

HAZİRAN 2019

Yüksek Lisans Tezi - Biyoloji

HATİCE BAKİYE ÖZKESEN GÜCEĞLİOĞLU

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GAZİANTEP'TEKİ KIZILÇAM (*PINUS BRUTIA TEN.*), DOĞU ÇINARI
(*PLATANUS ORIENTALIS L.*) VE SİNİRLİ OT (*PLANTAGO MAJOR L.*)
POLENLERİNİN MORFOLOJİSİ VE POTANSİYEL ALERJENİK
PROTEİNLERİNİN TESPİTİ**

**BİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATİCE BAKİYE ÖZKESEN GÜCEĞLİOĞLU
HAZİRAN 2019**

**GAZİANTEP’TEKİ KIZILÇAM (*PİNUS BRUTİA TEN.*), DOĞU ÇINARI
(*PLATANUS ORİENTALİS L.*) VE SİNİRLİ OT (*PLANTAGO MAJOR L.*)
POLENLERİNİN MORFOLOJİSİ VE POTANSİYEL ALERJENİK
PROTEİNLERİNİN TESPİTİ**

**Gaziantep Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi**

Danışman

Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ

Hatice Bakiye ÖZKESEN GÜCEĞLİOĞLU

Haziran 2019

© 2019 [Hatice Bakiye ÖZKESEN GÜCEĞLİOĞLU]

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tezin Adı: Gaziantep'teki Kızılçam (*Pinus brutia*), Doğu Çınarı (*Platanus orientalis*) ve Sinirli ot (*Plantago major*) Polenlerinin Morfolojisi ve Potansiyel Alerjenik Proteinlerinin Tespiti
Öğrencinin Adı Soyadı: Hatice Bakiye Özkesen GÜCEĞLİOĞLU

Tez Savunma Tarihi: 19.06.2019

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof.Dr. A. Necmeddin YAZICI
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof.Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımda (tarafımızca) okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ
Tez Danışmanı

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

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Sevdâ KIRBAĞ

Doç.Dr. Işık Didem Karagöz

Doç.Dr. İbrahim Halil Kılıç

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

Hatice Bakiye Özkesen GÜCEĞLİOĞLU

ABSTRACT

MORPHOLOGY AND DETERMINATION OF POTENTIAL ALERGENIC PROTEINS OF KIZILÇAM (PINUS BRUTIA TEN.), EASTERN CHINA (PLATANUS ORIENTALIS L.) AND NINED OF (PLANTAGO MAJOR L.) POLENES IN GAZİANTEP

ÖZKESEN GÜCEĞLİOĞLU, Hatice Bakiye

M.Sc. in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Işık Didem KARAGÖZ

June 2019

46 pages

Allergy is expressed as a hypersensitivity reaction that affects the body of some individuals exposed to the same amount of foreign substances (antigens) In this study, it was aimed to determine the allergen protein concentrations of Red Pine (*Pinus brutia* L.), (*Plantago major* L.) (*Platanus orientalis* L.) pollen which are common in Gaziantep. Pollen samples were collected during dissemination periods and extraction procedures were performed. The concentrations of extracted pollen proteins were determined. The concentrations of extracted pollen proteins were determined. Pollen extracts were prepared by pollinating the pine trees of *pinus brutia* L. *Plantago major* L. and *Platanus orientalis* L. To determine the morphology of pollen preparation were preperad by wodehouse method and photographed under light microscope. Total concentrations of potential allergen proteins were determined by BCA method from prepared polen extracts The standard allergen kits used in the clinic were compared with the protein concentrations of the kits, the results were recorded for evaluation.

Key Words: *Pinus brutia* L., *Plantago major* L., *Platanus orientalis* L., Pollen, Allergen

ÖZET

GAZİANTEP'TEKİ KIZILÇAM (*PINUS BRUTIA TEN.*), DOĞU ÇINARI (*PLATANUS ORIENTALIS L.*) VE SİNİRLİ OT (*PLANTAGO MAJOR L.*) POLENLERİNİN MORFOLOJİSİ VE POTANSİYEL ALERJENİK PROTEİNLERİNİN TESPİTİ

ÖZKESEN GÜCEĞLİOĞLU, Hatice Bakiye
Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ
Haziran 2019
46 sayfa

Alerji aynı orandaki yabancı maddelere (antijenlere) maruz kalan bireylerden bazılarının vücudunda etki gösteren aşırı duyarlılık reaksiyonu olarak ifade edilmektedir. Rüzgar ile atmosferde yayılan polenler önemli aeroalerjenleri oluşturmaktadır. Polenlerin yayılışı ve miktarları bulundukları coğrafi bölge ve iklimden etkilenmektedir. Bu sebeple farklı coğrafi bölgelerde yaşayan duyarlı kişilerin maruz kaldığı polen miktarı ve sayısı etkilenen bireylerde farklı alerjik reaksiyonlar geliştirmektedir. Bu nedenle türlerin bölgelere özgü alerjenik etkilerinin araştırılması önemlidir. Kızılçam (*Pinus brutia L.*), Sınır Otu (*Plantago major L.*) ve Doğu çınarı (*Platanus orientalis L.*) ağaçlarının tozlaşma dönemlerinde polenleri toplanarak polen ekstraktları hazırlanmıştır. Polenlerin morfolojisinin tespiti için Wodehouse yöntemi ile preparatlar hazırlanarak ışık mikroskopunda fotoğraflanmıştır. Hazırlanan polen ekstraktlarından BCA yöntemi ile potansiyel alerjen proteinlerin total konsantrasyonları tespit edilmiştir. Bu çalışmada, Gaziantep ilinde yaygın olarak bulunan bu bitki türleri polenlerinin alerjen protein konsantrasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Pinus brutia L.*, *Plantago major L.*, *Platanus orientalis L.*, Polen, Alerjen

Çok kıymetli aileme, değerli eşime ve biricik evladımıza.

TEŞEKKÜR

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

Örneklerin toplanmasında, polen proteinlerinin ekstresinin hazırlanmasında ve tüm ölçümlerin yapılmasında desteklerini benden esirgemeyen değerli arkadaşlarım, Biyolog Asiye GÖZÜBÜYÜK, Biyolog Canan AFACAN, Hiba HÜSSEİN, ve Yüksek Biyolog Başak SİMİTÇİOĞLUNA çok teşekkür ederim.

Çalışma süresince, literatür tarama hususunda yardımını esirgemeyen beni hep destekleyen ve güvenen eşim Reha GÜCEĞLİOĞLUNA'a her konuda beni destekleyen, yüreklendiren, yanımda olan üzerimde emeği sonsuz olan canım annem Bakiye ÖZKESEN' e, en büyük destekçim babam Hanifi ÖZKESEN' e, manevi olarak yanımda olan kız kardeşim Yağmur BAĞRIYANIK ve erkek kardeşim Reşat ÖZKESEN' e, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

sayfa

ABSTRACT	v
ÖZET.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	x
TABLolarLİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xiii
BÖLÜM 1	1
1.1 GİRİŞ	1
BÖLÜM 2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Alerji.....	3
2.2 Alerjen	4
2.3 Polen alerjisi	5
2.3.1 Polen alerjisinin klinik tanısı	9
2.3.2 Deri Testleri Prick Testi	10
2.3.3 Nazal Provokasyon Testi (NPT).....	10
2.4 <i>Platanaceae</i> familyası ve alerji	10
2.5 <i>Plantaginaceae</i> familya özellikleri ve alerji.....	14
2.5.1 Geleneksel tıpta kullanımı	15
2.5.2 <i>Plantago major</i> 'un çeşitli çalışmalarda gözlemlenen etkileri	19
2.5.3 <i>Plantago major</i> ve alerji mekanizması.....	16
2.6 <i>Pinaceae</i> familyası ve alerji mekanizması	17
BÖLÜM 3 MATERYAL ve METOD	20
3.1 Materyal.....	20
3.2 Polenlerin temini ve toplanması	23
3.3 Polen morfoloji çalışmaları	24
3.3.1 Wodehouse Yöntemi	24

3.3.2 Gliserin Jelatin Hazırlanması	24
3.4 Polenlerin ölçümü.....	25
3.5 Polen fotoğraflarının çekilmesi	25
3.6 Ekstraksiyon için gerekli olan reaktifler	25
3.6.1 ‘Coca’ Çözeltisinin Hazırlanması.....	25
3.7 Polen ekstrelerinin hazırlanması	26
3.8 Süzme (filtrasyon) yöntemi	27
3.9 Polenin kuru ağırlığının hesaplanması	27
3.10 Polen protein konsantrasyonunun belirlenmesi.....	28
BÖLÜM 4.....	29
4.1 Polenlerin mikrofotoğrafları	30
BÖLÜM 5.....	34
SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	35
KAYNAKLAR.....	41

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1 Coca çözeltisi.....	23
Tablo 4.1 Polen ekstraları ile ticari polen ekstralarının protein konsantrasyon karşılaştırılması.....	29
Tablo 4.3 Polen BCA ölçümleri standart kitlerin hali ve saf polen karşılaştırması.....	29
Tablo 4.4 Polen BCA ölçüm standart kitlerin dilüe edilmiş hali ve saf polen karşılaştırması.....	30

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil2.1	Tip I reaksiyonunda gerçekleşen olaylar.....	5
Şekil2.2	Tip I alerji reaksiyonunda salınım.....	7
Şekil 2.3	Polenin temel kısımları.....	9
Şekil 2.4	Çınar ağacı polen görüntüleri.....	12
Şekil 2.5	<i>Platanus occidentalis</i> (Batı Çınarı) ağaçlandırma genel görünüş.....	13
Şekil 2.6	<i>Plantago major</i> bitkisi genel görünümü.....	12
Şekil 2.7	<i>Plantago</i> polen görüntüleri.....	15
Şekil 2.8	Çam polen görüntüleri.....	16
Şekil 2.9	Kızılçam (<i>Pinus brutia</i>).....	20
Şekil 4.1	<i>P.orientalis</i> polenlerinin ışık mikroskopik incelemesi.....	26
Şekil 4.2	<i>P.brutia</i> polenlerinin ışık mikroskopik incelemesi.....	27
Şekil 4.2	<i>P.major</i> polenlerinin ışık mikroskopik incelemesi.....	27

KISALTMALAR LİSTESİ

kDa	Kilodalton
M	Molar
rpm	Dakika başına devir sayısı
IgE	İmmünoglobulin E
IgM	İmmünoglobulin M
IgG	İmmünoglobulin G
SEM	Scanning Electron Microscope (Taramalı E. M.)
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Alerjik hastalıklar toplumun büyük bir kesiminde önemli ölçüde meydana gelen bir sağlık problemidir. Pek çok insanda aerobiyolojik bozukluklar nedeniyle polenlere, besinlere, ev tozu akarlarına, böceklerle ve bitkilere karşı alerjik reaksiyonlar gelişmektedir. Alerjik hastalıklara sebebiyet veren birçok alerjen kaynağı mevcuttur. Alerjik duyarlılığın artmasında ve buna bağlı olarak gelişen belirtilerin ortaya çıkmasındaki en yaygın etken ise polenlerdir [1].

Belirli mevsimlerde solunum sistemi rahatsızlığına sebep olan polenler, belirli coğrafik bölgede, çiçeklenme zamanlarına bağlı olarak, çevreye yayılmaktadırlar. Polen alerjisinden sorumlu moleküller genelde 5-150 kDa molekül ağırlığındaki proteinler veya glikoproteinlerdir [2].

Alerjen polenler ile oluşturulan ekstreler, alerjenik hastalıkların tanısı ve tedavisi için büyük önem taşırlar ve bütün bu ekstreler alerjenik hastalıkların teşhisi için deri testlerinde kullanılmakta olup alerjik reaksiyonların tedavisi ise immünoterapi ile gerçekleştirilmektedir. Yapılan bu tedavide, hastanın reaksiyon gösterdiği polen türünden hazırlanan ekstreler, hastaya giderek artan dozlarda enjekte edilerek immün sisteminin kuvvetlendirilmesi amaçlanmıştır.

Sensivitesi daha yüksek sonuçlar elde etmek için, ülkemizdeki var olan alerjik hastalıkların teşhisi ve tedavisi amacıyla kullanılan ekstrelerin ülkemizde yetişen ve yetiştirilen bitkilerden elde edilmesi ve o bölgeye ait alerjenik tedavilerde uygulanması gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında Gaziantep Üniversitesi kampüsü içindeki ağaçlandırılmış alanlarda yaygın olarak bulunan *Platanus orientalis* (Doğu Çınarı), *Pinus brutia* (Kızılçam) ve *Plantago major* (Sinir Otu) ağaçlarının tozlaşma dönemlerinde

toplanan polen örneklerinden elde edilen ekstraktlardan, polenlerin morfolojilerinin ve potansiyel alerjenik total protein konsantrasyonlarının belirlenmesi, tanısal testlerde kullanılmak için üretilen ticari polen ekstraktları ile total protein konsantrasyonları yönünden karşılaştırılmaları amaçlanmıştır. Son birkaç yıldır yapılan etnofarmakolojik çalışmalarda, *P. major*'un hemen hemen dünyanın her bölgesinde (Asya, Avrupa ve Amerika kıtasındaki bir çok ülkede), enfeksiyon hastalıkları, cilt hastalıkları, tümörler, sindirim sistemi hastalıkları, solunum, ürogenital ve dolaşım sistemleri ile ilgili çeşitli problemler için ve ayrıca ateş düşürücü ve ağrı kesici olarak geleneksel şekilde kullanılmakta olduğuna dair bir takım bilgiler ortaya çıkmıştır [3].

Çalışmamızdaki diğer bir bitki olan, Gymnospermler açık tohumlular içerisinde en geniş yayılıma sahip olan *Pinus* cinsi kapsamında kızılçam (*Pinus brutia*), ülkemizde en fazla bulunan çam türüdür. Bu türün dünyada en çok yayılışı Türkiye'de görülmekte olup, başlıca Akdeniz ile Ege Bölgeleri doğal flora bölgesidir [4]. Ülkemizde hoş bir görünüm sağlamak amacıyla ve aynı zamanda büyük bir kereste kaynağı olarak kullanılan kızılçam, ekonomik olarak önemli bir orman ağacı türüdür. Ayrıca kolay işlenebilir olması özelliği ile mobilya, yapı ambalaj ve yapı malzemesi sanayisinde yaygın olarak kullanılmakla birlikte reçinesinden de çokça yararlanılan ilk ve tek çam türüdür.

Doğu Çınarı (*Platanus orientalis*) ise 5-6m çapında, 25-30 m boylarında ve yüzlerce yıl yaşamını sürdürebilen büyük ve gelişmiş ağaçlardan biridir. Botanik yetenekleri ise gövde dış kabuğu minik pulcuklar halinde çatlar ve dökülür, yaprakları 5-7 lobludur ve bu loblar genellikle bitkinin orta damarına kadar ilerlemektedir ve uçları büyük oranda sivridir. Uzun bir sapa sahip olmakla beraber bileşik meyveler uzunca bir sap üzerinde 2-6 adettir. Yaprakları ise 10-20 cm uzunluğundadır. Ülkemizde kendiliğinden yetişen tek doğal çınar türüdür ve bütün ormanlık alanlarda, sulak alanlarda ,genellikle dere içlerinde, kendiliğinden yetişmektedir [5].

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Alerji

Alerji, Yunancada normal seyrin dışında gelişen aşırı reaksiyonel tepki demektir. Ancak benimsenen düşüncenin aksine, alerjik reaksiyonların nedeni immün bağışıklığın zayıf kalması değildir. Aslında bakıldığında zaman alerjik bir reaksiyonda bağışıklık faktörlerimiz olduğundan daha fazla çalışmakta olup çok fazla oranda antikor oluşturmaktadır. Bu sebeple bilim insanları ve doktorlar tarafından alerji terimi yerine aşırı duyarlılık tanımlamasını tercih edilmektedir [6].

Alerjik kişilerin immün yapıları, bir molekülü tehlike olarak tanımlayıp olduğundan çok daha fazla bir reaksiyon oluşturmaktadır. Bu tepki bazı durumlarda öksürük, hapşırma şeklinde gelişirken bazen çok daha ileri boyutlara taşınıp öldürücü dahi olabilmektedir [6].

Normal kişilerde lenfositler zararsız ve zararlı proteinleri birbirinden ayrıştırarak önemli bilgileri taşımaktadırlar. Alerjik kişilerde ise lenfosit hücreleri bu yeteneklerini kaybetmektedir dolayısıyla tehlikeli olmayan yapıları dahi zararlı olarak algılamaktadırlar. Bu şekilde algılanmasının nedeni ise bu kişilerin B lenfosit hücreleri genetik kod anlamında yanlış bilgilendirilmişlerdir. Bu sebeple de normalden daha fazla olarak IgE oluşturmaktadırlar. IgEler ise normal şartlarda vücuttaki bütün mast hücreleri ve bazofillere bağlanarak hücreleri aşırı hassas hale getirmektedirler. Fakat uyarım sonucu normalden fazla salgılanan histamin, tahrip edici bir etkiye sahip olmaktadır [6].

Genelde alerji gelişen bireylerde Ig E antikor seviyesini ölçen testler uygulanır ve bu uygulanan testler negatif sonuç veriyorsa vücutta herhangi bir alerjenik duyarlılığın oluşmadığı anlaşılmaktadır. Ama elde edilen bu sonuçlar yüzde yüz doğruluğu

yansıtmamaktadır çünkü IgE antikor seviyesinin ölçülememesi alerjik başka durumlarda var olabilmektedir.

2.2 Alerjen

Alerjenler, IgE antikorunu oluşturan aynı zamanda da bu antikor ile reaksiyon meydana getiren moleküller olarak tanımlanabilmektedirler. Alerjenler genel itibarıyla glikoprotein ya da protein yapıda moleküller olup, 5-50 kDa molekül ağırlığına sahiptirler. Örnek olarak herhangi bir alerjen ekstraktının içinde çok sayıda antijenik yapılar bulunmaktadır. Bu antijenlerin hepsi alerjik aktivite oluşturmamaktadır ve alerjenik aktivite oluşup oluşmaması da hastanın duyarlılığına bağlı olarak değişmektedir. Hastaların bir çoğunda duyarlılığa sebep olan alerjenler **majör alerjenler** olarak sayılır, az sayıda hastada duyarlılığa sebep olanlar **minör alerjenler** olarak tanımlanmaktadır. [7]. Genel olarak bakıldığında ise, alerjen ekstraktlarının içinde 1-4 arasında majör alerjen yapılar bulunmaktadır. Alerjenin içerisinde bağışıklık sisteminin duyarlanmasına neden olan, özel bir aminoasit kodlanması gösteren bir bölgesi bulunmaktadır ve bu bölge “epitop” veya “antijenik determinant” olarak adlandırılmaktadır. Duyarlı bireylerde aynı alerjen molekülünün değişik epitoplarına cevap oluşabilmektedir. Aşırı duyarlılık reaksiyonlarına bakıldığında ise, antikor ve etki mekanizmasına göre dört ayrı gruba ayrılmaktadır. Bunlar Tip I, Tip II, Tip III ve Tip IV alerjenik reaksiyonlardır.

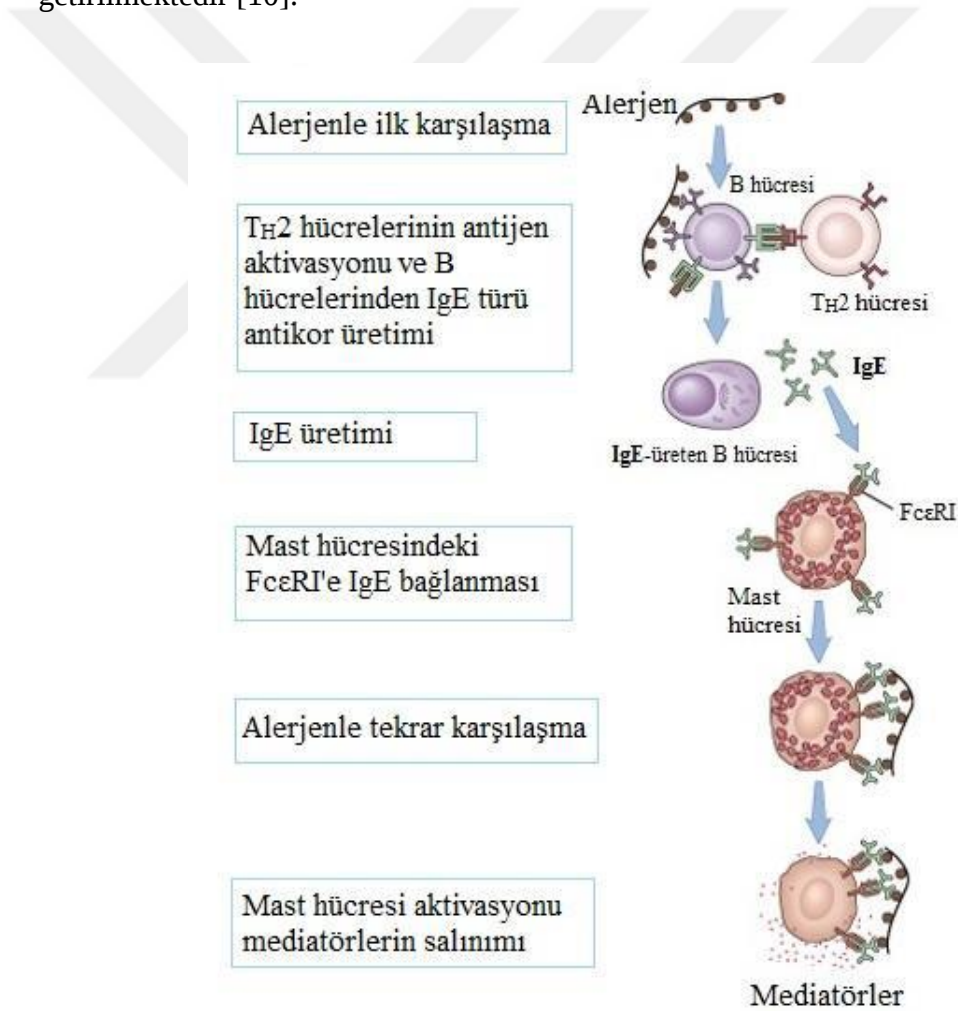
Tip I alerjik reaksiyonlar, genel olarak saman nezlesinde gözlenmektedir ve alerjenler vücutta IgE oluşumunu tetiklemektedir. Üretilen IgE, bazofil ve mast hücre yüzeyine bağlanır ve alerjenlerle bir kez daha karşılaşıldığında inflamatuvar mediyatörlerin salgılanması ile alerjenik reaksiyonlar gerçekleştirmektedir [8].

Alerjene maruz kalma süresinin çok uzaması ile geç faz Tip I alerjik reaksiyon gelişir ve kronik bir inflamasyon meydana gelir. Reaksiyonun bu aşamasında inflamatuvar mediyatörlerin üretimi sadece alerjenlerden değil, belirsiz uyaranlar (formaldehit, ziraai ilaçlar, fenol vs.) ve fiziksel faktörler (sıcaklık, efor, basınç vs.) tarafından da tetiklenir. Tip I alerjik reaksiyonların etkisiyle ortaya çıkan bulgular arasında, aksırma, burun kaşıntısı, burun içinde yanma hissi, göz nezlesi ve mukozada artma sayılabilir. Ayrıca, Tip I alerjik reaksiyon ürtiker, anafilaktik şok IgE-bağımlı şişkinlik ve bazı bronş astımlarına da yol açabilir [9].

Tip II alerjik reaksiyon, IgM ve IgG sınıfı antikorlar ile gerçekleşir. Bu antikorlar hücre (kan ve kemik iliği hücreleri) membranı içinde alerjenle reaksiyona girerek hücre dekompozisyonuna sebep olur.

Tip III alerjik reaksiyonda, alerjenler IgM, IgG, IgA sınıfı antikorlarla veya IgE'den oluşan immün komplekslerle doku inflamasyonuna sebep olur. Bu tip reaksiyonlara genellikle, yabancı türlerin serumları, ilaç, organik ve inorganik tozlar bazı yiyecekler sebep olur.

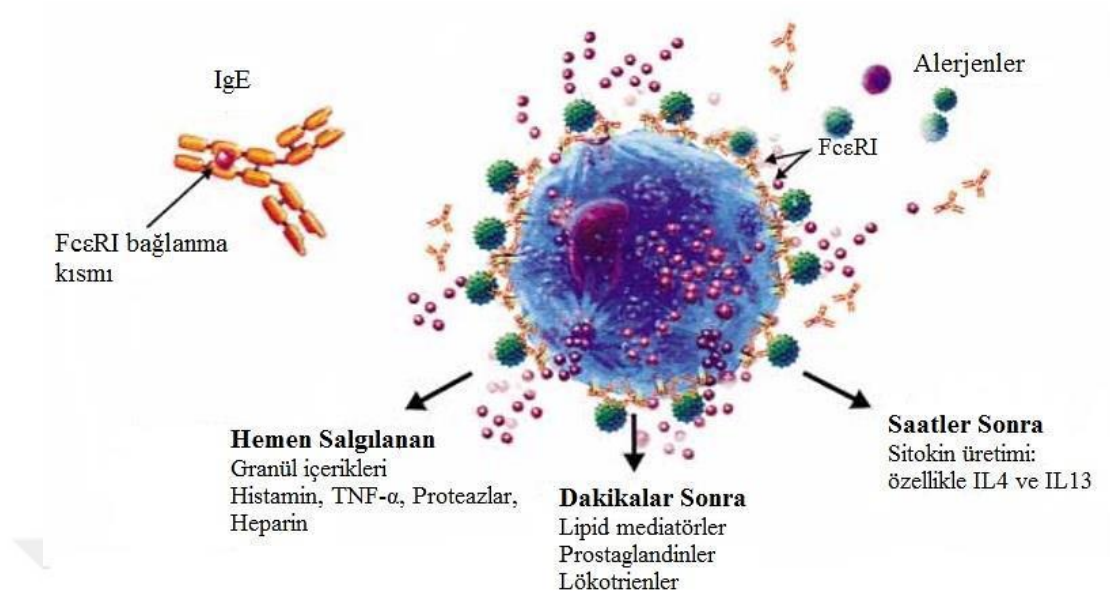
Tip IV alerjik reaksiyonlar ise gecikmiş tip aşırı duyarlılık veya hücre aracılı aşırı duyarlılık olarak gözlenmektedir. Doku içindeki inflamatuvar reaksiyon, alerjenlerle uyarılan T lenfositleri tarafından üretilen sitokinler tarafından meydana getirilmektedir [10].



Şekil 2.1. Tip I aşırı duyarlılık reaksiyonunun erken fazında gerçekleşen olaylar [10].

Alerjik hastalıklara ve parazit enfeksiyonlarına karşı verilen immün yanıtlarda önemli bir yer tutan bu molekül farklılaşmış B lenfosit hücreleri tarafından üretilir. İki ağır ve iki hafif zincirden oluşmakla birlikte, e-ağır zincirindeki sabit bölgesinin dizisi ile diğer sınıf antikorlardan farklılık göstermektedir. Ayrıca IgG molekülü IgE'den farklı olarak; ağır zincir sabit domeni ("constant domain", C ϵ 1-C ϵ 4) içermektedir. Alerjenlerin bağlanma kısmı, hafif ve ağır zincirleri üzerindeki değişken domenlerde bulunur. Bununla birlikte, IgE molekülü düşük ve yüksek afiniteli IgE reseptörlerine (sırasıyla, Fc ϵ RI ve Fc ϵ RII) FC fragmenti ile bağlanmaktadır. Fragment üzerindeki reseptör bağlama bölgeleri ise C ϵ 3 domeninin farklı kısımlarında bulunmaktadır .

Mast hücreleri ile birlikte IgE antikorları da alerjik inflamasyonda önemli görevler üstlenmektedir. IgE'lerin mast hücreleri içindeki yüksek-afiniteli reseptörlere (Fc ϵ RI) byapışması ve alerjenlerin de IgE'lere bağlanarak IgE'ler arasında çapraz bağ kurmasının ardından mast hücreleri degranüle olmaya başlar. [12]. Böylece inflamatuvar mediyatörler (triptaz,histamin), yeni üretilmiş lipid mediyatörleri ve sitokinler (TNF) salınmaya başlar [13] (Şekil 2.3). Bu mediyatörler aktif bir şekilde bronşiyal mukozada ödem oluşumu, düz kas kasılmalarına ve mukus salgılanmasına neden olur. Bazofil hücreleri üzerindeki IgE-Fc ϵ RI bağlantısının ardından alerjenle bağlantı da benzer oranda degranülasyona sebep olur ve önceden oluşmuş inflamatuvar mediyatörlerin (heparin, histamin, triptaz) salınımı ile lipid mediyatörlerin ve sitokinlerin sentezine neden olur [14].



Şekil 2.2. Tip I alerji reaksiyonunda inflamatuvar salınımı [14].

2.3 Polen Alerjisi

Polenler vücuda sindirim yolu, solunum yolu ve direkt temas yolu ile girebilmektedir. Pratikte ise en fazla karşılaşılan inhalasyon yoludur. Ancak atmosferdeki polen miktarı yıldan yıla farklılık gösterebilmektedir. Polenlerin Oluşumu Mikrosporogenez, anterin sporojen yapısı içerisinde gerçekleşir. Polen tanesinin ornamentasyonu ile polinizasyon (entemogam veya anemogam) tiplerinin birbirleriyle arasında yoğun bir tepkime mevcuttur. Reks içinde glandular kaplamanın aktivasyonu sonucu oluşan renkli ve lipofil yapıli küçük damlalar halinde olan sıvı bir yapı birikmektedir. Bu yapı hakkında çok sayıda ifade öne sürülmüştür. Hidrofil taraf için triffin hidrofof taraf için pollenkit isimleri kullanılmaktadır bu yapılar polen dış montunu oluşturmaktadır. Polen montunun ve eksin karakterlerinin anemogam (anemofil) veya entomogam (entomofil) ile korelasyonlarının kurulabildiği tespit edilmiştir. Ornamentasyondaki çeşitlilikler zaman zaman çok farklılıklar göstererek belirsizlik içerir [15].

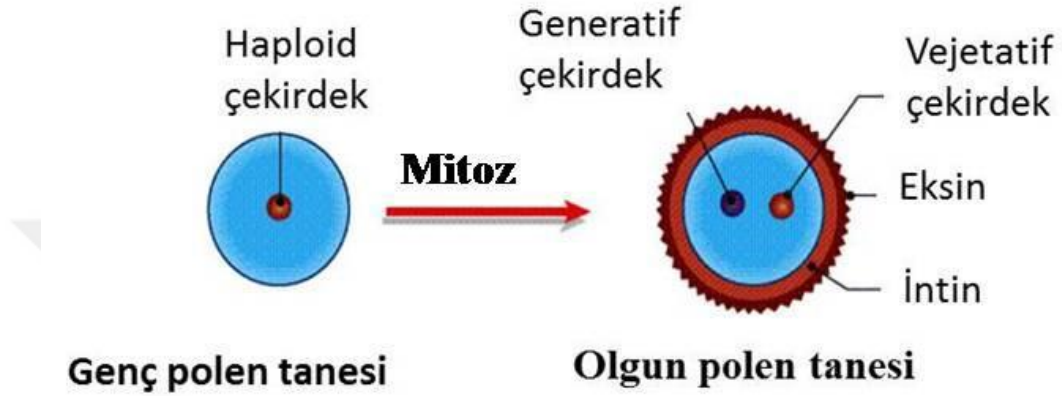
Mayoz bölünmeyi takiben, sporojen yapı içinde oluşan bazı maddeler eksinin birleşimine girmektedirler. Burada mikrosporun morfolojik yapısı haploid çekirdeğin biyokimyasal ve genetiksel kontrolündedir. Mikrospor dış çeperinin farklılaşması bir birini takip eden iki ayrı aşamada gerçekleşmektedir. Birinci faz süresince, tetrat halinde bulunan mikrosporların çeperleri bütünüyle polenin ana hücresi ile sarılmıştır. Bu aşama primeksin adı verilen ilk eksin örtüsü şeklindedir. İkinci fazda ise başlangıçtaki eksin değişikliğe uğrar ve intin oluşur. Eksinin hızla büyüdüğü bu periyotta örtü maddeleri ile mikrosporun yüzeyi arasında bir süreklilik yoktur. Tüm bu olaylar devam ederken mikrospor ana hücresinin çeperi kalloz dokusu şeklinde polenin dış yüzeyinde varlığını sürdürmektedir. Bu yapı filtre görevi görür. Daha sonraki aşamalarda kallozun erimesiyle, filtre görevini polen çeperi üstlenir.

Polenlerin morfolojik yapısal analizi sonucu orta bölümdeki canlı kısmın dışında sporoderm olarak isimlendirilen karışık bir yapı bulundurmaktadırlar. Sporoderm yapısı iç içe girmiş iki tabakadan meydana gelmiştir. Bu yapılardan en içteki tabakaya intin denir. Bahsedilen tabaka kısa sürede kaybolur ve ölü bir tabaka kalır. En Dıştaki yapıya ise eksin tabakası denir [15].

Atmosferdeki polen miktarı yağışlı günlerde az iken sıcak ve kuru günlerde fazladır. Bu sebeple polen dağılımı ilkbahar aylarının son dönemlerinde ve bütün yaz süresince yüksek miktara ulaşmaktadır. Duyarlı bireylerde alerjik belirtilerin ortaya çıkması için gerekli olan polen tanesi sayısı net olarak bilinmemekte birlikte 10 – 50 polen tanesi m³ eşik değeri olarak kabul edilmektedir. Polenlerin atmosferde bulunmalarını coğrafik ve mevsimsel iklim özellikleri belirler bu nedenle farklı ülkelerde, hatta bu ülkelerin değişik bölgelerinde polenlerin birbirinden farklı klinik değerleri mevcuttur. Belirli bir bölgede ise polen çeşitliliği yıldan yıla düşük oranda değişmektedir. Polen alerjenlerine karşı duyarlılık belirtileri ise burun, gözler ve duyarlı kişilerin boğaz mukoza yüzeyleri ile polenlerin teması üzerine gelişmektedir [16].

Genellikle boğaz, gözler ve burunda konjunktivit, hapşıırma, burun tıkanıklığı ve buna bağılı olarak tahriş gelişmesiyle sonuçlanmaktadır.

Dış ortam alerjenlerinin en yaygın kaynağı olduğı düşünölen polenler aynı zamanda bitki yaşam döngüsünün önemli birer parçasını oluşturmaktadır.(Şekil 2.1) Doğada farklı boyutlarda ve farklı şekillerde bulunan ve çiçekli bitkilerin erkek gametofitleri olan polen tanelerinin biyolojik yükümlölüğü ise dişi gametofiti dölemektir [17].



Şekil 2.3. Polenin Temel Kısımları (leavingbio.net)

2.3.1 Polen Alerjisinin Klinik Tanısı

Birçok hastalık, alerji ve atopide gözlenenlere benzer belirtiler göstermektedir. Bu sebeple alerji adına kesin bir tanı koymak büyük ölçüde zor olmaktadır. Kesin tanı ise antijene özgü IgE kullanan *in vitro* testlerin uygulanmasına, deri testlerine ve ayrıntılı bir klinik geçmişe bağılı olmaktadır [18].

Alerjenik proteinlerin izolasyonu ve tanımlanması, alerjik hastalıkların tanı ve tedavisi için önem teşkil etmektedir. Ayrıca protein yapısı, alerjenik aktivite ve biyolojik fonksiyon arasındaki ilişkinin aydınlatılması alerjik hastalıkların tedavisine büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir [19].

Ayrıca insanlarda alerjik etkilere sebep olan polenlerin büyük bir bölümünün histokimyasal biyolojik yapıları belirlenmiş, alerjenik protein yapıları tanımlanarak isimlendirilmiş ve gruplandırılmıştır. Polenlerden bir araya gelen ve alerjen içerikleri bilinen ekstreler, alerjik duyarlılığı saptamak amacıyla, hastalara nazal provokasyon ve deri testleri uygulanmaktadır.

2.3.2 Deri Testleri Prick Testi

100 yıldan beri deri testleri, alerjik hastalıklar ve astım hastalığı tanısında kullanılmaktadır. Deri testlerinin tarihçesi 1865'de Charles H. Blackley ile başlamaktadır. Bu tarihten sonra süre gelen yıllar içinde çeşitli birçok değişikliklere uğramıştır. 1908 yılında Mantoux tarafından intrakutan testler uygulanmıştır. 1970'li yıllarda, prik testi, Pepy tarafından tekrar düzenlenerek bugünkü kullanılan şeklini almış ve alerjik hastalıkların tanı ve tedavisinde temel yöntem olarak tercih edilmiştir. IgE, gastrointestinal sistem, burun ve akciğer gibi organların yanı sıra derideki mast hücrelerinede tutunmaktadır. Kişide belli alerjenlere duyarlılık varsa, o alerjenin deriye uygulanması erken tip (Tip I) immün reaksiyona sebep olmaktadır [20].

2.3.3. Nazal Provokasyon Testi (NPT)

Klinik tanının doğruluğunu artırmak için kullanılan bir başka yöntem ise nazal provokasyon testidir. Nazal provokasyon testi insan vücuduna verilen alerjenlere karşı nazal mukozada oluşacak yanıtın belirlenmesini sağlamaktadır. Oluşan bu yanıt; kaşınma , aksırma, nazal mukozada ödem oluşumu, burun akıntısı (rinore) ile tanımlanmaktadır. Bu yöntem, alerjik rinit hastalığında, hastanın klinik geçmişi ve deri prik test sonuçlarının değerlendirilmesinde oluşabilecek karışıklıkların giderilmesinde yardımcı bir tanı yöntemi olarak büyük ölçüde tercih edilmektedir [20].

2.4 *Platanacea* Özellikleri ve Alerji

Platanus orientalis (Doğu Çınarı'nın) yayılım gösterdiği bölgeler Güneydoğu Avrupa'dan başlayarak, Türkiye ile Balkanlar üzerinden Batı Asya'dan Himalaya boyunca uzanmaktadır [21]. Türkiyede hemen hemen bütün dere kenarlarında ormanlık alanlarda doğal olarak bulunduğu gibi yerleşim yerlerinde gölge ağacı ve süs ağacı olarak da dikilmektedir. Bu sebeple büyük ve eski şehirlerde doğal anıt ağaçları olarak korumaya alınmıştır. Doğal alanı Kuzey Amerika'nın güney taraflarında olan *P. occidentalis* türüne ülkemizde Doğu Çınarı ile birlikte süs ağacı olarak parklarda ve yol kenarlarında bulunmaktadır. *P. acerifolia* ise (*Platanus*

hybrida, *Platanus hispanica*, *Platanus cuneata*, *P. occidentalis* *P. orientalis*) Doğu Çınarı ile Batı Çınarı'nın bir hibridi olarak kabul edilmekte ve İngiltere gibi Batı Avrupa ülkelerinde çok yaygın olduğu için Londra Çınarı olarak da adlandırılmaktadır [17].

Taksonomik Sınıflandırma

ALEM: PLANTAE

ŞUBE: MAGNOLIOPHYTA

SINIF: MAGNOLIOPSIDA

TAKIM: HAMAMELIDALES

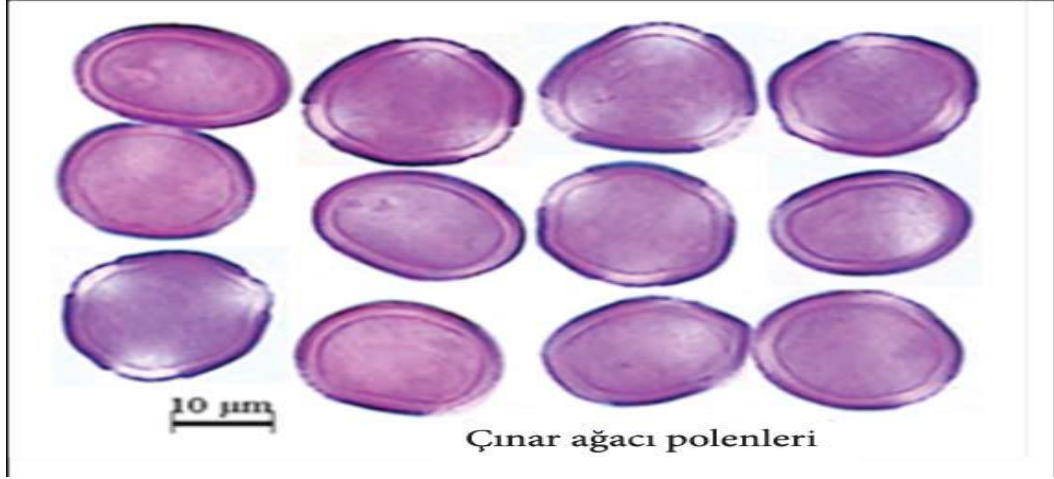
SINIF: PLATANACEAE

CİNS: PLATANUS

TÜR: PLATANUS ORIENTALIS

Çınar ağacının yuvarlak başlarında dişi ile erkek çiçek toplulukları değişik bölgeler üzerinde bulunmaktadır. Döllenme ile tozlaşma sonrasında aynı ekseninde tüylü yapılardan oluşan küre şeklinde 3-6 adet birleşik meyveler bulunmaktadır. Çınar bitkisi rüzgar yardımıyla tozlaşarak yuvarlak başlardaki erkek çiçeklerinde fazla miktarda polen üretilir. Yapılan araştırmada bir çınar ağacında üretilen polen miktarının 67 milyar, başka bir araştırmada ise 100 milyar civarında olduğu tespit edilmiştir [18].

Atmosferik polen çalışmalarında teşhisler genellikle *Platanus* cinsi bazında yapılmaktadır. *Platanus* polenleri genelde 16-22 µm büyüklüğünde ve 3 aperturlu (trikolporat) olup, yüzeyleri ise ince retikulattır (Şekil 2.2).



Şekil 2.4. Değişik bölgelerdeki hava örneklerinin mikroskopta analizi ve sayımı esnasında preparatlarda tespit edilen bazı çınar ağacı polenleri [19].

Çınar ağacı polenlerindeki alerjenlerin belirlenmesine yönelik yapılan bir çalışmada *P. acerifolia* türünde 5-66 kDa arasında alerjenler (Pla a 1-18 kDa; Pla a 2-43 kDa; Pla a 3-10 kDa ve Pla a 8-14 kDa) saptanmıştır [20]. Ancak yalnızca iki adet major alerjen (Pla a 1 ve Pla a 2) şeklinde tanımlanmıştır [21]. Ayrıca Pla a 1 benzeri proteinler diğer çınar türlerinde de (*P. occidentalis* *P. orientalis*, *Platanus racemosa*) tanımlanmıştır .

Plaa1, çınar ağacı polenlerinin polisensitizasyonlu hastalara %83'ünde, monosensitizasyonlu hastaların ise %92'sinde rastlanmıştır [18]. Plaa2, *P. acerifolia* polenlerine hassasiyeti olan hastaların %84'ünde var olup polen ekstraktında total IgE bağlanma kapasitesi %52 oranında belirtilmiştir [22].

Ayrıca besin alerjileriyle ilişkisine de bakılırsa Akdeniz bölgesinde Plaa3, besin alerjisi olmayan çınar polenine reaksiyon gösteren hastalarda minör alerjen, şeftali alerjisi bulunan, çınar polenine reaksiyon gösteren hastalarda da bir major alerjendir. Benzer alerjenler *P. orientalis* polenlerinde (Pla 1-18 kDa; Pla 2-42 kDa; Pla 3-12 kDa) gözlenmiştir [7].

Öte yandan çınar ağacı polenlerinde Plaa 1 ve Plaa 2 gibi alerjen proteinlerin yayılışı dizel egzoz partikülleri ile kirletici gazlar olarak hava kirleticilerinden duyarlanabilirler. Kütle spektrometresi ve iki boyutlu jel elektroforez ile oluşturulan analizler, dizel egzoz partikülleri ile kirletici gazlara maruz bırakılmasıyla çevre

kirliliği sonucu *Platanus* polenlerinde Plaa 1 salınımının yükseldiği durumlarda ınar ağacı polenlerinin alerjenik aktivitesini arttırdığı gözlenmiştir [23].



Şekil 2.5. *Platanus occidentalis* (Batı ınarı **(a)** Yol kenarı ağaçlandırması, **(b)**genel görüntü, **(c,d)** meyveler, **(e)** yapraklar.

2.5. *Plantaginaceae* Özellikleri ve Alerji

Plantago major, bilimsel sınıflandırmada plantae aleminde, lamiales sınıfında, plantaginaceae ailesinde, plantago cinsi içerisinde yer alan bir bitki türüdür (Şekil 2.4). Bitkinin normal büyüme süresi, çiçeklenebilmesi açısından yaklaşık 13 hafta olarak gözlenmiştir [24].Ve çiçeklenmesi de bir başak şeklinde olmaktadır [25]. Ayrıca bitki yılda ortalama olarak 1-30 cm arasında büyümektedir [25].



Şekil 2.6. *Plantago major* Bitkisi Genel Görünümü [29].

Kızılderililer *P. major*'a Avrupalıların gittikleri her yerde bulunmalarından ötürü 'beyaz adamın ayak izi' adını vermişlerdir. Bu adlandırma, bitkinin genus adı olan *Plantago*'ya da uyan bir şekilde verilmiştir; 'planta' Latince ayak alt yüzeyi anlamına gelmektedir. *P. major* eskiden de bilinen tıbbi bir bitkidir. Ayrıca İskandinavya'da yaraları tedavi edici özelliğiyle tanınmaktadır.

Ancak bu geleneksel olarak yara tedavisinde kullanılması oldukça eski tarihlere dayanmaktadır. Bitkinin yaprakları köpek ısırığının yara tedavisi için ilaç olarak önerilmiştir [26]. Aynı zamanda On üçüncü yüzyıla ait bir eser olan Völsung'ların destanı (Volsunga saga)'da Vikinglerin *plantago major* bitkisinin yapraklarını yaraları iyileştirmek adına tedavilerde kullandıklarından bahsedilmektedir [27].

Endüslü bir farmakolog ve botanikçi olan İbn El Baytar 12-13. yüzyılda *Plantago major*'u tarif etmiştir (Fleurentin vd., 1983). Danimarkalı Henrik Harpestreng tarafından 13. yüzyılda yazılan 'Liber Harbarum' adlı tıp kitabında da *Plantago major*'un balla birleştirilerek yara iyileşmesinde kullanılabileceğı, tereyağı ile kaynatılıp yenilerek ise insan vücudunda yer alan herhangi bir organı iyileştirebileceğı öne sürölmektedir. [28].

Taksonomik Sınıflandırma

ALEM: PLATAE

ŞUBE: MAGNOLIOPHYTA

SINIF: DICOTYLEDONAE

TAKIM: PLANTAGINALES

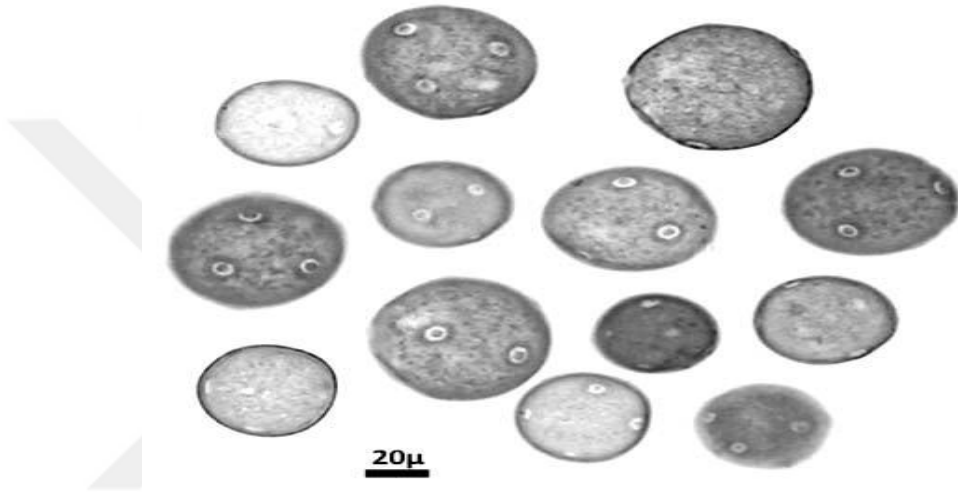
AİLE: PLANTAGINACEAE

CİNS: PLATANGO

TÜR: PLANTAGO MAJOR

2.5.3 Plantaginacea Özellikleri ve Alerji

Ülkemiz de atmosferdeki polen araştırmalarının yapıldığı 62 ayrı bölgenin tümünde bir veya çok miktarda *Plantago* polenleri gözlenmiştir[30]. Ülkemiz genelinde yürütülen bilimsel çalışmalarda *Plantago* polenlerinin yaygın olma sıklığı tüm polenlerin toplam miktarına göre %0.08-11.45 arasında değişmektedir. Türkiye’deki atmosferik polen araştırmalarında ise teşhisleri *Plantago* türü olarak gerçekleştirilmektedir. Polenler 16-35 µm çapında, yuvarlak şekilli, 6-14 apertürlüdür .



Şekil 2.7. Değişik Bölgelerdeki Atmosfer Örneklerinin Mikroskop Altında Sayımı ve Analizi Sonucu *Plantago* Polenleri [30].

Plantago polenleri atmosferde tespit edilmiştir. Alerjik reaksiyonları açısından önemli olan *Plantago* polenleri, Mayıs ve Haziran ayları arası başlıca diğer bahar aylarında duyarlı olan kişilerde reaksiyonlar oluşturabileceği bilinmektedir. *Plantago* polenlerinin alerjik tepkiye yol açmalarıyla ilgili ilk bulgular, Avustralya ve Amerika’dan gelmiştir. Amerika’nın Philadelphia şehrinde 1930’lu yıllarda 180 mevsimsel alerjik rinitli hastanın 51’inde *Plantago lanceolata* polenlerine deri testi pozitif sonuç vermiştir [31].

Avustralya Sidney’de ise alerji kliniğine başvuran 341 hastada *Plantago lanceolata* polenlerine karşı oluşan duyarlılık, deri prik testi sonucu %19 olarak tespit edilmiştir

[32]. *Plantago lanceolata* polenlerine deri prik testi pozitif olan hastalarda yapılan RAST testinin pozitifliği ise %68 oranındadır [32]. Sidney’de yine *Plantago* polenleri oluşum sezonunda astımı olan 82 hastanın 69’u bronşiyal provokasyon testi sonucu pozitif olarak tespit edilmiştir. [33].

Yine aynı bölgede gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise, bir veya birden fazla polen duyarlılığı bulunan 84 ayrı hastada yapılan deri prik testi sonuçları pozitif gözlenmiştir. *Plantago* cinsi Amerika, Avrupa ve Avustralya’da fazlaca yayılış gösteren *Plantago major* ve *lanceolata* türlerini kapsamaktadır.

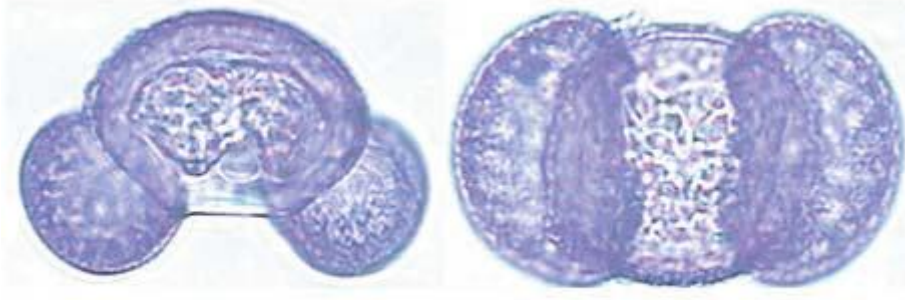
Plantago türünün polenleri aynı bölgede reaksiyon gösteren kişilerde alerjik konjunktivit, alerjik astım ve alerjik rinit gibi rahatsızlıklara sebep olmaktadır. *Plantago lanceolata* türünden izole edilen 16-20 kDa ağırlığındaki majör alergen Pla l.1 olarak adlandırılmıştır. Plal.1 alerjeni, *Plantago* polenlerine alerjisi olan bireylerin %80’inden fazlasında spesifik IgE üretimine sebep olan bir glikoproteindir.

2.6. Pnaceae Özellikleri ve Alerji

Pinus(çam ağacı) cinsinin Güney ile Kuzey Yarımkürede Avrupa ve Kutup Bölgesinde, Kuzey Amerika, Guatemala, Batı Hindistan, Endonezya ve Kuzey Afrika da doğal yayılış gösteren 100’den fazla türü bulunmaktadır [34].

Ülkemizde Pinus cinsine ait beş ayrı tür (*Pinus brutia*-kızılçam, *Pinus nigra*-karaçam, *Pinus pinea*- fıstık *Pinus halepensis*-Halepçamı, *Pinus sylvestris*- sarı çam) doğal yayılış göstermektedir [35].

Doğal yayılışı olan üyeler ve Türkiye’de doğal yayılışı olmayan; *Pinus coulteri*-büyük kozalaklı çam, *Pinus palustris*-güney sarıçamı, *Pinus mugo*-dağ çamı, *Pinus pinaster*-sahil çamı, *Pinus radiata*- Monteri çamı, *Pinus ponderosa*-Arizona akçamı, *Pinus sabiniana*-sabin çamı, *Pinus cembra*-İsvicre fıstık çamı, *Pinus aristata*-Hickory çamı, *Pinus griffithii*-ağlayan çam, *Pinus peuce*-Rumeli veymut çamı, *Pinus strobus*-veymut çamı gibi *Pinus* cinsine ait üyelerin süs bitkisi olarak yaygın bir şekilde parklarda ve bahçelerde dikimi yapılmaktadır [34].



Şekil 2.8. Değişik Bölgelerdeki Hava Örneklerinin Mikroskop Üzerinde Sayımı ve Analizi Sonucu Tespit Edilen Çam Polenleri. [35]

Taksonomik Sınıflandırma

ALEM: PLANTAE

ŞUBE: PINOPHYTA

SINIF: PINOPSIDA

TAKIM: PINALES

AİLE: PINACEAE

CİNS: PINUS

TÜR: PINUS BRUTIA

Alerjik etkilerin dışında olumlu açıdan kızılçam artım ve büyüme özellikleri, yayılış alanı, yarattığı ekonomik değer sebebiyle ülkemizin en önemli asli orman ağacı türlerinden bir tanesidir. Bu önem, ülkemizde yayılış alanı bakımından ilk sırada, hacim ve sayı olarak da Anadolu karaçamından sonra ikinci sırada yer alması, odunun çeşitli ve fazla kullanım alanına sahip olmasından ileri gelmektedir. Bu yüzden kızılçam ağaç türünü çok yönlü ele alınıp tanımlanabilmektedir.

Pinus polenlerinin alerjenik reaksiyonları ile ilgili ise farklı fikirler mevcuttur. Çam polenlerinin alerjik reaksiyonlarının bir miktar az olduğunu gösteren çalışmaların yanı sıra, alerjenik reaksiyonlarının oldukça yüksek olduğunu ortaya koyan çalışmalarda mevcuttur [36-40].

Pinus sp. polenlerinin alerjik etkilerinin ise fazla olmadığı ileri sürülmektedir [40]. 1311 astım hastalığı olan bireylerle ile yapılan deri prick testi çalışmaları sonuçlarında, hastaların 122 (% 9. 3)' sinin *Pinus* sp. polenine duyarlı olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 2.9. Kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) [41].

BÖLÜM 3

MATERYAL ve METOD

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Gliserin (%99.5, Tekkim, Türkiye)
- Asetik fenil (Tekkim, Türkiye)
- Bazik fuksin (Tekkim, Türkiye)
- Silika jel 60 (Merck, Almanya)
- Aseton (Merck, Almanya)
- Etanol (%96, Merck, Almanya)
- Bakır II sülfat (Tekkim, Türkiye)
- Bişinkoninik Asit (BCA, Serva, Almanya)

3.1.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

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

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler

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



3.2. Polenlerin Temini ve Toplanması

Bu tez kapsamında incelenen *Platanus orientalis* (Doğu çınarı), *Pinus brutia* (Kızılcıam), *Plantago major* (Sinirli Ot) türlerine ait polen örnekleri Gaziantep şehrinde bulunan Gaziantep Üniversitesi kampüsü içindeki ağaçlandırılmış alanlarda, tozlaşma dönemindeki ağaçlardan temin edilmiştir. Tür teşhisleri Botanik ABD Öğretim Üyesi Dr. Hüseyin TEKİN tarafından yapılmıştır. İncelenen polenlerin toplanma zamanları önem taşımaktadır.

Polen çalışması için ekstraksiyon yapmak amacı ile toplanan polenler ise taze polenler olmalıdır. Polen toplamak için en doğru zaman polen keselerini içeren stamenlerin açılmasından hemen sonraki evredir. Bu tez çalışması için belirlenen üç farklı bitki türünün çiçeklenme zamanları dikkate alınarak Gaziantep Üniversitesi kampüsü arazisinde bulunan ağaçlandırılmış olan alanlardan, steril eldiven kullanılarak toplanmıştır. Toplanan bitkiler, kontaminasyona engel olmak için farklı odalarda 1 gün süreyle kurutma kağıtlarına serilerek kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra kuruyan erkek çiçeklerin üzerine steril bir spatül yardımıyla vurma hareketiyle polenlerin kâğıt üzerine düşmesi gerçekleştirilmiştir. Düşen polenler bir spatül yardımıyla toplanarak renkli cam şişelere yerleştirilmiştir. Polenlerin kuruyabilmesi için 24 saat boyunca desikatörde bekletilmiştir. Kuruma işleminin en iyi şekilde sağlanması için desikatör içerisine nem emici (desikant) olarak silika jel konulmuştur. Kurutma işleminden sonra, kuruyan polenler, farklı por çaplarına (250, 180, 90, 63 nm) sahip steril eleklerden süzülerek diğer partiküllerden arındırılmıştır. Eleme işlemine 250 nm por çapında elek kullanılarak başlanılmıştır. En son ise 63 nm elekten geçirildikten sonra altta kalan partiküllerden arınmış toz halindeki polenler toplama kabında biriktirilmiştir. Eleme işleminden sonra polenlerin içerisinde bulunan yabancı partiküllerden ayırmak için asetonla yıkama metodu kullanılmıştır.

Bu yöntemle göre hassas terazide tartılan polenler aseton eklenerek karıştırılarak, polenler yabancı partiküllerden arındırılmıştır. Polen aseton mix'i mikroependorflara bölünerek 1 saat santrifüj (Hettich Zentrifugen Mikro 200, + 4 °C' de 11.000 rpm'de) edildikten sonra santrifüjden alınan örneklerin süpernatant kısımları ayrılarak + 4 °C' de muhafaza edilmiştir.

Kalan pellet kısmı ise 37 °C ayarlanmış etüvde 1 gün süreyle kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra küflenmemesi için etüvden alınan polenler, desikant silika jel eklenen vakumlu desikatörde 48 saat boyunca kurumaya bırakılmıştır.

Daha sonra elde edilen polenler steril cam kaplara konulup, ağızları parafilmlenerek kapağı kapatılmıştır. Cam kapların dış kısmı ışık görmeyecek şekilde alimünyum folyo ile sarıldıktan sonra polenler çalışmada kullanılmaya hazır halde + 4 °C’ de muhafaza edilmiştir.

3.3. Polen Morfoloji Çalışmaları

Bu çalışmada kullanılan üç farklı türe ait polen örneklerinden aynı zamanda Wodehouse yöntemine göre mikroskopta incelemek ve fotoğraflama yapmak üzere preparatlar oluşturulmuştur.

3.3.1. Wodehouse Yöntemi

Çiçek anterlerinden alınmış ve saflaştırılmış olan polenleri, steril bir lama aktararak, içerisine yağlar ile reçinelerin erimesi için %96’ lık alkolden 1-2 damlacık damlatılmıştır. Preparat alkolün uçması için ısıtıcıda bekletilmiştir. Daha önce hazırlanan bazik fuksin eklenen gliserin jelatinden 2 mm³ kadar alınarak lam üzerine eklenmiş ve bir süre ısıtıcıda erimesi sağlanmıştır. Gliserin jelatin ve polenlerin iyice karışmasını sağlamak amacıyla, steril iğne ucu kullanılarak bir miktar karıştırılmıştır. Lam üzerine 45 °C’ lik açılı ile lamel kapatılarak ve etrafına entellan (kanada balsamı) sürülerek örnekler bir süre kurumaya bırakılmıştır. Ve yapılan işlemler sonucunda bu preparatlar daimi kullanılabilecek preparatlar haline getirilmiş oldular. Hazırlanan preparat üzerine polenlerin hangi tarihte yapıldığını ve hangi bitki türüne ait olduğunu gösteren etiketleme işlemi yapılmıştır [42].

3.3.2 Gliserin Jelatin Hazırlanması

7 g toz şeklindeki jelatin hassas terazide tartılarak steril edilmiş erlen içine alınmıştır. Daha sonra üzerine 42 mL distile su ilave edilerek ve 120 dk şişmesini sağlamak için bekletilmiştir. Jelatin 80 °C su banyosunda 15 dk cam baget yardımıyla karışım homojen bir yapı alan dek eritilmiştir. Daha sonra karışıma 50 mL gliserin eklenip homojen bir yapı oluşuncaya dek 15 dk daha su banyosunda bekletilmiştir.

Oluşabilecek kontaminasyonları önlemek amacıyla karışıma %2' lik asetik fenil' den 1 mL ilave edilmiştir .

Polenlerin görünürlüğünü artırmak için ise Gliserin-jelatin karışımına boyar bir madde olan bazik fuksin eklenmiştir. Daha sonra karışım Steril cam petri kaplarına aynı miktarlarda dökülerek soğumaya bırakılmıştır.

Petri kaplarına, etiketleme işlemi yapıldıktan sonra, kullanılmak üzere + 4 °C' de muhafaza edilmiştir. Katılaşp donan karışım kullanılmak istendiği zaman ise temiz spatül yardımıyla bir miktar alınarak lam üzerine sürülmüştür. Daha sonra homojen bir hal alması ve karışımdaki polenlerin daha net gözlemlenebilmesi için lam ısıtıcı üzerine konarak 5 dk kadar bekletilmiştir [6].

3.4. Polenlerin Ölçümü

Wodehouse yöntemine göre hazırlanmış daimi preparatlarda, çalışma için kullanılan her bir bitki türüne ait polenlerin ölçümleri yapılmıştır. Apertür çapı, ekzin kalınlığı ve polen çapı ölçülerek kaydedilmiştir. Işık mikroskobunda polenlerin morfolojik analizleri Nikon ECLİPSE TS 100 marka mikroskop ile çalışılmış olup, ölçümler için 40x' lık objektif kullanılmıştır.

3.4. Polen Fotoğraflarının Çekilmesi

Bu çalışma kapsamında incelenen bitki türlerine ait polenlerin mikro fotoğrafları Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümündeki Nikon ECLİPSE TS 100 marka mikroskoba bağlı tam otomatik mikrofotografi cihazı ile çekilmiştir. Elde edilen polen mikro fotoğraflarının mikroskop altındaki büyütmesi 40x 'tır.

3.5. Ekstraksiyon İçin Gerekli Olan Reaktifler

3.5.1. 'Coca' Çözeltisinin Hazırlanması

Polen içerisindeki etkin maddenin ekstraksiyon materyali içerisine işleyebilmesi için 'Coca' çözeltisi kullanılmıştır. 'Coca' çözeltisi Pasteur Enstitüsünde uygulanan yöntemine göre, aşağıda gösterildiği gibi hazırlanmıştır [43].

Tablo 3.1. Coca Çözeltisi

NaCl	9g
NaHCO₃	3g
C₆H₅OH	5g
+ Distile su	
Toplam	
1000ml	

Distile su içerisinde sırasıyla NaCl, NaHCO₃ ve C₆H₅OH eritilmiştir. Hazırladığımız ‘Coca’ çözeltisinin pH’ sı % 10’ luk NaOH den birkaç damla ilave edilerek 8.2’ ye ayarlanmıştır [44].

3.6. Polen Ekstrelerinin Hazırlanması

Gaziantep Üniversitesi kampüsüne ait araziden temin edilen polenlerin içerisinde bulunan etken maddelerin ekstraksiyonu için[36]. tarafından kullanılan ekstraksiyon yöntemiyle yapılmıştır. Her bir türe ait polenden hassas terazi ile 500 mg tartılarak steril tüplere konulmuştur. Üzerine önceden hazırlanmış olan ‘Coca’ çözeltisinden 4,5 mL eklenmiştir. Yapılan karışım + 4 °C’ de manyetik karıştırıcıda 1 gün süreyle karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda karışım 10 mL’lik kapasiteli santrifüj tüplerine alınarak Hettich Universal 320R markalı santrifüj cihazında 2750 devir/dakika (rpm) ayarlanarak 10’ ar dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj işleminin sonunda çökelen polenlerin üst kısmında kalan sıvı serum kısmı tekrar santrifüj edilmek üzere ayrılmıştır. Bu yapılan uygulama, sıvı kısmında çökelen polen kalmayınca kadar birçok defa bu işlem tekrar edilmiştir.

Ekstraksiyon işleminin amacı, polenin içerisinde bulunan etken maddenin açığa çıkarılmasıdır. Uygulama sonunda, çöken polen artığı gözlenmemesine rağmen, diğer tortulardan da arındırılabilmesi için süzme (filtrasyon) işlemi uygulanmıştır.

3.7. Süzme (Filtrasyon) Yöntemi

Ekstraksiyon işlemi sonucu ulaşılan polen ekstraktına Aytuğ vd. (1991)'nın belirttiği şekilde filtrasyon işlemi uygulanmıştır. Bu işlemde polen ekstraktı üzerine 5 mL'ye tamamlanacak şekilde 'Coca' çözeltisi ilave edilmiştir. Enjektör filtresi (Isolab PVDF 0.45 µm) yardımıyla her polen ekstraktı için süzme işlemi yapılmıştır ve 15 mL kapasiteli steril flakonlara konulmuştur. Daha sonra ekstraktlara %50 oranında gliserin karıştırılarak ağızları sıkıca kapatılmıştır. Bu şekilde hazırlanmış olan gliserinli ekstraktlar buzdolabında + 4 °C'de 3 yıl kadar saklanabilecek duruma getirilmiştir[45].

3.8. Polenin Kuru Ağırlığının Hesaplanması

Polenlerin kuru ağırlığını tespit etmek için kullanılan dara kaplarının ağırlıkları, hassas terazi ile tartılmıştır. Desikatör içerisinde konulan dara kapları 110°C'lik etüvde 2 saat bekletildikten sonra soğumaya bırakılmış olup daha sonra tekrar tartılmıştır. 10 mg tartılan polen örneğinin üzerine 3 mL saf su ilave edilmiştir. Bu karışımdan 1'er mL dara kaplarına alınmıştır. Karışımdaki suyun buharlaşmasının kolaylaştırmak için etüve nem çekici özelliği olan kuru bakır (II) sülfat (CuSO_4) eklenmiştir. Daha sonra karışıma desikant eklenerek 110 °C olan ve içerisinde kuru bakır bulunan etüve konularak suyu buharlaştırılmıştır. Bu sürenin sonunda kaplar soğutulup tekrar tartım işlemi yapılmıştır.

3.9. Polen Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çalışmada, sensitif protein tayin yöntemlerinden birisi olan ‘bişinkoninik asit (BCA)’ temelli protein analizi yapılmıştır. Total protein kantitatif tayininde ve kolorimetrik tespitinde sensitif ve deterjan uyumlu olan bu yöntem, iyi bilinen Biuret reaksiyonunun bir kombinasyonudur ve alkali ortamda proteinlerin Cu^{+2} ’nin Cu^{+1} ’e indirgemesi, kupröz (Cu^{+1}) katyonun bişinkoninik asit içeren reagent ile birlikte sensitif ve selektif olarak kolorimetrik tespitini içermektedir.

Bu analizin mor renkli reaksiyon ürünü, iki molekül BCA’nın bir Cu^{+1} iyonu ile şelasyonu yoluyla meydana gelmiştir. Suda çözünebilen bu kompleks 562 nm’de çok güçlü bir absorbands değeri göstermektedir (BCA kit kullanım klavuzu) standardizasyonu yüksek olan bu reagentler, reaksiyon ürünlerinde 562 nm’de, 25-1000 $\mu\text{g/mL}$ kadar geniş bir aralıkta, artan protein konsantrasyonları ile lineer bir artış sağlamaktadırlar.

Makromoleküler protein yapısı, peptid bağlarının sayısı ve aminoasidin varlığının (sistin, sistein triptofan ve tirozin) BCA ile renk oluşumundan sorumlu olduğu bildirilmiştir (BCA kit kullanım klavuzu)

Bu çalışma kapsamında Gaziantep Üniversitesi kampüsünün arazisinden elde edilen farklı tür bitkilerin polen örneklerinin ekstraksiyonu işleminden sonra, total protein konsantrasyonunu saptamak için bişinkoninik asit (BCA) yöntemine (Walker, 2002) göre çalışan BCA Protein Macro Assay Kit (Serva Electrophoresis GmbH) kullanılmıştır. BCA yönteminin ilkesi, proteinlerin, alkali bir çözeltide (biüre reaksiyonunda) Cu^{+2} ’yi Cu^{+1} ’e indirgeyebilmesi ve bişinkoninik asit ile mor renge dönüşmesini içermektedir. 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 eklenmiştir.

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 eklenmiştir) hazırlanan çalışma solüsyonu kuyucuklara eklenerek plaka 37 °C’de 30 dk bekletilmiştir. Ardından 562 nm’de kör örneğe (saf su) karşı absorbands ölçümü alınmıştır (Thermo Scientific Multiskan Go). Bu işlemlerin öncesinde standart grafiğin oluşturulmasında ise kit içerisindeki sığır serum albumini (“Bovine

Serum Albumin", BSA) standardı ve kör örnek olarak saf su kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (1, 0.75, 0.50, 0.25, 0.10, 0.05, 0.025 mg/mL) hazırlanan standart protein örneklerinin konsantrasyon ve absorbans değerleri kullanılarak standart grafik oluşturulmuş olup, oluşturulan standart grafiğın matematiksel ifadesi, lineer regresyon doğrusunun denklemi şeklindedir.



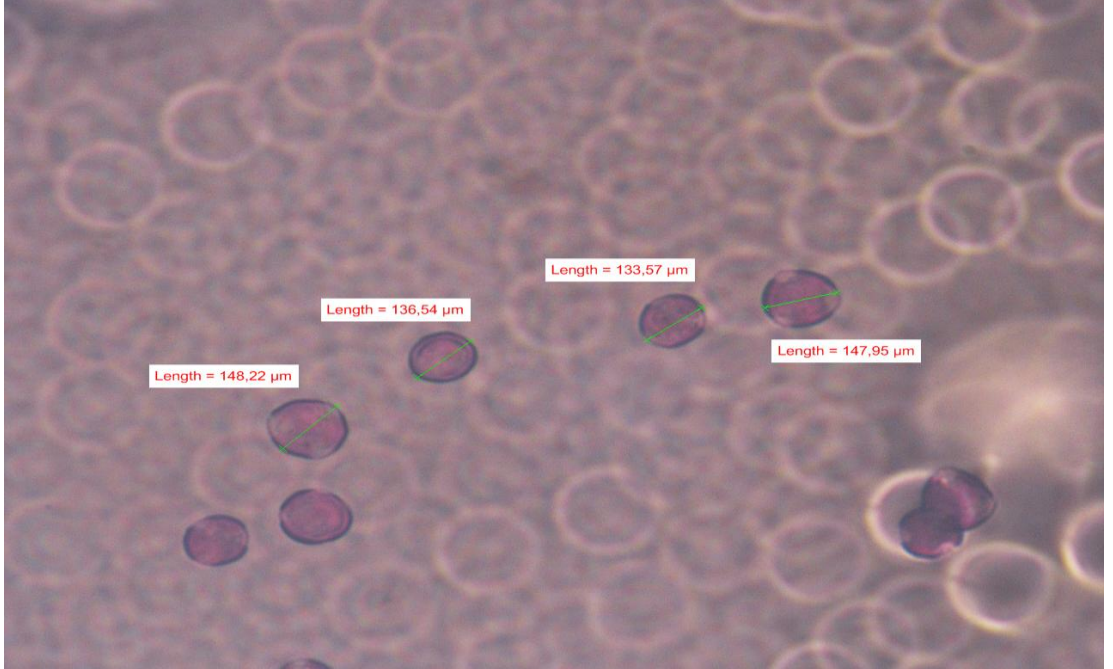
BÖLÜM 4

BULGULAR

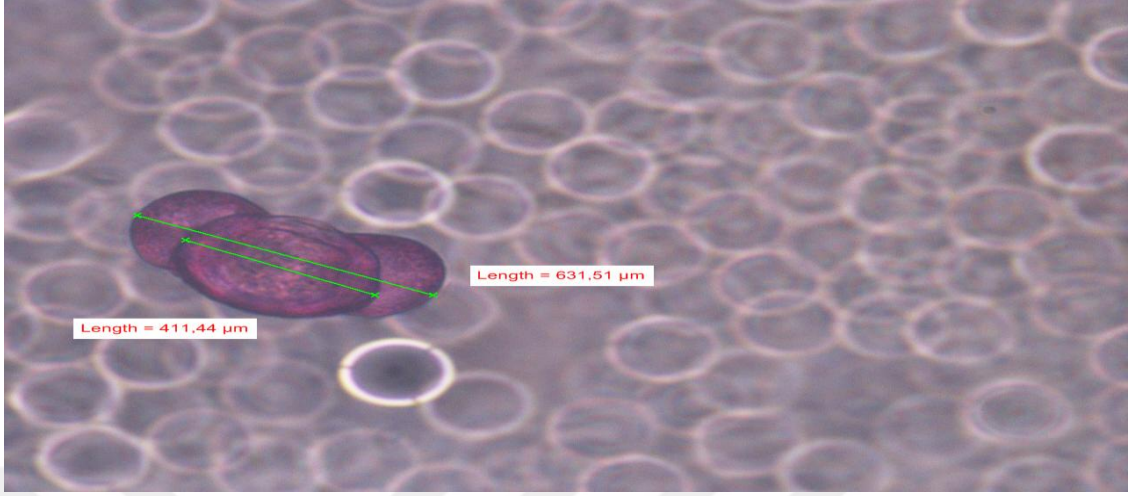
4.1 Polenlerin mikrofotoğrafları

4.2 Bitki Polenlerinin Mikro fotoğrafları

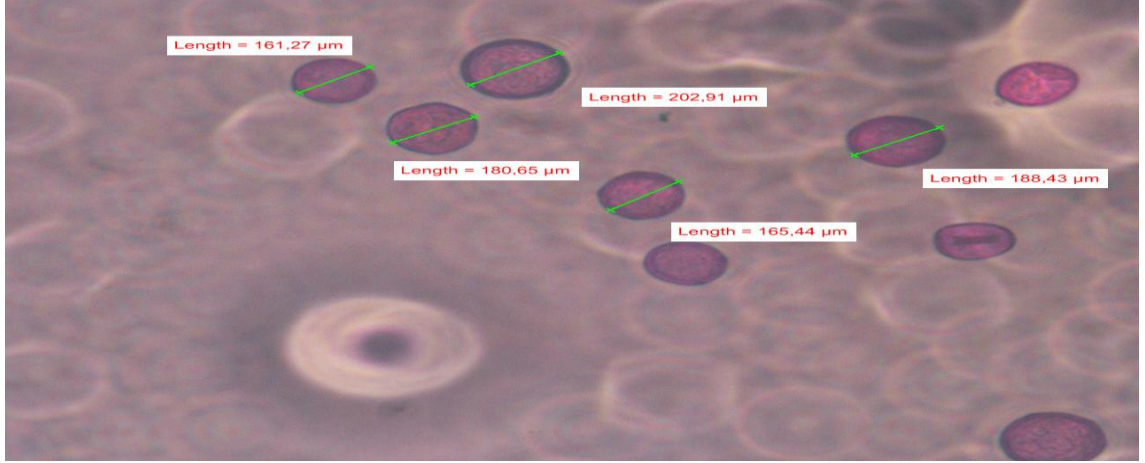
Pinaceae ailesine ait *P. brutia*, Platanaceae ailesine ait *P. orientalis* , Platanaceae ailesine ait *P. major* türlerinin polinizasyon dönemlerinde toplanan çiçeklerinden polenler saflaştırılmıştır. Daha sonra Wodehouse metodu kullanılarak polen preparatları hazırlanmıştır. Nikon ECLİPSE TS100 marka ışık mikroskopuyla polen mikro fotoğrafları çekilmiştir. Polenlerin, por çapı ekzin ve polen çapları ölçülmüştür.



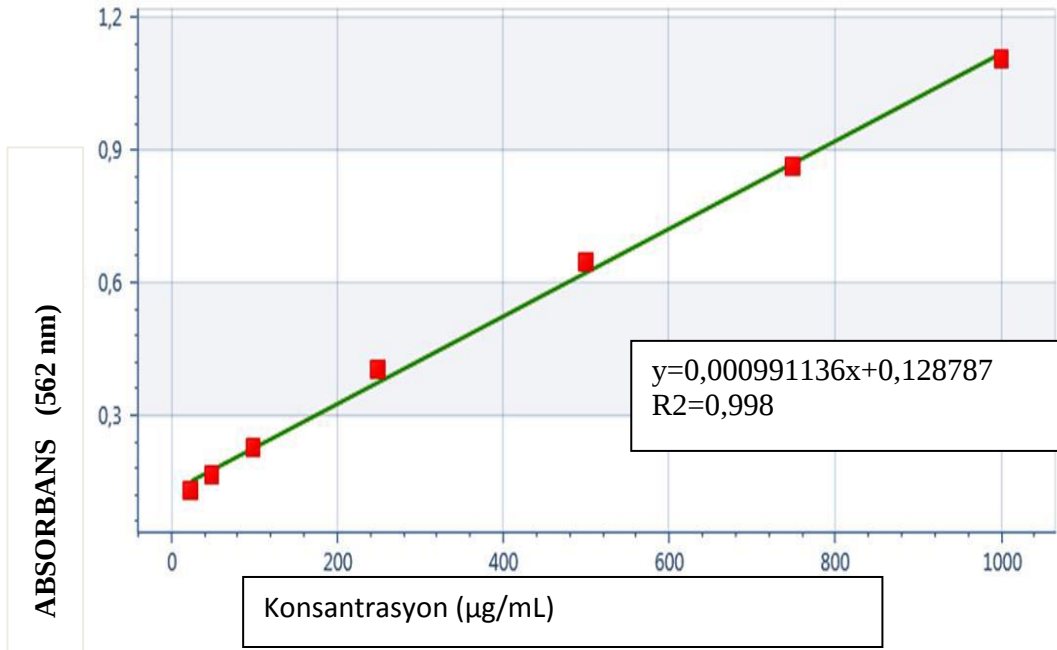
Şekil 4.1: *P.orientalis* polen morfolojisi Nikon ECLİPSE TS100 marka mikroskop ile yapılmıştır. (X40'lık objektif)



Şekil 4.2: *P. brutia* polen morfolojisi ölçümleri. (X40’lık objektif)



Şekil 4.3: *P. major* polen morfolojisi ve ölçüm sonuçları. (X40lık objektif)



Şekil 4.4: Protein konsantrasyonunun 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.

Tablo 4.1. Polen ekstreleri ile ticari polen ekstrelerinin protein konsantrasyonlarının karşılaştırılması.

	ÖLÇÜMLER	ORTALAMA	STANDART SAPMA	SONUÇLAR µg/Ml
<i>P.major</i> Ticari	0,860/0,877/0,881	0,873	0,009104	1010,4099
<i>P.major</i> Saf	0,835/0,933/0,930	0,899	0,045507	1037,3151

Tablo 4.2. Polen BCA ölçüm sonuçları.Standart kitlerin dilüe edilmiş hali ve saf polen karşılaştırması.

	ÖLÇÜMLER	ORTALAMA	STANDART SAPMA	SONUÇLAR
<i>P.orientalis</i> Saf	1,408/1,451/0,638	0,873	0,009104	1010,4099
<i>P.orientalis</i> dilüsyon 1	0,210/0,208/0,208	0,209	0,000943	340,471607
<i>P.orientalis</i> dilüsyon 0.1	0,207/0,210/0,207	0,208	0,001414	339,1263493

Tablo 4.3. Polen BCA ölçüm sonuçları.Standart kitlerin dilüe edilmiş hali ve saf polen karşılaştırılması

	ÖLÇÜMLER	ORTALAMA	STANDART SAPMA	SONUÇLAR
<i>P.brutia</i> Saf	1,178/1,216/1,203	1,199	0,015769	1339,661762
<i>P.brutia</i> dilüsyon 1	0,210/0,209/0,202	0,207	0,003559	338,7900349
<i>P.brutia</i> dilüsyon 0.1	0,206/0,209/0,209	0,208	0,001414	339,7989781

BÖLÜM 5

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

İngiltere’de Charles Blackey 1966 yılında yakalandığı saman nezlesinin *Lolium italicum* türü bitkinin polenlerinden kaynaklandığını deri testleri ile göstermiş ve polenin havadan geldiğini düşünerek 24 saat açık havada bıraktığı vazelinli lam üzerinde tutulan polenleri mikroskopta incelemek suretiyle ilk aeropalinolojik çalışmayı gerçekleştirmiştir [46].

Polenler taşımış oldukları proteinler veya glikoproteinler nedeniyle, alerjik etki göstermektedir. Alerjik hastalıklara sebebiyet veren birçok alerjen kaynakları mevcuttur. Alerjik duyarlılığın artmasına ve buna bağlı belirtilerin ortaya çıkmasında en yaygın etken ise polenlerdir [1].

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında, Pinaceae ailesinden *P. brutia* , Plantaginaceae ailesinden *P. major*, Plantacaeae ailesinden *P. orientalis* polenlerinin alerjenitesi ve alerjenik proteinleri araştırılmıştır.

Bir başka çalışmada Balıkesir ili Akçay Beldesi’nde yapılmış atmosferde polenlerine en çok rastlanan odunsu bitkilere ait taksonlar sırasıyla; *Pinus* sp., Cupressaceae/Taxaceae, *Alnus* sp., *Platanus* sp., *Quercus* sp., *Salix* sp., *Olea* sp., *Morus* sp., ve *Fraxinus* sp., otsu bitkilere ait taksonlar ise Gramineae, *Plantago* sp. ve Urticaceae olarak saptanmıştır. Bu bölgede yapılan çalışmalar sonucu aylara göre atmosferde bulunan polen sayılarındaki değişiklikler gözlemlenmiştir. *Platanus orientalis* için, mart ayında 180 polen/cm² iken nisan ayında 500 polen/cm² bulunduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde mart ayında 177 polen/cm² olan pinus cinsi nisan ayında 1633 adet gözlemlenmektedir. Haziran ayında ise yapılan ölçümlerde *Plantago* sp. 122 polen/cm² ölçülmüştür [48].

2012 yılında Akçay atmosferinde en çok rastlanan polenler, cm^2 'de yıllık 2.145 polen ile *Pinus* sp. polenleridir ve bu sayı yıllık toplam polen miktarının % 26,45'ini oluşturmaktadır. Akçay atmosferinde *Pinus* sp. polenlerinin bu kadar yaygın bulunmasının sebepleri; *Pinus brutia* 'nın bu bölge de 800-1000 metre arası çok sayıda yayılış göstermesi ve çok miktarda polen üretmesidir. Yurtdışında ve Türkiye'de bu taksonun dominant olduğu örnekler şöyledir; Washington'da % 11,01 [49] oranında rastlanırken, İspanya Almeria'da % 3,04 [48]. Cordoba Hornachuelos Doğal Parkı'nda % 1,85 [39]. Çin Yunan'da % 38,7 [30]. oranlarında kaydedilmiştir. *Pinus* sp. polenlerinin alerjik etkilerinin ise fazla olmadığı ileri sürülmektedir [41]. ancak Gioulekas ve ark. (2004)'nın 1311 astım hastalığı olan bireylerde yaptıkları deri prick testi çalışmalarında, bu hastaların 122 (% 9.3)' sinin *Pinus* sp. polenine duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Platanus sp.; bu taksona ait polenler 867 polen/ cm^2 ile Akçay atmosferindeki yıllık toplam polen miktarının % 10,69'unu oluşturmaktadır. İl ve ilçenin merkezinin park ve yol kenarlarında bu cinsin ağaçlarına rastlamak mümkündür.

Plantago polenlerinin alerjiye sebebiyet vermesiyle ilgili öncelik bulgular, Avusturalya ile Amerika'dan gelmiştir. Amerika'nın Philadelphia şehrinde 1930'lu yıllarda 180 mevsimsel alerjik rinitli hastanın 51'inde *Plantago lanceolata* polenlerine uygulanan

deri testi sonucu pozitif çıkmıştır[37]. Avustralya Sidney'de ise alerji kliniğine başvuran 341 hastada *Plantago lanceolata* polenlerine duyarlı hastalarda deri testi pozitifliği %19 olarak saptanmıştır. *Plantago lanceolata* polenlerine deri prik testi pozitif olan hastalarda yapılan RAST testi pozitifliği ise %68 oranında gözlenmiştir [38]. Yine Sidney'de *Plantago* polen sezonunda astımlı 82 hastanın 69'u bronşiyal provokasyon testi sonucu pozitif gözlenmiştir[39].

Bu cinse ait polenler, 2012 yılı içerisinde toplam polen miktarının %2,06'sını oluşturmaktadır ve atmosferdeki toplam polen miktarı ise cm^2 'de 167 olarak tespit edilmiştir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda Balıkesir'de %1,69 [42]. Eskişehir-Sivrihisar'da % 0,08 (Potoğlu, 2008), Balıkesir-Şavaştepe'de % 0,36 (Bilişik vd., 2008), Bursa-Mudanya'da %1,72 [43], Çanakkale'de %1,89 [44], Eskişehir'de % 0,51 , İzmir'de % 1,20 [44]., Gemlik (Bursa)'de % 0,84 [45]. *Plantago* sp. cinsine

ait bitkilerden birçok tür ruderal bitkiler olup özellikle ülkemizde şehirleşmiş alanlarda bile geniş bir yayılım göstermektedirler. Bu takson içerisinde yer alan polenler güçlü bir alerjik duyarlılığa sebep olmaktadır[45].

Türkiyede de astımlı veya alerjik rinitli bireylerde *Plantago* polenlerine karşı reaksiyonların görüldüğü çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda, *Plantago* polenlerine karşı oluşan reaksiyonlar %2.85 ile %63 arasında gözlenmiştir. Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalına bağlı Pediatri Göğüs Hastalıkları ve Allerji Ünitesine alerjik hastalık öyküsü veya tanısıyla başvuran ve en az bir alerjene karşı duyarlılığı tespit edilen 421 çocukta deri testi sonuçlarına göre sinir otu polenlerine %2.85 oranında duyarlılık gözlenmiştir[46].

Belirli mevsimlerde solunum sistemi rahatsızlığına sebep olan polenler, farklı coğrafik bölgelerde, çiçeklenme döngülerine bağlı olarak, atmosfere dağılmaktadırlar. Polen alerjisinin tanısının ilk basamağını; yaşanan bölgede maruz kalınan polen kaynağının tespit edilmesi oluşturmaktadır. Polenlerin yapıları, havadaki miktarları, histokimyasal özellikleri ve alerjenitelerinin bulundukları coğrafi bölgeye, iklime ve çevre koşullarına göre değiştiği bilindiği için [47]. alerji tanı ve tedavi yöntemlerinin güçlendirilmesi için, gerek klinik testlerde gerekse moleküler analizlerde hastaların yaşadığı bölgelerde bulunan polenlerle çalışmak gerekmektedir.

İzmir üniversitesinde yapılan çalışmalar sonucu polen sayılarında artma ve azalma düzenli bir korelasyona sahip olmamakla birlikte, bitkilerin tozlaşma, çiçeklenme dönemlerine ve hava durumuna göre değişiklik izlenmektedir. Bu çalışmalarda tür ve cins düzeyinde toplanan bitki polenlerinin özellikleri ve sayısal mevsimsel değişimleri aşağıda incelenmektedir [11].

Çalışmanın içerisinde odunsu bitkilere ait pınaceae familyası ağaçları 4 cm²'ye düşen 13856 adet polen ile en baskın yayılışı göstermişlerdir. pınaceae familyasına ait polenler toplam polen sayısının % 59,56 sini oluşturmaktadır. Otsu bitkilerde ise graminae polenleri 4 cm²'ye düşen 1300 adet polen ile toplam polen miktarının % 5,59 unu oluşturarak otsu bitkiler arasındaki en çok polen yayılışı gösteren ailedir. Tanınamayan 4 cm²'ye düşen polen sayısı 509 dur ve tüm polenlerin % 2,19 unu

oluşturmaktadır. Otsu türler sıklıkla odunsulara kıyasla çok daha az polen miktarlarında bulunmaktadırlar. Bunun sebepleri ise odunsu bitkilerin daha fazla polen saçma kapasitesine sahip olmasıdır. Örneğin pınaceae familyasına ait ağaçlar milyarlarca polen saçabilmektedir. Ayrıca tozlaşma mevsimleri dışında dahi bazı polenler gözlenmiştir bunun sebebi ise saçılmış olan polenlerin doğada çok uzun süreler durabiliyor olmasıdır duruyor. Çam polenleri buna en büyük örnektir, polen takvimini incelediğimizde tozlaşma döneminde çok yüksek sayılarda çam poleni görmekteyiz fakat bunun dışındaki aylarda da daha az sayıda polenlerine rastlanmaktadır. Bunun sebebi ise doğada var olan polenlerdir. Özellikle odunsu bitkilerin polenleri tozlaşma dönemlerinden [11].

Palinolojik çalışmalarda türlerin mevsimsel şartlara bağlı olarak ve tozlaşma süreçlerindeki değişiklikler ile yıllar içerisinde bazı farklılıklar gözlenebilmektedir. Örnek çalışmada polenler yılın her ayı gözlenmiştir kış ayların havada çok az miktarda polen bulunmaktadır. Genellikle kış mevsiminde tozlaşma sonucunda oluşan polenlerden daha çok doğada önceki mevsimlerden kalmış olan polenler yakalanmıştır. Şubat ayında ise Cupressaceae tozlaşma sonucu gözlenmeye başlamıştır. Yaz aylarında çoklukla *Castanea sativa*, Graminae, *Plantago spp.*, *Pinus spp.* polenlerine rastlanmıştır. Havada polen yoğunluğunun en fazla olduğu aylar Mart, Nisan, Mayıs gibi bahar aylarıdır. Bu örnek çalışmada en az gözlenen tür *Eucalyptus camaldensis* dir ve 4 cm²'ye düşen toplam polen sayısı 3 tür. Çalışma alanında bulunuyor olmasına karşın çok az polen toplanan bu türün çok uzaklara ve çok fazla polen yayamadığını gözlenmiştir [11].

Alerjenik polenler ile hazırlanan ekstreler alerjinin tanı ve tedavisi için fazlaca önem teşkil etmekte olup bu ekstreler, alerjinin teşhisi amacıyla deri prik testlerinde, tedavi için subkutan enjeksiyon olarak kullanılmaktadırlar. Alerjenik duyarlılığın tedavisi immünoterapik yöntemlerle yapılmaktadır. Hasta bireyin hangi tür polene karşı duyarlılığı var ise o polen türünden oluşturulan ekstreler, duyarlı reye giderek artırılan dozlarda deri altına enjekte edilerek immün sisteminin güçlendirilmesi yoluyla tedavi sağlanmaktadır.

Ülkemizde alerjik rahatsızlıkların teşhis ve tedavisi amacıyla uygulanan ekstrelerin Ülkemiz topraklarında yetişen ve yetiştirilen bitki türlerinden oluşturulması ve o bölgeye ait alerjik reaksiyonların tedavilerinde kullanılması gerekmektedir. Çünkü bu tür alerjik hastalıklara sebebiyet veren etmenler ülkemizdeki alerjenik proteinlerdir. Ülkemizde alerjenik hastaların teşhislerinde ve tedavide kullanılan ekstrelerin yabancı birçok ülkede oluşturulmuş ekstreler olması günümüz koşullarında uygun olmayabileceği yorumundan yola çıkarak çalışmamızda daha önce ekstreleri elde edilmemiş olan bölgemizde geniş ölçüde bulunan Pinaceae ailesinden *Pinus brutia*, Plantaginaceae ailesinden *Plantago major*, Plantacaea ailesinden *Plantanus orientalis* bitkilerinin polen ekstrelerini hazırlanmıştır.

Yerli ekstrelerin yapılması ve kullanılması, bölgemizde yaşayan bireylerin sağlığı açısından önemli olmasının yanı sıra Türkiye ekonomisi yönünden de büyük bir önem teşkil etmektedir. Ülkemizde birçok alerjenik hastalığın teşhisi ile tedavisi sürecinde uygulanan polen ekstraktlarının yüksek bir miktarı yurt dışından getirilmektedir..

Lakin yerli polen ekstraktlarının üretimine ve kullanımına gereken yardım ve destek verilirse, yurt dışından almak zorunda kaldığımız polen ekstrelerini şahsi olarak oluşturabileceğimiz inancındayız böylelikle ülkemizin mevcut ekonomiye büyük bir katkı sağlayabiliriz. Yapılan çalışmalar sonucunda birçok tanısal testte ve birçok alerjenik hastanın alerjen immunoterapisi için yapılan ar-ge çalışmalarına ışık tutacak niteliktedir.

Alerjenik rahatsızlıkların tümünün teşhisi ve tedavisi için kullanılan ekstreler fazlaca spesifik özellik içermeyen proteinler barındırırlar. Bu sebeple alerjenik hastalıkların teşhisi ve tedavisi için polen temelli alerjenlerin varlığı yüksek ölçüde önem taşırlar. Coca solüsyonu yardımıyla yapılan ekstraktlar ise polenlerin içerisinde bulunan tüm proteinleri taşımaktadır.

Böylelikle hazırlamış olduğumuz ham ekstreler sonraki zamanlarda majör alerjenlerin izolasyonu ve tayini çalışmalarında tarafımızdan faydalanılmak üzere temel materyal olarak kullanılabilir. Ayrıca çalışmada kullanılan ışık mikroskopuyla incelenen farklı üç bitki türünün elde edilmiş olan morfolojik görüntüleri ve bulguları sistematik açıdan yardımcı olacak niteliktedir.



KAYNAKLAR

- [1] Behrendt, H., Kasche, A., von Eschenbach, E.C., Risse, U., Huss-Marp, J. and Ring, J. (2001). Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substances precedes allergen release from pollen grains in the initiation of allergic sensitization, *International archives of allergy and immunolog.* **124**, 121–125.
- [2] Alessandri, C., Zennaro, D., Zaffiro, A. and Mari, A. (2009). Molecular allergology approach to allergic diseases in the paediatric age, *Italian journal of pediatrics.* 35-29
- [3] Alcazar P, Carinanos P, De Castro C, Guerra F, Moreno C, Dominguez-Vilches E, et al. (2004). Airborne plane-tree (*Platanus hispanica*) pollen distribution in the city of Cordoba, Southwestern Spain, and possible implications on pollen allergy. *J Invest Allergol Clin Immunol.* **14**, 238-43.
- [4] Anşın R, Ozkan ZC. (2006). Tohumlu Bitkiler (Spermatophyta) – Odunsu taksonlar. Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi Genel Yayın No 167, Karadeniz Teknik Üniversitesi Basımevi.
- [5] Samuelsen, Berit. A. (2000). The traditional uses, chemical constituent and biological activities of *Plantago major* L. A review *Journal of Ethnopharmacology*, **71**, 1-21
- [6] Evren Cabi., Trakya bölgesindeki gramineae familyasına ait,bazı türlerin polen morfolojisinin incelenmesi ve polen ekstraktlarının hazırlanması evren cabi yüksek lisans tezi biyoloji anabilim dalı 2005 Edirne

- [7] Paşaoğlu, G., Çelik, G., (2002.) “Alerjenler”, T. Klin Alerji-Astım **4**, 24-35.
- Pazouki N, Sankian M, Nejadstari T, Khavari-Nejad RA, Varasteh AR.(2008).Oriental plane pollen allergy: Identification of allergens and cross-reactivity between relevant species. Allergy and Asthma Proceedings, **29**, 622-8.
- [8] Knox, R.B., Suphioglu, C., 1996, Environmental and molecular biology of pollen allergens, *Trends in Plant Science*, **15**, 156-164.
- [9] Aalberse, R.C. and Akkerdaas, J.H., van Ree, R. (2001). Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens, *Allergy*, **56**, 478–490.
- [10] Varela S, Subiza J, Subiza JL, Rodriguez R, Garcia B, Jerez M, etal.(1997). Platanus pollen as an important cause of pollinosis. J Allergy Clin Immunol, **100**, 748-54.
- [11] Sabban, S., Development of an in vitro model system for studying the interaction of Equus caballus IgE with its high-affinity Fc receptor, 2011, Thesis (PhD), The University of Sheffield.
- [12] Turner, H., Kinet, J.P., 1999, Signaling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilon RI, *Nature*, **25**, B24-30.
- [13] Williams, C.M., Galli, S.J., 2000, The diverse potential effector and immunoregulatory roles of mast cells in allergic disease, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **105**, 847-859.
- [14] Broide, D.H., 2001, Molecular and cellular mechanisms of allergic disease, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **108**(2 Suppl), 65-71.
- [15] Hakan Ertekin (2015). İzmir İlçesinde Allerjik Etkenliği Yüksek Polenlerin Atmosferdeki Dağılımlarının İzlenmesi Yüksek Lisans Tezi İzmir Ege Üniversitesi

- [16] Bush, R.K., (1989). Aerobiology of pollen and fungal allergens, *Journal of allergy and clinical immunology*, **6**, 1120-1124.
- [17] Anşin, R., Özkan, Z.C. (2006). Tohumlu Bitkiler (Spermatophytha) Odunsu Taksonlar, 450s, Trabzon
- [18] Molina RT, Rodriguez AM, Palacios IS, Lopez FG.(1996). Pollen production in anemophilous trees. Grana, **35**, 38-46.
- [19] Bıçakcı, A., Tosunoğlu, A., Saatçioğlu, G.(2015) Alerjenik *Platanus*(Çınar Ağacı) polenlerinin türkiyedeki ağılımları **13**,76-89
- [20] Dordal, M.T., Lluch-Bernal, M., Sánchez, M.C., Rondón, C., Navarro, A., Montoro, J., Matheu, V., Ibáñez, M.D., Fernández-Parra, B., Dávila, I., Conde, J., Antón, E., Colás, C., Valero, A., (2011). Allergen-specific nasal provocation testing: review by the rhinoconjunctivitis committee of the Spanish Society of Allergy and Clinical Immunology, *Journal of investigational allergology and clinical immunology*, **1**, 1.
- [21] Kayacık H. Orman ve Park Ağaçlarının Özel Sistematığı, II.Cilt Angiospermae (Kapalı Tohumlular). İstanbul: İstanbulUniversitesi Yayın No 2766, 1984.
- [22] Lu S, Ren J, Hao X, Liu D, Zhang R, Wu M, et al.(2014) Characterization of protein expression of *Platanus* pollen following exposure to gaseous pollutants and vehicle exhaust particles. *Aerobiologia*, **30**, 281-91.
- [23] Ibarrola I, Carmen Arilla M, Martinez A, Asturias JA.(2004) Identification of a polygalacturonase as a major allergen (Pla a 2) from *Platanus acerifolia* pollen. *J Allergy Clin Immunol* **113**,1185-91
- [24] Walker J M. The Protein Protocols Handbook. Second edition. Humana Press. 2002 Warwick, S. I., Briggs, D. (1980). The genecology of lawn weeds. V. The

adaptive significance of different growth habit in lawn and roadside populations of *Plantago major* L. *New Phytologist*, **85**, 289-300.

[25] Sager, G. R., Harper, J. L. (1964). *Plantago major* L., *P. media* L. And *P. lanceolata* L. *The Journal of Ecology*, **52**, 189-221.

[26] Roca-Garcia, H. (1972). Weeds: a link with the past. *Arnoldia*, **30**, 23-24.

[27] Nielsen, H. (1969). Lægeplanter og trolddomsurter. In: Kehler, S. (Ed.). Politikens Forlag, København, pp.: 321-324.

[28] Fleurentin, J., Mazars, G., Pelt, j. M. (1983). Additional information on the cultural background of drugs and medicinal plants of Yemen. *Journal of Ethnopharmacology* **8**, 335-344.

[29] *Plantago major* Erhan Oktay. *plantago major'* un hiperkolesterolemik diyetle ateroskleroz oluşturulan tavşanların kalp dokularında oksidan/ antioksidan sistem üzerine etkisi ankara üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü tez no 374807 ,Ankara 2014

[30] Fang, R., Shuqing, X., Fang, W. (2001). Pollen survey and clinical research in Yunnan, China. *Aerobiologia*, **17**, 165–169.

[31] Watson HK, Constable DW. Allergenic significance of *Plantago* pollen. In: D'Amato G, Spiekma FThM, Bonini S (eds). Allergenic Pollen and Pollinosis in Europe. Blackwell Scientific Publications, **1991**, 132-34.

[32] Krilis S, Baldo BA, Basten A.(1985) Analysis of allergen-specific IgE responses in 341 allergic patients. Associations between allergens and between allergen groups and clinical diagnoses. *Aust NZ J Med*, **15**, 421-6.

[33] Bryant DH, Burns MW, Lazarus L. (1975). The correlation between skin tests, bronchial provocation tests and the serum level of IgE spesific for common allergens in patients with asthma. Clin Allergy 5, 145-57.

[34] Yaltırık F. Dendroloji Ders Kitabı I: Gymnospermae. İstanbul Üniversitesi Yayın No 3443, İstanbul 1993.

[35] Donner J. Türkiye bitkileri yayılış haritaları. Çolak AH (editör). Lazer Ofset Matbaa, 2007

[36] Bıçakçı, A., Tosunoğlu, A., Altunoğlu, M.K., Akkaya, A., Malyer, H., Sapan, N. (2011). Allerjenik Pinus (Çam ağacı) Polenlerinin Türkiye’de ki Dağılımları. *Astım Allerji İmmünoloji* **9**, 92-100.

[37] Belmonte J, Roure JM, March X. (1998). Aerobiology of Vigo, North-West Spain: atmospheric pollen spectrum and annual dynamics of the most important taxa, and their clinical importance for allergy. *Aerobiologia*. **14**, 155-63.

[38] Freeman GL.(1993). Pine pollen allergy in northern Arizona. *Ann Allergy* **70**, 491-4.

[39] Armentia A, Quintero A, Fernandez-Garcia A, Salvador J, Martin-Santos JM. (1990). Allergy to pine pollen and pinon nuts: a review of three cases. *Ann Allergy*. **64**, 49-53

[40] Conford CA, Fountain DW, Burr RG. (1990).IgE-binding proteins from pine (Pinus radiata D. Don) pollen: evidence for cross-reactivity with ryegrass (Lolium perenne). *Int Arch Allergy Appl Immunol*, **93**, 41-6.

[41] Dutkuner, Ğ., Süleyman Demirel Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği Bölümü, *Gymnospermae* Ders Notları, Isparta.

[42] Bıçakçı, A., İphar, S., Malyer, H., Sapan, N. 1995. Mudanya İlçesinin (Bursa) Polen Takvimi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 1–2–3, 17–21.

- [43] Bıçakçı, A., Akyalçın, H. 2000. Analysis of Airborne Pollen Fall in Balıkesir, Turkey, 1996–1997. *Ann Agric Environ Med*, **7**, 5–10.
- [44] Güvensen, A., Öztürk, M. (2003). Airborne Pollen Calendar of İzmir. *Ann Agric Environ Med*, **10**, 37–44.
- [45] Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., Casarini, M., 2000, Detection of allergens in plantain (*Plantago lanceolata*) pollen. *Allergy*, **55** **11**, 1059 – 62.
- [46] Ayvaz A, Baki A, Gedik Y. (2003). Doğu Karadeniz bölgesindeki çocuklarda allerji deri testi (skin prick test) sonuçları. *T Klin Allerji-Astım*. **5**,80-4.
- [47] D'Amato, G., Cecchi, L., Bonini, S., Nunes, C., Annesi- Maesano, I., Behrendt, H., Liccardi, G., Popov, T. and Van Cauwenberge, P., (2007). Allergenic pollen and pollen allergy in Europe, *Allergy*, **9**, 976–990 Armentia A, Quintero A, Fernandez-Garcia A, Salvador J, Martin-Santos JM. (1990). Allergy to pine pollen and pinon nuts: a review of three cases. *Ann Allergy*. **64**, 49-53.