalık riski olan günler olduğu tespit edilmiştir [38]. Atmosferik polen araştırmalarının yapıldığı bölgelerin çoğunda *Betula* polenleri

atmosferde yoğun ve dönemsel olarak yüksek miktarlarda görülmeleri ile karakterize olmuşlardır. Son yıllarda park, bahçe, yol kenarları gibi alanlarda dekoratif amaçlı yetiştiriciliğinin yaygınlaştığı *Betula* cinsine ait ağaçların çok fazla polen üretmeleri, atmosferde yoğun olarak ve uzun süreler bulunabilmeleri, alerjenik protein sayılarının fazla olması, alerjenisitelerinin yüksek olması, alerjenik proteinlerinde çapraz reaktivitelerin görülebilmesi gibi sebeplerle duyarlı bireylerde hastalık oluşturma riski yüksek olan ağaçlardır. Bu açıdan değerlendirildiğinde şehir park ve bahçelerinde, yol kenarlarında sıklıkla kullanılmalarının alerjik hastalık görülme sıklığını arttırdığı ortaya konulmuş iken, bu bölgelerdeki ağaçlandırma çalışmalarında alerjenik potansiyeli daha düşük olan ağaç türlerinin seçilmesinin toplum sağlığı ve koruyucu hekimlik açısından çok doğru bir yaklaşım olacağı aşikardır.

Fagales takımının ağaç polenlerine karşı duyarlanma popülasyonun %23' üne kadar gözlenebilmektedir. *Betula* poleninin major alerjeni, Bet v 1, detaylı bir şekilde çalışılıp aydınlatılmıştır. PR-10 (patogenezis ile ilişki protein sınıf - 10) protein ailesine ait, 17 kDa' luk bir alerjendir. Bet v 1' in çok sayıda farklı izoformları tanımlanmıştır. Çalışmalar, yüksek miktarda polen maruziyetinin olduğu Huş polen alerjik hastalarda Bet v 1' e karşı Ig E reaktivitesinin prevalansının %95' den fazla olduğu göstermiştir. İlişkili ağaçlardan kaynaklanan polenler ve çeşitli sebze ve meyvelerde homolog alerjenler tanımlanmıştır [45]. *Quercus*, Fagaceae ailesindeki en geniş cinstir [46]. Meşe (*Quercus*) polenine karşı alerji Avrupa ve Kuzey Amerika' nın bazı bölgelerinde büyük bir problemdir. İspanya' da, Madrid' te, polen alerjik hastaların %14' ü Meşe polenine karşı duyarlanmıştır. İsveç' te bu rakam polen alerjik bireylerde bahar aylarında %70-80' lere çıkmaktadır. Que a 1, önemli bir Meşe polen alerjenidir ve PR-10 protein ailesine aittir. İlişkili ağaç polenlerinden (Bet v 1, Aln g 1, Cor a 1, Car b 1), meyvelerden (Mal d 1, Pru av 1, Pyr c 1), ve sebzelerden (Api g 1, Dau c 1) elde edilen diğer PR-10 alerjenleri gibi benzer Ig E bağlanması sebebiyle, Bet v 1 ile yüksek oranda çapraz reaktivite gösterirler. Bu çapraz reaktivite özelliği, yüksek *Betula* duyarlılığı nedeni ile meşe alerjeni Que a 1' in de yüksek alerjenitesinin sebebi olarak düşünülebilir. Pek çok PR-10 alerjeni rekombinant alerjenler olarak klonlanmış, dizilimi anlaşılmış ve eksprese edilmiş olmasına rağmen, Que a 1' in biyokimyasal ve immünolojik özelliklerine ait bilgi sınırlıdır. İpsen ve Hansen (1991), polen ekstraktından Que a 1' i saflaştırmışlar ve

çeşitli ayrılmış alanlarla birlikte 24 rezidü uzunluğundaki N terminal aminoasit dizilimini tanıtmışlardır [44]. Daha sonraları Moverare ve arkadaşları (2008) meşe polen ekstraktlarından native (n) Que a 1' i, Bet v 1' e karşı geliştirilmiş monoklonal antikolar ile afinite kromatografisi kullanarak saflaştırmışlar, biyokimyasal ve immünolojik olarak özelliklerini tespit etmişlerdir [45]. Saflaştırılmış doğal alerjenlere karşı yaygın şekilde kullanılan argüman, preparasyonlar arasında saflık farkının olabileceğidir. Küçük miktarda kontaminant alerjen, yalancı pozitif sonuçlar verebilir ve spesifik Ig E konsantrasyonlarının hatalı belirlenmesine neden olabilir. Moverare ve ark.'nın (2008) çalışmasında tek basamaklı saflaştırma ile yüksek saflıkta nQue a 1 elde edilmiş, gümüş boyalı SDS-PAGE' de kontaminant protein gözlenmemiş, dahası iki boyutlu PAGE ve kütle spektrometrisinde (MS) tek bir tür proteinin bulunması saflaştırma yönteminin doğruluğunu ispatlamıştır [45].

Rekombinant veya saflaştırılmış doğal alerjenler, alerji tedavisinde kullanılan spesifik immunoterapi için uygun polen aşısının seçimi esnasında gerekli olan sensitizasyon (duyarlanma) paternlerinin çalışılmasında önemlidirler. Rekombinant alerjenlerin çoğu, spesifik Ig E' nin in vitro analizlerinde kusursuz performans gösterirler, saflaştırılmış doğal alerjenler bu noktada iyi bir alternatif olabilirler. Bazı durumlarda doğal alerjenler, onların rekombinant kopyalarından çok daha iyi performans bile gösterebilirler. Doğal alerjenlerin avantajı, bakteri içinde üretilen rekombinant alerjenlerden sıklıkla daha yüksek immunoreaktivite göstermeleridir. Sebebi, bakteriyel ekspresyon sisteminde rekombinantların uygun katlanmasının başarılmasının zor olabilmesidir. Ek olarak, doğal alerjenlerin preparatları, farklı Ig E bağlanma epitopları eksprese ettirebilen yine sıklıkla farklı izoform ve izovaryantların panelinden oluşur. nQue a 1' in korunmuş immunoreaktivitesi, spesifik Ig E inhibisyonu yoluyla gösterilebilir, iki boyutlu PAGE Moverare ve ark.'nın (2008) çalışmasında elde edilen nQue a 1' in en az 5 izoformdan oluştuğunu göstermiştir [45].

Meşe polen alerjisinin tanısı, farklı bitkilerin polinasyon mevsimlerinin sıklıkla üst üste binmesi nedeniyle zor olabilir ve hasta organların polen ekstraktları ile provokasyonu genellikle yapılmaz. Bu tanıyı zorlaştıran bir durum olarak ortadadır [45].

Gelecekte polen alerjileri, bugün kullanılan sıradan basit polen ekstraktlarının yerine, rekombinant alerjenler içeren aşılarda kullanılan spesifik immunoterapiler ile tedavi edilebileceklerdir. Bu çok daha etkili bir tedavi seçeneği olabilir ve polen ekstraktlarındaki ilgisiz alerjenlere karşı edinilmiş yeni duyarlanmaların riskini azaltabilirler [45].

Tüm bu yorumlara rağmen rekombinant DNA teknolojileri yolu ile elde edilen bu rekombinant alerjenlerin maliyetleri hala oldukça yüksektir. Hal böyle iken doğal (native) alerjenlerin yüksek saflıkla elde edilebildikleri polen ekstraktlarında alerji tanı testleri ve alerjen immunoterapilerde kullanımı hala mümkün görünmektedir. Üstelik polen ekstraktları alerjenlerin daha fazla izoformlarını içeriyor olmaları itibarı ile üstünlüğe de sahiptirler. Biz de bu tez çalışmamızda elde ettiğimiz polen ekstraktlarını ticari olanlar ile karşılaştırdık. Burada amacımız maliyet etkin olarak üretilen bu ekstraktların, ilk etapta alerjik hastalıkların tanı testlerinde (deri prik testi, nazal provokasyon testi gibi) kullanılan ticari formlar ile karşılaştırmasını yapmak ve eksiklik tespit edilirse geliştirme çalışmaları ile uygun fiyatlı ve yerli bir tanı testi amaçlı polen ekstraktı yelpazesi hazırlayabilmektir. Bu noktada ilave duyarlanmalar oluşturmamak için sağlanması gerekli olan ‘yüksek saflık’ sorunu önümüzde geliştirilmeyi bekleyen bir konu olarak durmaktadır.

Tiliaceae ailesinden incelediğimiz *Tilia cordata* türüne ait literatürde Mur ve ark. 'nın 2001 tarihli kısa çalışması dışında kapsamlı bir çalışmaya, bugüne kadar yapılan araştırmalar içinde rastlayamadık [16]. Az sayıdaki yayında *T. cordata* 'ya karşı allerjik rinit, rinokonjunktivit, öksürük ve allerjik kontakt dermatit tanımlanmıştır. İhlamuraya karşı kontakt ürtiker de bildirilmiştir [49]. *Tilia* 'ya karşı duyarlanma oranlarını, rinit ve/veya astım olan Türk çocuklarında %5,5; Portekizli allerjik çocuklarda %11,4 ve allerjisi olan Türk erişkinlerde %42,5 olarak veren [49] yayınlar olsa da özellikle allerji öyküsü olan Türk erişkinlerdeki oranın yüksekliği dikkat çekicidir. Zira bu kadar yüksek duyarlanma oranına rağmen üzerinde yayınlanmış çalışmanın birkaç makaleyi (çoğunda da ana konu Tiliaceae duyarlılığı değildir) geçmemesi verilen rakamın doğruluğu hakkında soru işaretleri yaratmaktadır [68-70]. Mur ve ark. 'nın 2001 tarihli çalışmasında ise, 21 yaşında bir kadında *T. cordata* 'ya karşı tespit ettikleri allerjik reaksiyonları rapor etmişlerdir. Bu raporda hastanın evinin yakınındaki çiçeklenmekte olan ıhlamur ağacının polenlerine karşı evinde bulunduğu her haziran ayında (evinde yok iken gelişmemektedir) burun, göz,

damak, kulak ve farenkste kaşıntı, konjunktival hiperemi, hapşırma ve gece öksürüğü bulguları ile giden bir alerji tablosunu saptamışlardır. Yaptıkları laboratuvar incelemelerinde total Ig E düzeyini yüksek ve *T.cordata* polen ekstraktına karşı deri prik testini (%5 w/v) pozitif olarak tespit etmişlerdir. Deri prik testi aynı zamanda *Lolium sp.*, *Olea sp.*, *Plantago sp.*, *Artemisia sp.*, *Platanus sp.*, *Chenopodium sp.* ve *Parietaria sp.* için de pozitif olarak saptanmıştır. Aynı hastada konjunktival provokasyon testi (0,5 mg/mL miktar ile) ve *T. cordata'* ya karşı spesifik Ig E de (27,7 kUA/L) pozitif bulunmuştur. *Lolium perenne* (13,8 kUA/L), *Artemisia vulgaris* (10,8 kUA/L), *Plantago ovata* (9,6 kUA/L) ve *Platanus acerifolia* (15,5 kUA/L) polenlerine karşı spesifik Ig E değerleri de yine pozitif bulunmuştur. Non spesifik ve *T. cordata'* ya karşı spesifik bronşiyal provokasyon testleri negatif bulunmuştur. Çapraz reaktivite değerlendirmek için kağıt diskler ile RAST (radyoalergosorbent test) inhibisyonu deneyi yapılmış ve *Lolium*, *Olea* ve *Plantago* ekstraktları ile inhibisyon olmamış; *T. cordata* ile inhibisyon olmuş, *Artemisia* ve *Platanus* polen ekstraktları ile parsiyel inhibisyon (~%30-40) gözlemlenmiştir. *T. cordata* ekstraktına SDS-PAGE sonrası Ig E immunedeksiyonu ile birkaç bant tespit edilmiştir, moleküler ağırlığı ~10 kDa ve ~23 kDa seviyesinde non spesifik olanlar ve esasen ~50 kDa seviyesinde spesifik bir alerjen protein bandı tespit edilmiştir. *Platanus* ekstraktına karşı da benzeri bantlar tespit edilmiştir fakat ~50 kDa luk bant çok zayıftır. *Platanus* ekstraktı ile *Tilia*-Ig E immunedeksiyonunun inhibisyonu küçük bantlarda çapraz reaktivitenin varlığını göstermiştir fakat ~50 kDa' luk bantta bu çapraz reaktivite gözlenmemiştir. *T. cordata'* ya ait olduğu ifade edilen bu spesifik alerjen protein daha sonraları Allergome veri tabanında **Til c** olarak adlandırılmıştır. Daha ileri analizin yapıldığı, çok sayıda hastadan elde ettiği veriyi yansıtan herhangi bir çalışmaya şu ana kadar yayınlanmış literatürler içinde rastlanmamıştır ve bu açıdan konunun karanlık taraflarının aydınlatılması için ileri araştırmalara ihtiyaç duyulduğu açıktır [16].

Alerjen ekstraktlar ideal olarak, içerdikleri major ve minör determinantlar baz alınarak standardize edilmelidir, hastaların tümü bireysel ekstraktların içindeki tüm antijenlere karşı alerjik değildirler. Parti parti devamlılığı sağlanmalı ve deri prik testi (SPT) sonuçları, farklı üreticiden aynı ekstrakt elde edildiğinde karşılaştırılabilir olmalıdır. Alerjen ekstraktlar farklı protein, glikoprotein ve polisakkaritlerin birlikteliğini içeren biyolojik karışımlardır, bu yüzden elde edilmesi zordur.

Gerçekte, farklı üreticilerden elde edilen ekstraktların aynı alerjenleri ile elde edilen SPT sonuçları benzerlik göstermemekte, çeşitlilik arz etmektedir. Bu yüzden, SPT sonuçları karşılaştırılıyorsa, uygulanan alerjen ekstrakt aynı üreticiden elde edilmiş olmalıdır. Aynı şekilde, etkili alerjen immunoterapi, bu amaçla kullanılacak ekstraktların içindeki alerjenik komponentlerin spesifik kantitasyonlarını gerektirir. Ekstraktların doğru standardizasyonu, üreticinin geniş protokolleri yerine getirmesini gerektirip, kalitelerinin garanti edilebilmesi için büyük öneme sahiptir. Her şirket kendi yaptıkları referans materyali kullanır ve kendisine özel birimler ile etkisini ifade eder (standart birim yoktur). Farklı üreticiler arasındaki bu türden çeşitlilikler, farklı ürünleri ve bunların test sonuçlarını karşılaştırılabili olmaktan çıkarır. Bununla birlikte, ilişkili alerjenlerin pek çok major alerjeni son birkaç dekatta tanımlanmıştır, konsept, kişisel ekstraktların içindeki major alerjenlerin kantitasyonlarını belirlemek olarak ifade bulmuştur. Bu tür bir kantitasyon, farklı üreticilerin sağladığı ürünler arasındaki karşılaştırmaya izin verecektir. 2001 yılında, Avrupa Birliği (EU), CREATE projesini fonlamış ve alerjen ekstraktların major alerjen içeriğine göre standardizasyonunu teşvik ettiğini bildirmiştir. Projede, major alerjen ölçümleri için referans materyal olarak rekombinant alerjenlerin kullanımı istenmektedir. Standardize ekstraktlara dair diğer bir girişim, rekombinant alerjen ekstraktlarının geliştirilmesi ile ilgilidir. Bu rekombinant alerjenlerden bazıları, kaynak materyallerinden türevlenen alerjen ekstraktlarıyla karşılaştırılabilirlik göstermiş olmalarına rağmen, onlar sadece sınırlı sayıdaki alerjeni kapsar ve hala üzerlerinde araştırma yapılmaktadır. Ekstraktlar yalancı pozitif reaksiyonlara sebebiyet vermemek için sodyum mertiyolat vb gibi ne bir koruyucu madde içermeli, ne de diğer alerjenlerle karışım yapmalıdır (örneğin ev tozu akarı ile köpek kepeği ekstraktı gibi). Ticari olmayan alerjenler ile test yapılacağı zaman, kimin alerjik olduğunun, sonuçları karşılaştırılarak anlaşılması için, alerjik olmayan bireylerden yapılacak kontrol testine ihtiyaç vardır. SPT amaçlı kullanılan ekstraktların sıkı şekilde düzenlenmesi, üretim ve kayıt süreçlerini farmasötik endüstrisi için problemlili ve maliyetli yapmaktadır. Bu durum, belirli Avrupa ülkelerinde spesifik ekstraktların kayıt işlemlerinde boşluklara neden olmaktadır [67].

Bu tez çalışmasında elde ettiğimiz polen ekstraktları, referans materyal olarak rekombinant alerjenlerden hazırlanmadığı için Avrupa Birliği (EU) mevzuatına uygun değildir. Ancak ülkemizde bu yönde tespit edebildiğimiz bir mevzuat da

henüz mevcut değildir. Avrupa ülkeleri ile mevzuat birliği oluşuncaya kadar geçecek olan zaman diliminde maliyet uygun olarak elde ettiğimiz polen ekstrahemizi sağlıklı bireylerden kontrol grubu oluşturmak sureti ile kullanmak uygun görünmektedir. Ancak yüksek saflık derecesi ile elde edilen native form alergen ekstrahemizin, alerjik hastalıkların diagnostik tarafında SPT, nazal ve konjunktival provokasyon testleri, Spesifik Ig E ölçümleri için immunoassayler gibi daha fazla sayıda tanısal testte ve hatta tedavi amaçlı alergen immunoterapide daha güvenilir olarak kullanılabileceği bilgisi, bu amaçla yapılacak araştırma-geliştirme (AR-GE) çalışmalarında araştırmacılara ışık tutacak niteliktedir.



KAYNAKLAR

1. Behrendt, H., & Becker, W. M. (2001). Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors. *Current Opinion in immunology*, **13(6)**, 709-715.
2. Çelenk, S. (2011). Bazı Polenler Neden Daha Allerjik? *Türkiye Klinikleri Journal of Immunology Allergy Special Topics*, **4(1)**, 5-9.
3. Cacciola, R. R., Sarva, M., & Polosa, R. (2002). Adverse respiratory effects and allergic susceptibility in relation to particulate air pollution: flirting with disaster. *Allergy*, **57(4)**, 281-286.
4. D'amato, G. (2002). Environmental urban factors (air pollution and allergens) and the rising trends in allergic respiratory diseases. *Allergy*, **57(s72)**, 30-33.
5. D'amato, G., Liccardi, G., D'amato, M., & Cazzola, M. (2001). The role of outdoor air pollution and climatic changes on the rising trends in respiratory allergy. *Respiratory Medicine*, **95(7)**, 606-611.
6. Ernst M, Notbohm H, Wicklein D, Cromwell O, Becker W. (2006) M. Phl p 3: Structural and immunological characterization of a major allergen of timothy grass pollen. *Clin. Exp. Allergy*, **36(6)**, 840-9.
7. Alche J, M'rani Alaoui M, Castro AJ, Rodriguez Garcia MI. (2004). Ole e 1, the major allergen from olive (*Olea europaea* L.) pollen increases its expression and is released to the culture medium during in vitro germination. *Pl. Cell Physiol*, **45(9)**, 1149-57.
8. Asturias, J. A., Gómez-Bayón, N., Eseverri, J. L., & Martinez, A. (2003). Par j 1 and Par j 2, the major allergens from *Parietaria judaica* pollen, have similar immunoglobulin E epitopes. *Clinical & Experimental Allergy*, **33(4)**, 518-524.

9. Vrtala, S., Grote, M., Duchêne, M., Kraft, D., Scheiner, O., & Valenta, R. (1993). Properties of tree and grass pollen allergens: reinvestigation of the linkage between solubility and allergenicity. *International Archives Of Allergy And Immunology*, **102(2)**, 160-169.
10. González-Buitrago, J. M., Ferreira, L., Isidoro-García, M., Sanz, C., Lorente, F., & Dávila, I. (2007). Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases. *Clinica Chimica Acta*, **385(1-2)**, 21-27.
11. Radauer, C., & Breiteneder, H. (2006). Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **117(1)**, 141-147.
12. D'amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi-Maesano, I., Behrendt, H., ... & Van Cauwenberge, P. (2007). Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy*, **62(9)**, 976-990.
13. Asam, C., Hofer, H., Wolf, M., Aglas, L., & Wallner, M. (2015). Tree pollen allergens—an update from a molecular perspective. *Allergy*, **70(10)**, 1201-1211.
14. Hauser, M., Asam, C., Himly, M., Palazzo, P., Voltolini, S., Montanari, C., ... & Wallner, M. (2011). Bet v 1-like pollen allergens of multiple Fagales species can sensitize atopic individuals. *Clinical & Experimental Allergy*, **41(12)**, 1804-1814.
15. Songnuan, W. (2013). Wind-pollination and the roles of pollen allergenic proteins. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*, **31(4)**, 261.
16. Mur, P., Feo Brito, F., Lombardero, M., Barber, D., Galindo, P. A., Gomez, E., & Borja, J. (2001). Allergy to linden pollen (*Tilia cordata*). *Allergy*, **56(5)**, 457-458.
17. Taş Ş. (2015) İstanbul'daki Akdeniz Servisi (*Cupressus sempervirens* L.) ve Sabin Ardıcı (*Juniperus Sabina* L.) Polenlerinin Alerjenik Proteinleri. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi. İstanbul.
18. Celik, A., Guvensen, A., Uysal, I., & Ozturk, M. (2005). Differences in concentrations of allergenic pollens at different heights in Denizli, Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, **37(3)**, 519.

19. Pincus, M. R., Abraham, N. Z., Carty, R. P., McPherson, R. A., & Pincus, M. R. (2011). Clinical enzymology. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22nd ed. Saunders, Philadelphia, 273-295.
20. De Weerd, N. A., Bhalla, P. L., & Singh, M. B. (2002). Aeroallergens and pollinosis: Molecular and immunological characteristics of cloned pollen allergens. *Aerobiologia*, **18(2)**, 87-106.
21. Halbritter H, Weber Z, Ulrich F. R. (2009), Pollen terminology: An illustrated Handbook., 8-24. Springer.
22. Diethart, B., Sam, S., & Weber, M. (2007). Walls of allergenic pollen: Special reference to the endexine. *Grana*, **46(3)**, 164-175.
23. Petersen, A., Suck, R., Lindner, B., Georgieva, D., Ernst, M., Notbohm, H., ... & Becker, W. M. (2006). Phl p 3: structural and immunological characterization of a major allergen of timothy grass pollen. *Clinical & Experimental Allergy*, **36(6)**, 840-849.
24. Grote, M., Vrtala, S., Niederberger, V., Wiermann, R., Valenta, R., & Reichelt, R. (2001). Release of allergen-bearing cytoplasm from hydrated pollen: a mechanism common to a variety of grass (Poaceae) species revealed by electron microscopy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **108(1)**, 109-115.
25. Castells, T., Arcalís, E., Moreno-Grau, S., Bayo, J., Elvira-Rendueles, B., Belchí, J., ... & Suárez-Cervera, M. (2002). Immunocytochemical localization of allergenic proteins from mature to activated *Zygophyllum fabago* L.(Zygophyllaceae) pollen grains. *European Journal of Cell Biology*, **81(2)**, 107-115.
26. Suarez-Cervera M, Takahashi Y, Vega-Maray A, Seoane-Camba J A. (2003) Immunocytochemical localization of Cry j 1, the mayor allergen of Cryptomeria Japonica (Taxodiaceae) in *Cupressus arizonica* and *C. sempervirens* (Cupressaceae) pollen grains. Sex. Pl. Repr.;**16(1)**:9-15.
27. Taylor, P. E., Flagan, R. C., Miguel, A. G., Valenta, R., & Glovsky, M. M. (2004). Birch pollen rupture and the release of aerosols of respirable allergens. *Clinical & Experimental Allergy*, **34(10)**, 1591-1596.

28. Baker, H. G., & Baker, I. (1979). Starch in angiosperm pollen grains and its evolutionary significance. *American Journal of Botany*, 591-600.
29. Vinckier, S., Cadot, P., & Smets, E. (2005). The manifold characters of orbicules: structural diversity, systematic significance, and vectors for allergens. *Grana*, **44(4)**, 300-307.
30. Buters, J. T., Kreyling, W. G., & Behrendt, H. (2005). Bet v 1 monitoring in outdoor air. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **115(2)**, S98.
31. Knox, B., & Suphioglu, C. (1996). Environmental and molecular biology of pollen allergens. *Trends in Plant Science*, **1(5)**, 156-164.
32. Radauer, C., Nandy, A., Ferreira, F., Goodman, R. E., Larsen, J. N., Lidholm, J., ... & Breiteneder, H. (2014). Update of the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Database based on analysis of allergen sequences. *Allergy*, **69(4)**, 413-419.
33. Gunawan, H., Takai, T., Kamijo, S., Wang, X. L., Ikeda, S., Okumura, K., & Ogawa, H. (2008). Characterization of proteases, proteins, and eicosanoid-like substances in soluble extracts from allergenic pollen grains. *International Archives of Allergy and Immunology*, **147(4)**, 276-288.
34. Knox, R. B., Suphioglu, C., Taylor, P., Desai, R., Watson, H. C., Peng, J. L., & Bursill, L. A. (1997). Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clinical & Experimental Allergy*, **27(3)**, 246-251.
35. Yıldız B, Aktoklu E. 2010. Bitki Sistematığı. sf:110/232-233. Ankara. Palme yayınları.
36. Chen, Z. D. Manchester, S. R., & Sun, H. Y. (1999). Phylogeny and evolution of the Betulaceae as inferred from DNA sequences, morphology, and paleobotany. *American Journal of Botany*, **86(8)**, 1168-1181.
37. Güçlü, K., & Yılmaz, H. (2011). Doğu Anadolu'da Doğal Olarak Yetişen Huşların (*Betula verrucosa* L.,-*Betula pendula* L.) Üretilmesi ve Peyzaj Mimarlığında Kullanılma Olanakları.

38. Bıçakçı, A., Saatçioğlu, G., & Tosunoğlu, A. (2017). Allerjenik Betula (Huş Ağacı) Polenlerinin Türkiye'deki Dağılımları. *Asthma Allergy Immunology/Astim Allerji Immunoloji*, **15**(3).
39. Blackmore, S., Steinmann, J. A., Hoen, P. P., & Punt, W. (2003). Betulaceae and corylaceae. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **123**(1-2), 71-98.
40. Taylor, P. E., Flagan, R. C., Miguel, A. G., Valenta, R., & Glovsky, M. M. (2004). Birch pollen rupture and the release of aerosols of respirable allergens. *Clinical & Experimental Allergy*, **34**(10), 1591-1596.
41. De la Cruz, D. R., Reyes, E. S., & Sánchez, J. S. (2008). Aerobiological study of Fagaceae pollen in the middle-west of Spain. *Aerobiologia*, **24**(2), 67.
42. Holmquist, L., Ekebon, A., Alm Kübler, K., & Vesterberg, O. (2005). Airborne birch and oak pollen grains and birch pollen allergens at a common sampling station in Stockholm. *Grana*, **44**(2), 104-107.
43. Panahi, P., Pourmajidian, M. R., Fallah, A., & Pourhashemi, M. (2012). Pollen morphology of Quercus (subgenus Quercus, section Quercus) in Iran and its systematic implication. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, **81**(1), 33.
44. Ipsen, H., & Hansen, O. C. (1991). The NH₂-terminal amino acid sequence of the immunochemically partial identical major allergens of alder (*Alnus glutinosa*) Aln g I, birch (*Betula verrucosa*) Bet v I, hornbeam (*Carpinus betulus*) Car b I and oak (*Quercus alba*) Que a I pollens. *Molecular Immunology*, **28**(11), 1279-1288.
45. Movérare, R., Everberg, H., Carlsson, R., Holtz, A., Thunberg, R., Olsson, P., ... & Högbom, E. (2008). Purification and characterization of the major oak pollen allergen Que a 1 for component-resolved diagnostics using ImmunoCAP®. *International Archives of Allergy and Immunology*, **146**(3), 203-211.
46. Dufour-Dror, J. M., & Ertas, A. (2004). Bioclimatic perspectives in the distribution of Quercus ithaburensis Decne. subspecies in Turkey and in the Levant. *Journal of Biogeography*, **31**(3), 461-474.

47. Gül G S. Palamut meşesi (*Quercus ithaburensis* Decne. Subsp. *macrolepis* Kotschy Hedge et Yalt.) pelletlerinden hayvan beslenmede yararlanma. Ormancılık Araştırma Enstitüsü Yayınları. Teknik raporlar serisi:53. Sayfa 123.
48. Dogan, Y., Baslar, S., & Kanisanli, M. (2000). Batı Anadolu’da Yayılıs Gösteren *Quercus ithaburensis* Decne supsp. *macrolepis* (Kotschy) Hedge Et Yalt.(Fagaceae) (Palamut Mesesi) Üzerinde Bir Arastırma. *Ekoloji Çevre Dergisi*, **9(35)**, 22-25.
49. Weber, R. W. (2014). Allergen of the Month—Little-leaf linden. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, **113(2)**, A15.
50. Aytuğ B, Peremeci E. (1987). Pollen grains; pollinosis and pollen extracts. *Journal of Faculty of Medicine I.U*, **50**, 163-170.
51. Wodehouse R.P. (1935). Pollen Grains. New York: McGraw-Hill.
52. Koçer F. (2015). Betulaceae familyası duyarlı hastalarda *Alnus orientalis* (Doğu Kızılğacı) Decne. polenine karşı gösterilen Ig E reaktivite profilinin belirlenmesi ve major alerjenlerinin saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Bülent Ecevit Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü Zonguldak.
53. Cabi E. (2005). Trakya bölgesindeki Gramineae familyasına ait bazı türlerin polen morfolojisinin incelenmesi ve polen ekstraktlerinin hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi. Trakya Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü. Edirne.
54. Aytuğ B. 1996. Polen Ekstrelerinin Hazırlanması. Yüksek Lisans Ders Notları.
55. Aytug, B., Dal, M., Colakoglu, B., Oner, A., Peremeci, E., Temiz, D., ... & Guven, K. C. (1991). Türkiye Alerjik Polenlerinden Polen Ekstresi Hazırlanması ve Deri Testi Uygulamaları. *Acta Pharmaceutica Turtica*, **33**, 85-95.
56. Walker J M. 2002. The Protein Protocols Handbook. Second edition. Humana Press.
57. BCA protein macroassay kit. Instruction manual. Kit for protein quantification. Serva electrophoresis GmbH. Heidelberg-Germany.
58. Bıçakçı, A., & Tosunoğlu, A. (2017). The Influence of Environmental and Atmospheric Variables on Allergenic Pollen. *Asthma Allergy Immunology*, **14(3)**, 107-116.

59. Eriksson N, Holmen A, Moller C, Wilh J. A. (1998) Sensitisation according to skin prick testing in atopic patients with asthma or rhinitis at 24 allergy clinics in Northern Europe and Asia. Sensitisation patterns, relationships to residence, diagnosis, age and sex. *Allergology International*, **47**,187-96.
60. Varela, S., Mendez, J., de la Cuesta González, C., Iglesias, I., González, C., & Menéndez, M. (2003). Characteristics of pollinosis caused by *Betula* in patients from Ourense (Galicia, Spain). *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, **13(2)**, 124-130.
61. Peternel, R., Milanovic, S. M., Hrga, I., Mileta, T., & Culig, J. (2007). Incidence of Betulaceae pollen and pollinosis in Zagreb, Croatia, 2002-2005. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, **14(1)**, 87.
62. Stevens, W. J., Ebo, D. G., Hagendorens, M. M., Bridts, C. H., & De Clerck, L. S. (2003). Is the prevalence of specific IgE to classical inhalant aeroallergens among patients with respiratory allergy changing? Evidence from two surveys 15 years apart. *Acta Clinica Belgica*, **58(3)**, 178-182.
63. Troise, C., Voltolini, S., Delbono, G., & Negrini, A. C. (1992). Allergy to pollens from Betulaceae and Corylaceae in a Mediterranean area (Genoa, Italy)--a ten-year retrospective study. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, **2(6)**, 313-317.
64. Frei, T., & Gassner, E. (2008). Climate change and its impact on birch pollen quantities and the start of the pollen season an example from Switzerland for the period 1969–2006. *International Journal of Biometeorology*, **52(7)**, 667.
65. Viander, M., & Koivikko, A. (1978). The seasonal symptoms of hyposensitized and untreated hay fever patients in relation to birch pollen counts: correlations with nasal sensitivity, prick tests and RAST. *Clinical & Experimental Allergy*, **8(4)**, 387-396.
66. Rapiejko, P., Stanlaewicz, W., Szczygieski, K., & Jurkiewicz, D. (2007). Threshold pollen count necessary to evoke allergic symptoms. *Otolaryngologia polska= The Polish otolaryngology*, **61(4)**, 591-594.

67. Heinzerling, L., Mari, A., Bergmann, K. C., Bresciani, M., Burbach, G., Darsow, U., ... & Bom, A. T. (2013). The skin prick test–European standards. *Clinical and translational allergy*, **3**(1), 3.
68. Yazicioglu, M., Oner, N., Celtik, C., Okutan, O., & Pala, O. (2004). Sensitization to common allergens, especially pollens, among children with respiratory allergy in the Trakya region of Turkey. *Asian Pacific journal of allergy and immunology*, **22**(4), 183.
69. Loureiro, G., Rabaca, M. A., Blanco, B., Andrade, S., Chieira, C., & Pereira, C. (2005). Aeroallergens sensitization in an allergic paediatric population of Cova da Beira, Portugal. *Allergologia et immunopathologia*, **33**(4), 192-198.
70. Dursun, A. B., Celik, G. E., Alan, S., Pinar, N. M., Mungan, D., & Misirligil, Z. (2008). Regional pollen load: effect on sensitisation and clinical presentation of seasonal allergic rhinitis in patients living in Ankara, Turkey. *Allergologia et immunopathologia*, **36**(6), 371-378.
71. Gell P. G. P., Coombs R. R. A. (2003). The Gell-Coombs Classification of hypersensitivity reactions: are-interpretation, *TRENDS in Immunology*, 7, 376