



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL'DAKİ AKDENİZ SERVİSİ (*Cupressus sempervirens* L.) ve SABİN ARDICI (*Juniperus sabina* L.)  
POLENLERİNİN ALERJENİK PROTEİNLERİ

Şahin TAŞ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof.Dr. Nazlı ARDA

II. Danışman

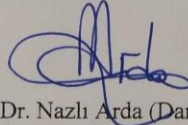
Doç.Dr. Aşlı GELİNCİK

Şubat, 2015

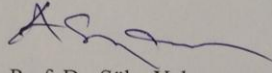
İSTANBUL

Bu çalışma 06/02/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Tez Jürisi:**

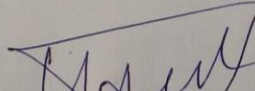
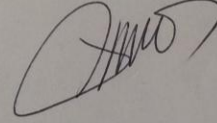


Prof. Dr. Nazlı Arda (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



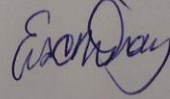
Prof. Dr. Süha Yalçın  
Marmara Üniversitesi  
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Suna Büyüköztürk  
İstanbul Üniversitesi  
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Ünal Akkemik  
İstanbul Üniversitesi  
Orman Fakültesi

Doç Dr. Evren Önay Uçar  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi



Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 36242 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle bana yardımcı olan, bilimsel çalışmalarımı gerçekleştirmem için her türlü imkanı sunan, her zaman manevi desteğini yanımda hissettiğim sevgili hocam Prof.Dr. Nazlı ARDA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez sonuçlarımın klinik olarak değerlendirilmesinde bilgi ve önerileriyle bana yardımcı olan Prof.Dr. Suna BÜYÜKÖZTÜRK, II. Danışmanım Doç.Dr. Aslı GELİNCİK, İ.Ü. Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmünoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı'ndaki emeği geçen tüm çalışanlara ve polen örneklerinin toplanmasında katkıları olan İ.Ü. Orman Fakültesi, Orman Botaniği Anabilim Dalı'ndaki hocalarım Prof.Dr. Ünal AKKEMİK ve Yard.Doç.Dr. Nurgül KARLIOĞLU'na teşekkür ederim. Deneysel çalışmalarım sırasında bana her zaman yardımcı olan sevgili hocam Doç.Dr. Evren ÖNAY UÇAR'a teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans dönemimde hem bilimsel hem de manevi olarak üzerimde çok fazla emeği olduğunu düşündüğüm, bana güvenen ve bunu her zaman hissettiren, göstermiş oldukları samimiyet ve arkadaşlıkları için, daima yanımda olacaklarına inandığım çok değerli hocam Araş. Gör. Dr. Murat PEKMEZ ve değerli ekip arkadaşım Demirhan ÇETEREİSİ'ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak aileme, ekip arkadaşım Araş. Gör. Elif MERTOĞLU'na, Araş. Gör. Dr. Kaniye ŞAHİN, Araş. Gör. Semih EKİMLER'e ve çok değerli arkadaşlarım Ebru KANIMDAN, Süleyman ÇAPUTLU, Sinan MERİÇ, Funda KAYA, Neşe AKÇAY, Burcu KARAHALİL, Deniz GÜRLE ve Nazaret POYRAZ'a manevi desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Şubat, 2015

Şahin TAŞ

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ .....	v
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....	vi
ÖZET.....	vii
SUMMARY .....	ix
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR .....</b>	<b>5</b>
2.1. ALERJİ.....	5
2.2. ALERJİ MEKANİZMASI.....	6
2.3. POLEN ALERJİSİ.....	7
2.3.1. Alerji Etkeni Olarak Polenler.....	8
2.3.2. Alerjeniteden Sorumlu Polen Bileşenleri.....	10
2.4. POLEN ALERJİSİNİN KLİNİK TANISI.....	13
2.4.1. Deri Prik Testi (“Skin Prick Test”, SPT) .....	15
2.4.2. Nazal Provokasyon Testi (“Nasal Provocation Test”, NPT) .....	15
2.5. POLEN ALERJİSİNİ ETKİLEYEN ÇEVRESEL FAKTÖRLER .....	15
2.5.1. Havadaki Polen Sayısı .....	15
2.5.2. Hava Kirliliğinin Polenler ve Alerji Gelişimine Etkileri .....	17
2.5.3. İklim Değişikliğinin Polenler ve Alerji Gelişimine Etkileri .....	18
2.6. CUPRESSACEAE FAMILYASI VE ALERJİ .....	19
2.6.1. Cupressaceae Türlerinin Alerjenik Proteinleri.....	22
2.6.2. <i>Cupressus</i> Cinsinin Coğrafi Dağılımı ve Alerjenik Bileşenleri.....	24
2.6.3. <i>Juniperus</i> Cinsinin Coğrafi Dağılımı ve Alerjenik Bileşenleri.....	27
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>29</b>
3.1. POLEN ÖRNEKLERİ.....	29
3.1.1. Polen Örneklerinin Toplanması .....	29

3.2. POLEN EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI.....	29
3.3. KLİNİK TESTLER .....	30
3.3.1. Deri Prik Testinin Uygulanması .....	30
3.3.2. Nazal Provokasyon Testinin Uygulanması.....	31
3.4. PROTEİN ANALİZLERİ.....	31
3.4.1. Polen Ekstresindeki Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	31
3.4.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	32
3.4.3. Boyama Yöntemlerinin Uygulanması.....	34
3.4.3.1. <i>Coomassie Boyama</i> .....	34
3.4.3.2. <i>Gümüş Boyama</i> .....	35
3.5. ELEKTROTRANSFER VE WESTERN İŞARETLEME (“BLOTTING”) .....	36
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>39</b>
4.1. POLEN EKSTRELERİ VE PROTEİN KONSANTRASYONU.....	39
4.2. KLİNİK TESTLER .....	40
4.3. POLEN EKSTRELERİNİN SODYUM DODESİL SÜLFAT POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ VE BANT PROFİLLERİ .....	40
4.4. ELEKTROTRANSFER VE WESTERN İŞARETLEME SONUÇLARI.....	42
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>45</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>50</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>66</b>
Ek 1. Etik kurul onay belgesi. ....	66
Ek 2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu.....	67
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>69</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

Şekil 2.1: Polenin temel kısımları .....	8
Şekil 2.5: Akdeniz servisi ( <i>Cupressus sempervirens</i> L.) a) Genel görünümü, b) Polen görüntüsü . .....	26
Şekil 2.6: Sabin ardıcı ( <i>Juniperus sabina</i> ) a) Genel görünümü b) Polen görüntüsü. ....	27
Şekil 4.1: Protein konsantrasyonunu belirlemede kullanılan standart grafik. ....	39
Şekil 4.2: Coomassie boyama yöntemi ile boyanmış örnek jel görüntüleri a) Akdeniz servisi polen proteinlerine ait bant profilleri; b) Sabin ardıcı polen proteinlerine ait bant profilleri (M: Marker, 1: boyama işleminden sonra jeldeki bantlar; 2: Image Lab programı ile belirlenen bantlar). ....	41
Şekil 4.3: Gümüş boyama yöntemi ile boyanmış örnek jel görüntüleri a) Akdeniz servisi polen proteinlerine ait bant profilleri; b) Sabin ardıcı polen proteinlerine ait bant profilleri (M: Marker;1: boyama işleminden sonra jeldeki bantlar; 2: Image Lab programı ile belirlenen bantlar). ....	42
Şekil 4.4: Akdeniz servisi polen ekstresinin Western işaretleme sonuçları (M: Marker, K1-3: kontrol bireyleri),.....	43
Şekil 4.5: Sabin ardıcı polen ekstresinin Western işaretleme sonuçları (M: Marker, K1-3: kontrol bireyleri). ....	44

## TABLO LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 2.1:</b> Aşırı duyarlılık reaksiyonlarının sınıflandırılması ve aracı moleküller.....	6
<b>Tablo 2.3:</b> Cupressaceae türlerinin belirlenmiş alerjenleri.....	23
<b>Tablo 3.1:</b> SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler.....	33
<b>Tablo 3.2:</b> SDS-PAGE’de kullanılan jelin hazırlanması (1 jel için gerekli miktarlar) .....	34
<b>Tablo 3.3:</b> Coomassie boyama yönteminde kullanılan çözeltiler. ....	35
<b>Tablo 3.4:</b> Gümüş boyama yönteminde kullanılan çözeltiler. ....	36
<b>Tablo 3.5:</b> Elektrotransfer ve Western işaretleme yönteminde kullanılan tampon çözeltiler. ....	38



## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kisaltmalar	Açıklama
<b>1D-SDS-PAGE</b>	:Bir boyutlu sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (“1- Dimensional sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”)
<b>2D-PAGE</b>	:İki boyutlu jel elektroforezi (“2-Dimensional gel electrophoresis”)
<b>BCA</b>	: Bişikoninik asit
<b>BSA</b>	: Sığır serum albumin (“Bovine serum albumin”)
<b>CO</b>	: Karbon monoksit
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbon dioksit
<b>dak.</b>	: Dakika
<b>diğ.</b>	: Diğerleri
<b>HRP</b>	: Yabancurpu peroksidazı (“Horseradish peroxidase”)
<b>ICAM-1</b>	: İntersellüler adezyon molekülü-1
<b>IEF</b>	: İzoelektrik odaklama (“Isoelectric focusing”)
<b>IgM</b>	: İmmüoglobulin M
<b>IgA</b>	: İmmüoglobulin A
<b>IgE</b>	: İmmüoglobulin E
<b>IgG</b>	: İmmüoglobulin G
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>kDa</b>	: Kilodalton
<b>LT</b>	: Lökotrien
<b>MHC</b>	:Majör histokompatibilite kompleksi (“Major histocompatibility complex”)
<b>MS</b>	: Kütle spektrometrisi (“Mass spectrometry”)
<b>NPT</b>	: Nazal provokasyon testi (“Nasal provocation test”)
<b>NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub></b>	: Amonyum bikarbonat
<b>NADPH</b>	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (“Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate”)
<b>NO<sub>2</sub></b>	: Azot dioksit
<b>O<sub>3</sub></b>	: Ozon
<b>PVDF</b>	: Poliviniliden diflorür
<b>SPT</b>	: Deri prik testi (“Skin prick test”)
<b>SO<sub>2</sub></b>	: Kükürt dioksit
<b>VCAM-1</b>	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### İSTANBUL'DAKİ AKDENİZ SERVİSİ (*Cupressus sempervirens* L.) ve SABİN ARDICI (*Juniperus sabina* L.) POLENLERİNİN ALERJENİK PROTEİNLERİ

Şahin TAŞ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Nazlı ARDA

II. Danışman : Doç. Dr. Aslı GELİNCİK

Rüzgar aracılığıyla yayılış gösteren polenler önemli aeroalerjenlerdir. Atmosfere yeterli miktarlarda salındıklarında alerjik olarak duyarlı kişilerde astım, rinit, konjunktivit vb. hastalıkların gelişimine yol açabilirler. Polenlerin yayılışı, havadaki miktarları, yapıları coğrafi bölge ve iklimden etkilenmektedir. Bu nedenle farklı bölgelerde yaşayan duyarlı kişilerin maruz kaldığı polen miktarı değişebilmekte ve etkilenen bireylerde farklı alerjik reaksiyonlar gelişebilmektedir. Servigiller (*Cupressaceae*) ailesinde bulunan ağaçların polenleri potansiyel aeroalerjenlerdir. Bunlar arasında özellikle servi (*Cupressus*) ve ardıç (*Juniperus*) polenleri en önemli alerjen kaynağıdır.

Servi türleri bol miktarda polen üretmektedir. Üretilen polen miktarının fazla olması polen duyarlılığını artırmaktadır. Servigiller ailesindeki bazı türler Türkiye'de geniş ve doğal yayılış göstermektedir. Dolayısıyla bu türlerin bölgeye özgü alerjenik etkilerinin araştırılması önemli hale gelmektedir.

Bu tez çalışmasında İstanbul'da yayılış gösteren Servigiller (Cupressaceae) ailesinden Akdeniz servisi (*Cupressus sempervirens* L.) ve Sabin ardıcı (*Juniperus sabina* L.) polenlerinin alerjenik proteinleri araştırıldı.

Polenler tozlaşma dönemlerinde toplanarak polen ekstraları hazırlandı. Hazırlanan polen ekstraları belirli oranlarda dilüe edilerek alerjik rinit hastalarına ve herhangi bir alerjik reaksiyon gözlenmemiş olan sağlıklı bireylere (kontrol grubu) deri prik ve nazal provokasyon testleri ile uygulandı.

Polen ekstraları saf suda çözündürüldükten sonra proteinler sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile molekül ağırlıklarına göre ayrılarak Western blotting tekniği ile analiz edildi. Proteinler poliviniliden diflorür (PVDF) membran yüzeyine transfer edildikten sonra hasta serumları (primer antikor) ile muamele edilerek spesifik IgE antikorlarının alerjenik proteinlerle reaksiyona girmesi sağlandı. Membran daha sonra sekonder antikor (yaban turpu peroksidazı ile konjuge fare anti-insan IgE antikor) ile muamele edildi. Gözlenen bantlar alerjenik proteinler olarak kabul edildi ve diğer klinik verilerle birlikte değerlendirildi.

Akdeniz servisi polen ekstresi uygulanmış 18 hastanın 5'inde spesifik IgE antikorlarının ~20-68 kDa arasında molekül ağırlığına sahip toplam 8 polen proteinine bağlandığı, Sabin ardıcı polen ekstresi uygulanmış 17 hastanın 9'unda ise ~22-85 kDa arasında molekül ağırlıklarına sahip toplam 9 polen proteinine bağlandığı gözlemlendi. Kontrol bireyleriyle yapılan Western işaretleme çalışmalarında hiçbir bant gözlenmedi.

Şubat 2015, 79 Sayfa

**Anahtar kelimeler:** Polen alerjisi, alerjenik protein, Cupressaceae, *Cupressus sempervirens*, *Juniperus sabina*

## **SUMMARY**

**M.Sc. THESIS**

**ALLERGENIC PROTEINS OF MEDITERRANEAN CYPRESS (*Cupressus sempervirens L.*) and SABIN JUNIPER (*Juniperus sabina L.*) POLLENS IN ISTANBUL**

**Şahin TAŞ**

**Istanbul University**

**Institute of Graduate Studies in Science and Engineering**

**Department of Molecular Biology and Genetics**

**Supervisor : Prof.Dr. Nazlı ARDA**

**Co-Supervisor : Assoc.Prof. Dr. Aşlı GELİNCİK**

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, conjunctivitis 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 affected individuals. The pollens of cypress family (Cupressaceae) trees are potential aeroallergens. Among them especially the pollens of cypress (*Cupressus*) and junipers (*Juniperus*) are the most important allergen sources.

Cypress species produce high amount of pollens. The high amount of pollen production enhance the pollen sensitivity. Some species in cypress family are widely and naturally

distributed in Turkey. Thus the research on region-specific allergenic effects of these species becomes important.

In this thesis project the allergenic proteins of pollens from Mediterranean cypress (*Cupressus sempervirens* L.) and Sabin juniper (*Juniperus sabina* L.) in cypress family (Cupressaceae) deployed in Istanbul were investigated.

Pollens were collected in pollination period and their extracts were prepared. The pollen extracts were diluted in certain ratios and were subjected to patients with allergic rhinitis and to healthy individuals without any allergic reactions (control group) via skin prick and nasal provocation tests.

After dissolving the pollen extracts in pure water, proteins were separated by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) according to their molecular weights and analyzed by Western blotting technique. The proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane and treated with patient serums (primary antibody) for inducing the reaction between IgE antibodies and allergenic proteins. Subsequently the membrane was treated with secondary antibody (horseradish peroxidase conjugated mouse anti-human IgE antibody). The observed bands were considered as allergenic proteins and were evaluated with other clinical data.

Specific IgE antibodies in 5 out of 18 patients implemented with Mediterranean cypress pollen extract bound to total 8 pollen proteins between ~20-68 kDa, while those in 9 out of 17 patients implemented with Sabin juniper pollen extract to total 9 pollen proteins between ~22-85 kDa. No band was detected in Western blotting assay performed with control individuals.

February 2015, 79 Pages.

**Keywords:** Pollen allergy, allergenic protein, Cupressaceae, *Cupressus sempervirens*,  
*Juniperus sabina*

## 1. GİRİŞ

Alerjik hastalıklar modern toplumların önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır ve nüfusun yaklaşık %25'ini olumsuz etkilemektedir (Behrendt ve Becker, 2001; González-Buitrago ve diğ., 2007). Pek çok insanda aerobiyojik bozukluklar nedeniyle polenlere, sporlara, ev tozu akarlarına, böceklere ve farklı türde gıdalara karşı alerjik reaksiyonlar gelişmektedir (Celik ve diğ., 2005; Guvensen ve diğ., 2005).

Alerjik hastalıklara neden olan farklı alerjen kaynakları vardır. Alerjik duyarlılığın artmasına ve buna bağlı belirtilerin ortaya çıkmasına neden olan en önemli ve en yaygın aeroalerjenler polenlerdir (Behrendt ve Becker, 2001). Polenler çeşitli yollarla atmosfere dağılarak solunum yoluyla vücuda girerler ve insanlarda alerjik astım ve alerjik rinit gibi hastalıklara neden olurlar (Spieskma, 1991; Ventura ve diğ., 2007). Konjunktivit, alerjik rinit, egzema ve astım gibi IgE aracılı tip 1 alerjik hastalıklar, dünya çapında yaygınlık göstermektedir (Longhi ve diğ., 2009). Bu alerjik hastalıklar içerisinde en yüksek görülme sıklığına sahip olan alerjik rinit (saman nezlesi) populasyonun %10-20'sini ve alerjik astım %5-10'unu etkilemektedir (Durham and Church, 2001).

Çiçekli bitkiler, çimenler ve yabani ot polenleri yaydıkları fazla miktardaki polenler nedeniyle ana polen kaynakları olarak kabul edilirler (Tarkan ve diğ., 2009). Bitkilerin yıl içerisindeki tozlaşma dönemleri (en fazla polen yaydığı dönem) türlere göre farklılık göstermektedir (Fuertes-Rodriguez ve diğ., 2007; Perez-Badia ve diğ., 2010).

Polenlerin yapıları, havadaki miktarları, histokimyasal özellikleri ve alerjeniteleri buldukları coğrafi bölgeye, iklime ve çevre koşullarına göre önemli farklılıklar göstermektedir (D'Amato ve diğ., 2007).

Polen alerjenlerine karşı alerjik reaksiyon gösteren bireylerin sayısı özellikle büyük şehirlerde ve sanayileşmenin yoğun olduğu bölgelerde artış göstermektedir (Platts-Mills, 2005). Hava kirliliği ve iklim değişikliği gibi faktörler de polenlerin alerjenitesine etki etmektedir. Azot dioksit (NO<sub>2</sub>), kükürt dioksit (SO<sub>2</sub>) ve ozon (O<sub>3</sub>) gibi önemli hava

kirleticileri, bitkilerin büyümesini, metabolizmasını ve polen üretimini etkiler (Chichiricco ve diğ., 2009). Hava kirleticileri polen taneleri ile etkileşim kurabilir ve polenlerin protein içeriğinde değişikliklere neden olabilir. Bu hava kirleticileri alerjiye yatkın kişilerde solunum yolu geçirgenliğini artırarak polen alerjenlerinin mukoza tabakasına daha kolay nüfuz etmesine ve immün sistem hücreleriyle daha kolay etkileşime girmesine sebep olur (D'Amato ve diğ., 2001).

Polen alerjisinden sorumlu moleküller genelde 5-150 kDa molekül ağırlığındaki proteinler veya glikoproteinlerdir (Alessandri ve diğ., 2009). Bu proteinlerin tanımlanması alerjik hastalıkların moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ve tedavi süreçlerinin geliştirilmesi açısından çok önemlidir. Alerjenik proteinlerin tanımlanmasında; bir ve iki boyutlu jel elektroforezi, Western işaretleme ("blotting"), kütle spektrometrisi yöntemleri ve protein mikroçip yöntemi gibi proteomik yaklaşımlar kullanılmaktadır (Gonzalez-Buitrago ve diğ., 2007).

Bugüne kadar yapılan proteomik çalışmalarda ekspansinler, profilinler, kalsiyum-bağlayıcı proteinler, Ole e 1-benzeri proteinler, pektat liyaz, ribonükleaz, Bet v 1-benzeri proteinler, glikozil hidrolaz, FAD-bağlayıcı domen, taumatin-benzeri peoteinler, prolamin ve Amb V gibi çeşitli alerjen protein aileleri belirlenmiştir (Radauer ve Breiteneder, 2006). Ağaç polenleri incelendiğinde, Kuzey Avrupa ve Amerika'da huş ağacı en yaygın alerjen grubunu oluşturmaktadır. Yunanistan, İsrail, İspanya, İtalya ve Türkiye gibi Akdeniz ülkelerinde ise servi ve zeytin ağacı polenleri alerjik hastalıkların en önemli nedenidir (D'Amato ve diğ., 2007). Bu ağaçlarda Bet v 1, 2, 4, Ole a 1, 2, 7, 9, Cup a 1, 2 (Di Felice ve diğ., 1994; 2001), Cup a 3 (Cortegano ve diğ., 2004), Cup a 4 (Pico de Coana ve diğ., 2010), Cup s 1 (Arilla ve diğ., 2004), Cup s 3 (Togawa ve diğ., 2006), Jun a 1, 3 (Midoro-Horuiti ve diğ., 1999; 2000), Cry j 1 (Yasueda ve diğ., 1983; Taniai ve diğ., 1988), Cry j 2 (Sakaguchi ve diğ., 1990), Cha o 1, 2 (Kawamoto ve diğ., 2002) gibi alerjenik proteinler çeşitli proteomik teknikler kullanılarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada incelenen Akdeniz servisi ve Sabin ardıcı türlerinin de içerisinde yer aldığı kozalaklı bitkilerin (Coniferales) polenleri, dünyanın çeşitli bölgelerinde polen alerjisinin en önemli nedenleridir (Ramirez, 1984; Midoro-Horiuti, 1992). Kozalaklı bitkiler takımında yer alan Servigiller (Cupressaceae) ailesindeki türler özellikle

Akdeniz ülkeleri, Japonya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde alerjik rinit (saman nezlesi)'in önemli bir nedenidir (Charpin ve diğ., 2005; Scala ve diğ., 2010). İspanya, İsrail, İtalya, Yunanistan ve Türkiye gibi Akdeniz ülkelerinde *Cupressus* ve *Juniperus* türleri çok yaygındır ve fazla miktarda polen üretmektedir (D'Amato ve diğ., 2007).

Servigiller ailesinde yer alan Akdeniz servisi (*Cupressus sempervirens* L.) ve Sabin ardıcı (*Juniperus sabina* L.) türlerinin tozlaşma dönemleri; duyarlı kişilerde alerjik astım, alerjik rinit, konjunktivit gibi solunumsal alerji belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olan en önemli etkenler olarak bildirilmektedir (Panzani ve diğ., 1991; Charpin, 2000; D'Amato ve diğ., 2007; Kamijo ve diğ., 2009). Akdeniz servisi polenlerinin alerjenitesi ve alerjen proteinleri çalışılmış ve 43-45 kDa molekül ağırlığına sahip Cup s 1 (Arilla ve diğ., 2004) ve 34 kDa molekül ağırlığına sahip Cup s 3 (Togawa ve diğ., 2006) alerjen proteinleri belirlenmiştir. Sabin ardıcı polenlerinin alerjenitesi hakkında bilimsel çalışmalar oldukça az olup (Lorenzoni-Chiesura ve diğ., 2000), alerjenik proteinlerinin tanımlanmasına ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında; İstanbul'daki park ve bahçelerde yaygın olarak bulunan Akdeniz servisi (*Cupressus sempervirens* L.) ve Sabin ardıcı (*Juniperus sabina* L.) polenlerinin alerjenitesi klinik olarak araştırılmış ve alerjenik proteinleri Western işaretleme yöntemi kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır.

İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi, Orman Botaniği Anabilim Dalında görev yapan araştırmacılar tarafından İ.Ü. Orman Fakültesi bahçesinden tozlaşma dönemlerinde toplanan Akdeniz servisi ve Sabin ardıcı polen örneklerinden klinik testlerde ve protein analizlerinde kullanılmak üzere protein ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Hazırlanmış olan polen ekstraktları belirli oranlarda dilüe edilerek İstanbul Üniversitesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmunoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı'ndaki uzman hekimler tarafından alerjik rinit tanısı konmuş hastalara ve sağlıklı bireylere, deri prik ve nazal provokasyon testleri ile uygulanmıştır. Bu testlerle bireylerin uygulanan polen ekstraktlarına karşı alerjik olup olmadığı tespit edilmiştir. Hasta ve sağlıklı bireylerden alınan serumlar, Western işaretleme deneylerinde kullanılmak üzere saklanmıştır.



Polen ekstralarının protein konsantrasyonları bişınkoninik asit (BCA) yöntemi ile belirlenmiş ve proteinler sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak moleköl ağırlıklarına göre ayrıştırmıştır. Ayrıştırmış proteinler, Western işaretlemenin ilk aşamasında “semi-dry blotting” yöntemi kullanılarak membrana aktarılmıştır. Ardından primer antikor (hasta ve kontrol grubu serumları) ve sekonder antikor (yaban turpu peroksidazı ile konjuge fare anti-insan IgE antikor) ile muamele edilmiş ve IgE bağlayan bantlar alerjenik protein olarak değeriendirilmiştir. Klinik çalışmalarla Akdeniz servisi ve Sabin ardıcı polenlerinin alerjenitesi belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar Western işaretleme verileriyle birlikte moleköler açıdan değeriendirilmiştir. Deri prik test sonuçlarına göre Akdeniz servisi poleni uygulanmış 18 hastadan 3’ünde, Sabin ardıcı poleni uygulanmış 17 hastadan 4’ünde pozitif yanıt gözlenmiştir. Nazal provokasyon testinde Akdeniz servisi polenine karşı 4 hastada pozitif sonuç alınmış, 4 hastada hiperreaktivite gözlenmiştir. Sabin ardıcı polenine karşı 4 hastada pozitif sonuç alınmış, 5 hastada hiperreaktivite gözlenmiştir. Kontrol grubu bireylerinde her iki polen ekstresine karşı klinik olarak alerji bulgusuna rastlanmamıştır. Western işaretleme sonuçlarına göre Akdeniz servisi polen ekstresi uygulanmış 18 hastanın 5’inde spesifik IgE antikorlarının ~20-68 kDa arasında moleköl ağırlığına sahip toplam 8 polen proteinine bağlandığı gözlenmiştir. Sabin ardıcı polen ekstresi uygulanmış 17 hastanın 9’unda spesifik IgE antikorlarının ~22-85 kDa arasında moleköl ağırlıklarına sahip toplam 9 polen proteinine bağlandığı gözlenmiştir. Kontrol bireyleriyle yapılan Western işaretleme çalışmalarında hiçbir bant gözlenmemiştir. Mevcut literatür bilgileri de göz önüne alınarak, Akdeniz servisindeki ~20.8, 27.4, 36.6, 39.7, 54.7, 57.6, 62.6 ve 68.55 kDa’luk, Sabin ardıcındaki ~22.2, 27.8, 49.6, 53.7, 61.1, 63.8, 67.7, 71.7 ve 85 kDa’luk proteinlerin potansiyel alerjenler olabileceği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte ileri proteomik yöntemlerle potansiyel alerjenik proteinlerin tanımlanması ve bu proteinlerin alerjenik protein veritabanlarına yüklenerek bu konuda çalışan araştırmacılara bir kaynak oluşturulması gerekmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçların, alerji tanısında kullanılan alerji panellerinin genişletilmesi ve böylece daha geniş spektrumda alerji taraması yapılmasına olanak sağlayacak çalışmalara öncülük etmesi beklenmektedir.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. ALERJİ

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. Alerjik rinit (saman nezlesi), alerjik astım, alerjik dermatit, alerjik konjunktivit, besin alerjisi gibi çeşitli şekillerde ortaya çıkabilen alerjik hastalıklara yol açtığı bilinen en önemli alerjen kaynakları arasında polenler, ev tozu akarları (mayt), hayvan tüyleri, böcekler, bakteriler, mantarlar, küfler, çeşitli yiyecekler, bazı ilaçlar ve kimyasallar sayılabilir (Celik ve diğ., 2005; Tarkan ve diğ., 2009).

Aşırı duyarlılık 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 2.1’de gösterilmiştir. Çoğu hastada, alerjik bir reaksiyon için tipik sorumlu antikor IgE izotipindedir ve bu reaksiyon IgE-aracılı alerji olarak adlandırılır. Bazı bireylerin yaygın alerjenlere karşı IgE üretme yeteneği yüksektir. Bu genetik yatkınlığa atopi, böyle bireylere de atopik denir (Ring ve diğ., 2006). Diğer immünoglobulin sınıfları ve/veya hücreler tarafından uyarılan tüm aşırı duyarlılık reaksiyonları ise IgE-aracılı olmayan alerjiler olarak kabul edilir.

**Tablo 2.1:** Aşırı duyarlılık reaksiyonlarının sınıflandırılması ve aracı moleküller (Gell ve Coombs, 1963).

Reaksiyon	Aracı Antikor
Tip I acil duyarlılık reaksiyonu	IgE
Tip II sitotoksik antikor	IgG ve IgM
Tip III immün kompleks	IgG (IgM)
Tip IV geç tip aşırı duyarlılık reaksiyonu	-

Dünya nüfusunun %40'ında çevredeki yabancı proteinlere (IgE antikorları üretimine sebep olan) karşı duyarlılaşma (sensitizasyon) mevcuttur. Alerji ve atopiyle ilişkili hastalıklar insan popülasyonunun yaklaşık %20'sini, sanayileşmiş ülkelerde ise nüfusun yaklaşık %40'ını olumsuz etkilemektedir (ISAAC). Günümüzde okul çağındaki çocuklarda bir veya daha fazla alerjene duyarlılaşma oranı %40-50'ye yaklaşmaktadır. 2012 yılında, 7.8 milyon çocukta (dünya çocuk nüfusunun ~%10.6'sı) solunum alerjisi vakası bildirilmiştir (National Health Interview Survey, 2012).

Alerjik tepkimeler her yaş grubunda ve birçok farklı organda ortaya çıkabilmekte, hasta ve ailelerinin ruhsal sağlığı ve sosyal yaşamını olumsuz etkileyebilmektedir. Alerjik hastaların tedavileri ve hastalara daha etkili tıbbi bakım sağlanması için gelişmiş tanı yöntemlerine gereksinim duyulmaktadır (Johansson ve diğ., 2001).

## 2.2. ALERJİ MEKANİZMASI

Solunumla alınan alerjenler vücuda girdikten sonra nazal mukozada birikir. Burada antijen sunan hücrelere işlenerek MHC sınıf 2 hücreleri ("Major histocompatibility complex", Majör histokompatibilite kompleksi), alerjenlerin, lenf nodlarında bulunan CD4+ yardımcı T hücrelerinin T hücre reseptörleri tarafından tanınmasını sağlar. Alerjenle uyarılmış olan T hücreleri T<sub>H</sub>2 hücrelerine dönüşerek interlökinler (IL-3, IL-4, IL-5, IL-13) ve diğer sitokinlerin salgılanmasını sağlar. Sitokinlerin salgılanması kaskad mekanizmasını uyararak alerjene spesifik IgE üretimine, eozinofilik infiltrasyona, mast

hücre proliferasyonuna ve hava yolu inflamasyonuna neden olur (Dykewicz ve Hamilos, 2010).

Erken faz reaksiyonlarında, duyarlılaşmış bireyler alerjen ile karşılaştığında mast hücre yüzeyindeki IgE reseptörleriyle etkileşime girmesi sonucunda histamin, triptaz, lökotrien (LTC<sub>4</sub>), LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>, prostaglandin D<sub>2</sub> salınır. Salınan bu maddeler damarlardan plazmanın sızmasına, arteriovenöz anastomozların dilatasyonuna, glandüler ve goblet hücrelerinden mukus sekresyonunun artmasına neden olur. Histamin kaşıntı, rinore ve hapşırıklara, lökotrienler ve prostaglandin D<sub>2</sub> nazal konjesyona neden olmaktadır (Heppt ve diğ., 2004).

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 (T<sub>H</sub>2) lenfositler ve makrofajların infiltrasyonunu artırmaktadır. Bu hücreler aktif hale geçerek daha fazla mediatörün salınmasına ve proinflamatuvar reaksiyonların artmasına neden olmaktadır (Wallace ve diğ., 2008).

### **2.3. POLEN ALERJİSİ**

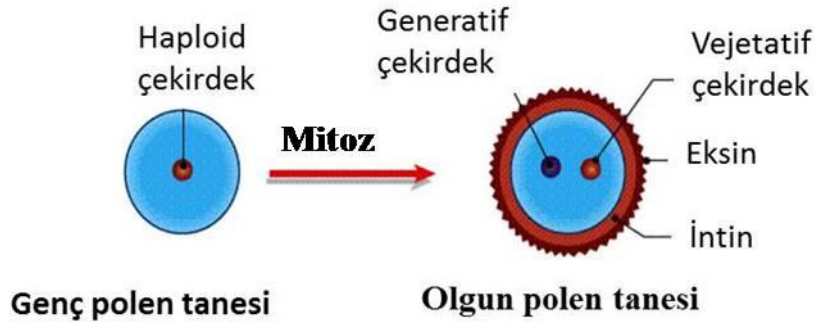
Rüzgarla tozlaşan tohumlu bitkilerin polenleri dünya genelinde tip I alerjinin ortaya çıkmasına neden olan önemli etkenlerden birini oluşturmaktadır (Boral ve diğ., 2004; Kaneko ve diğ., 2005). Çok sayıda çim, ağaç ve yabancı ot türleri polen yayma dönemlerinde atmosfere yüksek konsantrasyonlarda polen salarak, duyarlı kişilerde alerjik rinit, mevsimsel rinokonjunktivit ve bronşial astım gibi alerjik hastalıklara neden olmaktadır (Radauer ve Breiteneder, 2006). Sanayileşmiş ülkelerdeki populasyonun yaklaşık %25'inin bu hastalıklardan etkilenmesi polen alerjisinin toplum üzerindeki etkisinin önemini göstermektedir. Bu hastalıklardan alerjik rinit (saman nezlesi) populasyonun %10-%20'sini etkilemesiyle en yüksek görülme sıklığına sahiptir. Bu oranı, %5-%10 ile alerjik astım izlerken besin alerjilerinin populasyon üzerindeki etkisinin oranı %1-3'tür (Durham ve Church, 2001). Polen alerjisi, tipik olarak

bitkilerin çiçeklenme döneminde bireyin polen hassasiyetinin olmasına bağlı mevsimsel bir hastalıktır. Ancak, aşırı duyarlı polen alerjik bireylerde alerjik rinit semptomları tüm yıl boyunca gözlenebilir (Weerd ve diğ., 2002).

Polen alerjenlerine karşı duyarlılık belirtileri gözler, burun ve duyarlı bireylerin boğaz mukoza yüzeyleri ile polen teması üzerine gelişir (Bush, 1989). Genellikle gözler, burun ve boğazda konjunktivit, burun tıkanıklığı, hapşırma ve tahriş gelişmesiyle sonuçlanır. Saman nezlesi sık sık tüm polen ya da büyük polen parçacıklarının inhalasyonu sonucu ortaya çıkar (Wilson ve diğ., 1973). Daha küçük polen parçacıkları ve alerjen taşıyan partiküller genellikle alt solunum yollarına ulaşarak hassas bireylerde nefes darlığı, mukoza inflamasyonu ve hipersekresyonu, kas hiperreaktivitesi ve anksiyete gibi astım belirtilerinin gelişmesini indükler (Stewart ve Holt, 1985).

### 2.3.1. Alerji Etkeni Olarak Polenler

Dış ortam allerjenlerinin en baskın kaynağı olan polen taneleri bitki yaşam döngüsünün bir parçasıdır. Doğada farklı şekillerde ve boyutlarda bulunan ve çiçekli bitkilerin erkek gametofitleri olan polenlerin biyolojik görevi dişi gametofiti dölemektir (Knox, 1979).



Şekil 2.1: Polenin temel kısımları (leavingbio.net)

Bir polen tanesi vejetatif ve jeneratif nükleuslar, endoplazmik retikulum ve mitokondri gibi çeşitli organelleri içeren sitoplazma ile intin (iç selüloz duvarı) ve eksinden (dış sporopolenin duvarı) oluşan tanecik duvarı içerir (Knox, 1984) (Şekil 2.1). İntin duvarı polen bileşenlerini içeren bir bariyer oluştururken, eksindeki açıklıklar germinasyona bağlı polen tüpünün oluşmasına ve hidrasyona bağlı su ve proteinlerin hareketine izin

verir (Singh ve diğ., 1991). Yağmur suyu ile temasa bağlı olarak, ozmotik şokun polen taneciklerini patlattığı ve bu tanecikleri atmosfere saldığı gösterilmiştir. Yağmuru takip eden 10 gün içinde bu taneciklerin atmosferdeki konsantrasyonunda 50 katlık bir artış belirlenmiştir (Suphioglu ve diğ., 1992).

Tozlaşma zamanlarında atmosferde yoğun bir şekilde bulunan ve farklı yollarla yayılış gösteren polenler önemli aeroalerjenlerdir (Charpin ve diğ., 2005; D'Amato ve diğ., 2007). Doğada en çok böcekler ve rüzgar aracılığıyla taşınırlar. Böcekler aracılığıyla tozlaşan bitkiler rüzgar aracılığı ile tozlaşan bitkilerden daha az sayıda polen üretirler. Bu nedenle polenlerinin dış yüzeyi girintili-çıkıntılıdır ve yapışkan bir özellik gösterir (Bicakci ve diğ., 2009).

Rüzgar aracılığıyla tozlaşan bitkiler çok sayıda polen üretirler ve polenlerin dış yüzeyleri genellikle düz ve çoğu zaman kurudur (Mazzitelli ve Grilli Caiola, 2003; Aboulaich ve diğ., 2008; Rokade ve diğ., 2010). Çapı küçük polenler, rüzgar aracılığıyla uzun mesafelere kadar yayılabilmektedir. Alerji gelişimi açısından önemli olan polenler rüzgar aracılığıyla taşınan ve yaklaşık 20-60 µm çapındaki polenlerdir. Küçük çaplı polenler alt solunum yollarında, büyük çaplı olanlar ise üst solunum yollarında etkili olmaktadır (Bicakci ve diğ., 2009).

Çiçekli bitkiler dışında, çimenler ve yabancı otlar da önemli polen kaynaklarını oluşturmaktadır. Bu polenlerin dağılımlarında coğrafi bölge ve iklime göre farklılıklar gözlenebilir. Ağaç polenleri geç kış, erken ilkbahar dönemlerinde; çimen polenleri yaz aylarının başında; yabancı ot polenleri yaz sonu ve sonbahar aylarında atmosferde yoğun olarak bulunmaktadır (Tarkan ve diğ., 2009).

Ağaçlar ortalama anter, çiçek sıklığı ve yüksek polen üretimi nedeniyle ana polen üreticileri arasında yer almaktadır (Molina ve diğ., 1996). Ağaç polenleri incelendiğinde, Kuzey Avrupa ve Amerika'da huş ağacı en yaygın alerjen grubunu oluşturmaktadır. Huş ağacının çiçeklenme dönemi Nisan ayı ortasında başlamaktadır. Servi ve zeytin ağacı polenleri ise Yunanistan, İsrail, İspanya, İtalya ve Türkiye gibi Akdeniz ülkelerinde alerjik hastalıkların en önemli nedenidir (D'Amato ve diğ., 2007). Bu ağaçların dışında akçaağaç, bulunduğu coğrafi bölgeye göre fındık, gürgen, meşe,

kayın ve kestane ağacı polenleri de başlıca alerjenik semptomlara neden olmaktadır (D'Amato ve diğ., 2007).

Ağaç polenlerinin alerjenik molekül içerikleri ve alerjenik etkileri genetik yapılarına, yetiştikleri bölgelere, iklime, toprak yapısına, ısı, nem ve hava kirliliği gibi faktörlere bağlı olarak büyük farklılıklar gösterebilmektedir. Bu bakımdan, çeşitli coğrafi bölgelerin polen yapı ve özelliklerini inceleyen çalışmalar o bölgede yaşayan populasyonun duyarlaşma özelliklerinin belirlenmesine katkı sağlayabilir (D'Amato ve diğ., 1998; Radauer ve Breiteneder, 2006).

### 2.3.2. Alerjiteden Sorumlu Polen Bileşenleri

Polen alerjisi bazı polen proteinlerinin immün sistemle etkileşimi sonucunda ortaya çıkar. İmmün sistem ile etkileşim göstermeyen polen proteinleri zararsızdır. Başka bir deyişle, immün sistemdeki IgE antikorları ile etkileşime geçmeyen protein alerjen olarak değerlendirilmemektedir. Polen içerisindeki alerjenler polen tanelerinden salınarak ve çözünürleştirilerek sunulmaktadır. Bazı çalışmalar polen hidrasyonunun alerjenik proteinlerin hızla ortama salınımına yol açtığını göstermiştir (Knox and Heslop-Harrison, 1970; Vrtala ve diğ., 1993).

*Betula verrucosa* (huş ağacı) ve *Phleum pratense* (çayırotu) polenlerindeki çoğu alerjenik proteinler 10 dakikalık hidrasyon sonucunda salınırken, en alerjenik proteinlerin salınımı için sadece 30 saniye yeterli olmaktadır (Vrtala ve diğ., 1993). Bu çalışmalar polen tanelerinden salınan alerjenik proteinlerin hızını ve insan vücudu ile temasa geçişindeki kolaylığı ortaya koymuştur. Alerjenik olmayan proteinler ise ancak sert kimyasal veya mekanik ekstraksiyon metodları uygulandığında salınabilmektedir (Vrtala ve diğ., 1993).

Alerjenler immünolojik reaktivite düzeylerine göre adlandırılır ve sınıflandırılır (King ve diğ., 1994). Bir protein türevlendiği türe duyarlı bireylerin en az % 50'sinde alerjik reaksiyona neden olduğunda, ana alerjen olarak tanımlanır. Bu nedenle, minör alerjenler hassas bireylerin % 50'sinden azında alerjiye neden olanlardır. Alerjenik proteinlerin adları izole edildiği türlerin adından türetilmiştir. Örneğin, bir çim türü olan *Lolium perenne*'den (karaçayır) türevlenen alerjenler 'Lol p' olarak adlandırılırken *Betula verrucosa* (huş ağacı) ağacından türevlenenler 'Bet v' alerjenleri olarak

adlandırılmaktadır. Ayrıca, bu proteinler benzer yapısal özelliklerine ve benzer kaynaklardan diğer alerjenlerle çapraz immünolojik reaksiyon verme durumlarına göre de sınıflandırılırlar. Örneğin, karaçayır grup 1 polen alerjenleri ‘Lol p 1’ olarak adlandırılır ve diğer çim türlerindeki grup 1 polen alerjenleri ile amino asit homolojisi ve çapraz reaktivite benzerliği gösterirler. Buna benzer olarak, huş ağacının grup 1 polen alerjenleri ‘Bet v 1’ olarak ve aynı familyadaki diğer ağaç türlerinin grup 1 alerjenleri ile amino asit homolojisi ve çapraz reaktivite benzerliği gösterirler. Bazı alerjenler dışında, yapısal özellikler ve immünolojik çapraz reaktivite genel olarak taksonomik olarak ilişkili olan türler arasında sınırlıdır. Örneğin, çim polenleri ile ağaç polenlerinin grup 1 alerjenleri çapraz reaktif değildir.

Polenler çok sayıda alerjenik protein içermektedir (D’Amato ve diğ., 2007). Ancak küçük bir kısmı insan immün sistemi ile etkileşerek hassas bireylerde alerjik duyarlılığın gelişmesine ve alerjik semptomların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Weerd ve diğ., 2002). Alerjenik proteinlerin polen içindeki yerleşimi, polen hidrasyonuna bağlı çözünme hızı ve bileşenlerin insan immün sistemi tarafından tanınması bu etkileşimin düzeyini belirleyen en önemli faktörlerdir (Knox ve Heslop-Harrison, 1970; Singh ve diğ., 1991; Arnon ve van Regenmortel, 1992; Vrtala ve diğ., 1993).

Son 20 yıl içerisinde polen türevli alerjik proteinlerin moleküler karakterizasyonunda büyük gelişmeler kaydedilmiştir. Farklı bitki türlerinde çeşitli protein ailelerine ait polen alerjenleri tanımlanmıştır (Di Felice ve diğ., 2001; Gadermaier ve diğ., 2004; Mothes ve diğ., 2004).

Polen alerjenleri hakkındaki bilgilerin büyük bir kısmı Allergome isimli alerjen veri tabanında ([www.allergome.org](http://www.allergome.org)) veya İmmünoloji Dernekleri Allergen Uluslararası Birliği Alerjenler Resmi İsimlendirme Alt-Komitesi ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)) gibi alerjen veritabanlarında bulunan listelerde yer almaktadır (Radauer ve Breiteneder, 2006).

Allergome veritabanında alerjik reaksiyonlara neden olan polen içeren literatürde tanımlı 178 bitki türü listelenmiştir ([www.allergome.org](http://www.allergome.org)). Alerjik polen türlerinin yaklaşık ¼’nü çimen poleni (Poaceae, 43 tür) oluşturmaktadır. Çok sayıda alerjenik polen içeren diğer aileler, Cupressaceae (servi ailesi, 16 tür), Betulaceae (huş ailesi, 12



tür), *Arecaceae* (avuç içi ailesi, 8 tür), *Asteraceae* (yakupotu ailesi, 8 tür) ve *Fabaceae* (baklagiller, 7 tür)'dir. Bu bitkilerin 29 takım ve 44 taksonomik aileyi temsil ettiği gösterilmiştir. Bu bitkiler arasında en fazla alerjen içeren aileler: *Poaceae* (15 türde 71 alerjen), *Cupressaceae* (8 türde 20 alerjen), *Asteraceae* (5 türde 13 alerjen), *Betulaceae* (5 türde 13 alerjen) ve *Oleaceae* (4 türde 12 alerjen)'dir. Ekspansinler, profilinler ve kalsiyum-bağlayıcı proteinler ana alerjen protein ailelerini oluşturmaktadır. Ole e 1-benzeri proteinler, pektat liyaz, ribonükleaz, Bet v 1-benzeri proteinler, glikozil hidrolaz, FAD-bağlayıcı domen, taumatin-benzeri proteinler, Prolamin ve Amb V de diğer protein ailelerini oluşturmaktadır. Polen alerjen ailelerindeki proteinlerin bir kısmı çoğu türde bulunmasına rağmen, bazıları tek bir taksonla sınırlı kalmıştır (Radauer ve Breiteneder, 2006).

Polen tanelerinde alerjen proteinlere ek olarak polen kökenli bileşikler immunomodülatör etki gösterebilirler. Fare modellerinde, *Ambrosia* (saman nezlesine neden olan bir ot) polenlerine ait olan NADPH oksidazların epitel dokudaki reaktif oksijen türlerinin düzeyini artırdıkları ve alerjiye karşı duyarlılıkta ve alerjinin gelişmesinde önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (Boldogh ve diğ., 2005; Bacsi ve diğ., 2005). Yakın bir zamanda; alerjik polen tanelerine ait NADPH oksidaz aktivitesinin bitki türlerine bağlı olarak yoğunluk ve yerleşim açısından farklılıklar gösterdiği saptanmış ve bu aktivitenin en çok çözünmeyen fraksiyonlarda yoğunlaştığı görülmüştür (Wang ve diğ., 2009). Polen tanelerinde enflamatuvar lipit aracılara benzer bileşikler taşınmaktadır (Behrendt ve diğ., 2001; Gunawan ve diğ., 2008a). Huş ağacı ve çimen polenlerinin ekstrelerinden elde edilen lipit fraksiyonlarının eozinofil ve nötrofillerin aktivasyonunu ve kemotaksisini teşvik ettikleri gösterilmiştir (Traidl-Hoffman ve diğ., 2002; Plotz ve diğ., 2004). Huş ağacı, fındık, leylak, akçaağaç, miskotu polen ekstraktları ve huş ağacı polenlerine ait fitoprostanlar lipopolisakkarit tarafından teşvik edilen IL-12 üretimini inhibe ederken huş ağacı polen ekstresi ile fitoprostanlar dendritik hücrelerdeki göç etme ve Th2 çekimleme kapasitelerini artırmaktadır (Traidl-Hoffman ve diğ., 2005; Mariani ve diğ., 2007). Tozlaşma mevsiminde alerji hastalarından alınan kan örneklerindeki CD-1 kısıtlı T hücrelerinin ve IgE'nin selvi polenlerine ait fosfolipitler ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (Agea ve diğ., 2005). Servigiller ailesi (*Cupressaceae*), huş ağacı, *Ambrosia* ve çimen polen tanelerindeki proteazların, ev tozu akarlarına ait proteazlar ve başka diğer protein

alerjenleri gibi alerjik hastalıklar ile ilişkili olabileceği ortaya konulmuştur (Gunawan ve diğ., 2008a, 2008b). Çimen, huş ağacı, Ambrosia ve zambak polen ekstraktları sıkı bağlantıları yok etmektedir ve bunlardan çimen ekstresi bunu proteaz aracılığıyla gerçekleştirmektedir (Runswick ve diğ., 2007; Kato ve diğ., 2009; Seto ve diğ., 2009). Fakat alerjenik polenlere karşı oluşturulan doğal bağışıklık cevabının bitki türleri arasında nasıl değişkenlik gösterdiği halen açıklanamamıştır (Kamijo ve diğ., 2009).

#### 2.4. POLEN ALERJİSİNİN KLİNİK TANISI

Birçok hastalık, alerji ve atopide gözlenenlere benzer belirtiler ortaya koymaktadır. Bu yüzden alerji için kesin bir tanı koymak oldukça güçtür. Kesin tanı ayrıntılı klinik geçmişi, deri testlerine ve antijene özgü IgE kullanan *in vitro* testlerin uygulanmasına bağlıdır (Asturias ve diğ., 2006).

İmmünolojik testler klinik öneme sahip alerjenlerin *in vitro* olarak belirlenmesinde kullanılan yüksek duyarlılıklı yöntemlerdir. Bu yöntemlerde hastanın serumundaki alerjene özgü antikorları ölçmek için, alerjenler ve IgE'ye özgü saptama reaktifleri kullanılır (www.wipo.int). Alerjenik proteinlerin belirlenmesi, izolasyonu ve tanımlanması alerjik hastalıkların tanı ve tedavisi için büyük önem taşımaktadır. Ayrıca biyolojik fonksiyon, protein yapısı ve alerjenik aktivite arasındaki ilişkinin aydınlatılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir (Aalberse ve diğ., 2001).

Aerobiyolojik ve klinik çalışmalarda solunum alerjisinden sorumlu 20'den fazla polen türü tespit edilmiştir (Singh ve Kumar, 2003). Bugüne kadar tanımlanan polen alerjenlerin büyük çoğunluğu 5-150 kDa arasında değişen bir moleküler ağırlığa ve 4 ile 9 arasında bir izoelektrik noktasına sahip olan proteinler veya glikoproteinlerdir (Alessandri ve diğ., 2009). Alerjenlerin bazıları kalsiyum iyonlarını bağlarken, bazıları aktin bağlama yeteneğine sahiptir. Birçoğunun immün sistem indüklemeye dışında, zararlı bir etkisi yoktur. Ayrıca bağışıklık sistemi ile etkileşimden sorumlu ortak bir yapı (epitop) barındırmaktadırlar. Alerjen belirleyicileri ya da epitoplar, IgE tarafından tanınan yapıları temsil eder. Bir alerjik molekül birincil yapısı boyunca belirli bir amino asit dizisini oluşturan lineer epitoplara ve protein katlanması tarafından oluşturulan yapısal epitoplara sahip olabilir. Molekül katlanmaları immünolojik sensitizasyonun indüksiyonu ve antikorların üretimi için gereklidir. Ancak birçok alerjik protein, yüksek

sıcaklık veya sindirim etkisiyle yapısal epitoplarını kaybedebilir; böylece molekül açılabilir ve lineer epitoplar ortaya çıkar (Alessandri ve diğ., 2009).

İnsanlarda alerjik etkilere neden olan polenlerin büyük kısmının biyolojik ve histokimyasal yapıları belirlenmiş, alerjenik protein molekülleri tanımlanarak adlandırılmış ve gruplandırılmıştır. Polenlerden hazırlanan ve alerjen içerikleri bilinen ekstraler, alerjik duyarlılığı saptamak amacıyla hastalara deri testleri ve nazal provokasyon testleriyle uygulanmaktadır. Ayrıca, polenlerin taksonomik olarak ilişkili türleri arasında çapraz reaksiyonlar oldukça yaygın olarak görülmektedir. Örneğin; servi ailesine dahil olan türler arasında yüksek çapraz reaktivite *in vivo* ve *in vitro* testlerle gösterilmiştir (Charpin ve diğ., 2005). Bu tip etkileşimlere birbirleriyle ilişkisiz familyalar arasında da rastlamak mümkündür. Polenler, meyveler, sebzeler, kabuklu yemişler ve tohumlarda çapraz reaksiyon veren IgE epitopları tanımlanmıştır. Proteinlerin yapısal özellikleri çapraz reaktivitenin belirleyicileridir. Genel olarak, çapraz reaktivite olabilmesi için % 70'den fazla bir dizi benzerliği gereklidir. % 50'den az dizi benzerliğine sahip olan proteinler, çok nadir çapraz reaktivite göstermektedir (Aalberse, 2000).

Polen alerjenlerine ait mevcut sistematik, taksonomik ve moleküler sınıflandırma Radauer ve Breiteneder (2006) tarafından yapılmıştır. Saf doğal veya rekombinant allerjenler tanı testlerinde yeni kullanılmaya başlanmıştır (Hamilton ve Adkinson, 2004) ve gelecekte de muhtemelen alerjene spesifik immünoterapi için kullanılacaktır (Wheeler ve Woroniecki, 2004). Tanısal testler ve tedavi yaklaşımlarının etkinliği genellikle farklı polen türleri arasında ve bunun yanı sıra polen ile bitkisel kaynaklı gıdalar arasındaki alerjik çapraz reaktivite dikkate alınarak değerlendirilmelidir (Radauer ve Breiteneder, 2006).

Teşhis ve tedavi için kullanılan alerjen ekstraleleri, protein ve diğer bileşenlerin karışımlarını içeren multialerjenik sistemlerdir. Bu ekstraleleri standardize etmek için çeşitli sağlık örgütlerinin [örneğin, IUIS (“International Union of Immunological Societies”, Uluslararası Alerji Sınıflandırması Altkomitesi) / WHO (“World Health Organization”, Dünya Sağlık Örgütü)] protokolleri tavsiye edilmiştir. Ekstreler ağırlık/hacim (w/v) formülüne göre deri testi ile standardize edilmesine rağmen özgün bileşenlerin gerçek kalite / miktarını ifade etmemektedir. Saflaştırılmış çapraz reaktif

proteinler alerjenlerin sayısını azaltmakta ve polen ekstrelerinin saflaştırılması ile ilgili sorunların giderilmesine katkı sağlayabilmektedir (Weber, 2003).

#### **2.4.1. Deri Prik Testi (“Skin Prick Test”, SPT)**

Alerjik hastalığı olduğundan şüphelenilen bir hastanın başlangıç değerlendirmesinin en önemli kısmını hastaya ait ayrıntılı klinik öykünün araştırılması ve hastalıkla ilişkili tedavi aşaması oluşturmaktadır. Bir alerjene maruz kalınmasının ardından ortaya çıkan alerjik semptomların sebepleri belli olsa da bu duruma çok sayıda alerjenin neden olabileceği öngörülmektedir. Bu karışıklığı ortadan kaldırmak için deri prik testi (SPT) gibi *in vivo* testler, laboratuvar temelli *in vitro* testler ve bağışıklanma testleri (“challenge test”) uygulanmalıdır (Williams ve diğ., 2008).

Deri prik testi alerji tanısını desteklemede kullanılan kolay ve ucuz bir yöntemdir. Çoğu alerjen için yüksek duyarlılığa, hastalara uygulandığında hızlı sonuç alınmasına olanak vermektedir. Sonuçlar kabarıklık çapı (mm) olarak ifade edilir ve 10 mg/mL standart histamin konsantrasyonu (genellikle 3-5 mm) ile karşılaştırılarak değerlendirilir (Williams ve diğ., 2008).

#### **2.4.2. Nazal Provokasyon Testi (“Nasal Provocation Test”, NPT)**

Klinik tanının kesinliğini artırmak için kullanılan bir diğer yöntem ise nazal provokasyon testidir. Bu test uygulanan alerjenlere karşı nazal mukozada oluşacak yanıtın anlaşılmasını sağlamaktadır. Oluşan yanıt; kaşınma, aksırma, burun akıntısı (rinore), nazal mukozada ödem oluşumu ve hava akımına karşı oluşan direnç ile tanımlanmaktadır. Bu yöntem alerjik rinit hastalığında, hastanın klinik geçmişi ve deri prik test sonuçlarının değerlendirilmesinde oluşabilecek karışıklıkların giderilmesinde yardımcı bir tanı yöntemi olarak geniş çapta kullanılmaktadır (Dordal ve diğ., 2011).

### **2.5. POLEN ALERJİSİNİ ETKİLEYEN ÇEVRESEL FAKTÖRLER**

#### **2.5.1. Havadaki Polen Sayısı**

Polen ilişkili alerji belirtileri ile havadaki polen sayısı arasında ilişki bulunmaktadır (Samolinski ve diğ., 1996). Amerikan Astım Alerjisi Akademisi ve Worcester Ulusal

Polen ve Aerobioloji Araştırma Birimi'ne göre, ağaç polenlerinin duyarlı kişiler için günlük 1m<sup>3</sup> havadaki eşik sayıları Tablo 2.2'de verilmiştir ([www.aaaai.org/nab](http://www.aaaai.org/nab)).

**Tablo 2.2:** Amerikan Astım Alerjisi Akademisi ve Worcester Ulusal Polen ve Aerobioloji Araştırma Birimi'ne göre ağaç polenlerinin günlük 1m<sup>3</sup> havadaki eşik sayıları ve etkileri (<http://aaaai.org/nab>).

<b>1 m<sup>3</sup> havadaki sayı</b>	<b>Yoğunluk</b>	<b>Etki</b>
1-14	Az	Sadece duyarlılığı çok yüksek olan kişilerde alerjik belirtilere neden olur.
15-89	Orta	Alerjik hastaların büyük bir kısmında belirtilere neden olur.
90-1499	Yüksek	Duyarlılık derecesi ne olursa olsun çoğu hastada belirtilere neden olur.
> 1500	Çok Yüksek	Tüm hastalarda belirtilere neden olur.

Havadaki polen konsantrasyonunun bilinmesi bireylerin maruz kalacağı alerjen dozunun belirlenmesine ve alerjik hastalıkların tedavisine katkı sağlayabilir. Bu nedenle atmosferdeki polenler uzun yıllar boyunca dünyanın çeşitli yerlerinde ölçülmüştür. Belirli ülkeler için, ulusal veya bölgesel bir dizi polen takvimleri yayınlanmıştır (Nilsson ve diğ., 1977; Stix, 1981; D'Amato, 1984; Driessen ve diğ., 1988).

Türkiye 7 farklı coğrafi bölgede, farklı iklim yapısına ve bitki örtüsüne sahiptir. Bu nedenle atmosferdeki polen türleri, yoğunluğu ve çeşitliliği bölgelere göre farklılık göstermektedir. Farklı bölgelerde yaşayan insanların yılın hangi döneminde hangi tür polenlere maruz kalacağını belirlemek, polenlerden korunmada ilk basamak olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle ülkemizde de polen takvimi oluşturmak için çalışmalar yapılmış ve yapılmaktadır (Bicakci ve diğ., 2009).

1966 yılından bu yana Türkiye'nin çeşitli illerinde atmosferik polen araştırmaları yapılmaktadır (Aytuğ ve diğ., 1974; Bicakci ve Akyalcin, 2000; Bicakci, 2006; Celenk ve diğ., 2008). İstanbul'daki alerjik polen dağılımı üzerine ilk çalışma Aytuğ ve diğ. (1974) tarafından gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, İstanbul'un atmosferinde ana polen üreticileri Cupressaceae/Taxaceae, Platanus sp., Gramineae, Fraxinus sp., Quercus sp. ve Pinus sp. olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda her

bir taksona ait havadaki polen örnekleri belirgin mevsimsellik göstermesine rağmen, Cupressaceae/Taxaceae polen tanelerinin hem Asya hem de Avrupa yakasında yıl boyunca havada bulunduğu tespit edilmiştir. Polen sayısının Nisan ayında maksimum düzeye ulaştığı gözlenmiştir. Bu polenler yakalanan toplam polenlerin Anadolu yakasında %36.52'sini ve Avrupa yakasında %34.42'den fazlasını oluşturmaktadır (Aytuğ ve diğ., 1974).

Yapılan aeropalnolojik çalışmalar sonucunda elde edilen veriler değerlendirildiğinde Türkiye'de en fazla polen üreten bitkilerin, Cupressaceae (servi, ardıç), Pinus (çam ağacı) ve Gramineae (çimen); en fazla polen miktarının görüldüğü ayların ise Mart-Haziran ayları olduğu bildirilmiştir (Bicakci ve diğ., 2009).

İstanbul'un polen takvimi ise Öneş ve diğ. (2008) tarafından yayınlanmıştır. Genel olarak İstanbul'un bitki örtüsü iki kısımda incelenmektedir. Birinci kısımda doğal bitki örtüsü olarak ormanlar ve makiler yer almaktadır. Bu kısımda kentin kuzeyinde kurak ormanlar bulunurken, güneyini nemli ormanlar kaplamaktadır. İstanbul Boğazı'nın Asya yakasında Alemdağ Ormanı ve Avrupa yakasında ise Belgrad Ormanı bulunmaktadır. Bitki örtüsünün ikinci kısmını ise parklar, bahçeler, kreşler, botanik bahçeleri, küçük ormanlar (baltalık) ve şehir sokakları gibi alanlarda dikilmiş ağaçlar ve çalılar oluşturmaktadır (Davis, 1988; Yaltırık ve diğ., 1997).

### **2.5.2. Hava Kirliliğinin Polenler ve Alerji Gelişimine Etkileri**

Çeşitli çalışmalar hava kirliliğinin solunum sistemi üzerine olumsuz etkilerini ortaya koymuştur (Gielen ve diğ., 1997; Koenig, 1999). Alerjik rinit ve bronşiyal astım gibi alerjik solunum yolu hastalıklarının son yıllarda sanayileşmiş ülkelerde artmasının nedenleri hala tartışma konusudur (Burney, 1993). Solunum yolu alerjisi ile hava kirliliği arasında bir ilişki olduğuna dair bulgular olmasına rağmen, bağlantı ve etkileşim tam olarak ortaya konulamamıştır. Hava kirliliğinin solunum yolu alerjisini tetiklediği ve frekansını artırdığı kabul edilebilir olsa da , bunu kesin olarak kanıtlamak kolay değildir (D'Amato ve diğ., 2001).

Kirliliğin yoğun olduğu alanlarda artış gösteren polen kaynaklı alerjilerden ve astımdan hava kirliliğinin sorumlu olabileceğine dair bazı bulgular bulunmaktadır (Ruffin ve diğ., 1983; Behrendt ve diğ., 1997; Emberlin, 1998; Behrendt ve Becker, 2001).

Hava kirliliğinin olduğu bölgelerde bazı polenlerin yapısı, kimyasal bileşimi ve alerjenitesinin değiştiği rapor edilmiştir (Ghanati ve Majd., 1995; Majd ve Kiabi, 1997). Laboratuvar çalışmaları azot dioksit (NO<sub>2</sub>), kükürt dioksit (SO<sub>2</sub>) ve karbon monoksit (CO) uygulamalarının polenlerin çözünür protein içeriğinde değişikliklere neden olabileceğini göstermiştir. Bazı çalışmalarda da havada bulunan kirleticilerin proteinlerin parçalanmasına, kirleticilere maruz kalmış olan polenlerde yeni proteinlerin oluşmasına neden olabileceği gösterilmiştir (Ruffin ve diğ., 1983; Chakraborty ve diğ., 1996).

Polenler havadaki kirleticilerle etkileşime girebilir ve havadaki alerjenlerin alerjenitesini değiştirerek duyarlılığın artmasına neden olabilir (Behrendt ve diğ., 1992; Devalia ve diğ., 1998; D'Amato ve diğ.,1998; D'Amato ve diğ. 2002). Hava kirliliği bileşenleri bitki alerjen içeriğini etkileyebilir. Bitki büyümesini etkileyerek üretilen polen miktarını ve polendeki alerjenik protein miktarını artırabilir. Yapılan bir çalışma hava kirliliğine maruz kalan polen tanelerinde alerjenik protein anlatımında artış olduğunu ortaya koymuştur (Emberlin, 1998). Diğer bir çalışmada hava kirliliğine maruz kalan huş ağaçlarının polenlerinin, diğer huş ağaçlarının polenlerine göre daha fazla alerjen içerdiği gösterilmiştir (Hjelmeroo ve diğ., 1994).

Solunum alerjisini uyaran hava kirliliği ajanlarıyla polen taneleri arasındaki ilişkinin değişik yönleri vardır : a) Hava kirliliğine yol açan bileşenler polen taneleri ile etkileşim kurabilir ve modifiye alerjenlerin (antijenlerin) açığa çıkmasına neden olabilir; b) Hava kirliliğine yol açan bileşenler bazı bitkilerden elde edilen ve alerjen taşıyan mikro parçacıklar ile etkileşim kurabilir ve hassaslaşmış kişilerde astım gelişimini uyarabilir c) Hava kirliliğine yol açan bileşenler (özellikle de ozon ve kükürt dioksit içeren partiküller), alerjiye yatkın kişilerde hava yolu geçirgenliğini artırabilir, polen alerjenlerinin mukoza tabakasına daha kolay nüfuz etmesini ve immün sisteminin hücreleriyle daha kolay etkileşime girmesini sağlayabilir (D'Amato ve diğ., 2001).

### **2.5.3. İklim Değişikliğinin Polenler ve Alerji Gelişimine Etkileri**

Dünya ikliminin değiştiğine dair birçok kanıt bulunmaktadır. Ortalama küresel sıcaklık son 100 yılda 0.7°C'den fazla artmıştır (Solomon ve diğ., 2007). Küresel ısınmanın yanı sıra, Kuzey Avrupa ve Akdeniz de dahil bazı bölgelerde aşırı yağış olaylarının yaşanacağı tahmin edilmektedir. Önümüzdeki yıllar içinde ısı dalgaları, ağır yağış ve

gök gürültüsü gibi büyük hava olaylarında artış olacağı tahmin edilmektedir. Bu değişiklikler, insan kaynaklı faaliyetlerin önemli rol oynadığı atmosferik karbon dioksit (CO<sub>2</sub>) ve sera gazlarındaki artışların bir sonucu olarak görülmektedir (Cecchi ve diğ., 2010).

İklim değişikliği aeroalerjenler özellikle de polenler ve küfler üzerine etkili olmaktadır (Hollins ve diğ., 2004; Beggs ve Bambrick, 2005). Aeroalerjenlerin emisyonunu, dağılımını ve/veya taşınmasını etkilemektedir. Bu bağlamda, iklim değişikliğinin polen ve spor üretimini etkilediğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Küresel ısınma nedeniyle Avrupa'da bulunan huş ağacı polen mevsimi zamanlamasında bir değişiklik tespit edilmiştir. Ancak sezonun geç ya da erken olmasında bölgesel farklılıklar da bulunmaktadır (Fitter ve Fitter, 2002). İspanya'da, iklim değişikliği nedeniyle 100 yıl içinde, meşe ağaçlarının tozlaşma dönemlerinin bir ay önce olacağı tahmin edilmektedir (Garcia-Moza ve diğ., 2006). Ancak bazı türlerde polen mevsiminin süresi uzayabilir. Bitkiler değişen iklim koşulları altında yüksek miktarda polen üretmektedir (Wayne ve diğ., 2002; Ziska ve diğ., 2003). Artan sıcaklıklarda veya kirlenmiş alanlarda büyümüş olan ağaçların polenlerinde güçlü alerjenite gözlenmektedir (Ahlholm ve diğ., 1998; D'Amato, 2000). Sonuç olarak iklim değişikliği alerjik hastalıkların artışında rol oynamaktadır (Beggs ve Bambrick, 2005; Williams, 2005).

## **2.6. CUPRESSACEAE FAMILYASI VE ALERJİ**

Altı cinsten (Cupressus, Juniperus, Kamesayperis, Callitris, Thuja ve Libocedrus) oluşan Cupressaceae familyası üyeleri Akdeniz ülkeleri, Japonya ve Amerika Birleşik Devletleri'nin Güneybatı eyaletlerinde alerjinin çok önemli bir nedenidir (Cortegano ve diğ., 2004; Charpin ve diğ., 2005; Pico de Coana, 2010). Türkiye'de özellikle Cupressus (servi) ve Juniperus (ardıç) cinslerine dahil olan türleri doğal yayılış alanına sahiptir (Yaltırık, 1993). Servi türleri Akdeniz bölgesinde kültür ve süs bitkisi olarak bahçecilikte kullanılmaktadır (Fiorina ve diğ., 2002; Sin ve diğ., 2008). Bu yoğun kullanım polenlerin yayılmasına büyük katkıda bulunmuştur, önemli bir biyolojik kirlenici haline gelmiştir (Mistrello ve diğ., 2002; Charpin ve diğ., 2007). Bu nedenle özellikle son birkaç yılda Akdeniz ülkelerinde, servi polenlerine maruz kalma oranı giderek artmakta; genel popülasyonda % 0.6-9.8 arasında olan bu oran alerjik hastalarda



% 9-35'e çıkmaktadır (Cortegano ve diğ., 2004; Charpin ve diğ., 2005; Pico de Coana ve diğ., 2010).

Cupressaceae polen alerjisi familyaya dahil çeşitli türler tarafından dünya genelinde ortaya çıkan bir polinozis (saman nezlesi)'dir (Demoly ve diğ., 2002; Cortegano ve diğ., 2004). Bu polinozisin yaygınlığı (prevelansı) son 10-15 yıl içerisinde sürekli olarak artış göstermektedir (Charpin ve diğ., 2005).

Özellikle servi türlerinin kış polinozisindeki rolü açıkça ortaya konulmuştur (Demoly ve diğ., 2002, Cortegano ve diğ., 2004). Akdeniz Havzası'nı çevreleyen birçok şehirde Akdeniz servisi (*Cupressus sempervirens* L.) polinozisinin yaygınlığının artması, bu mevsimsel patolojide rol alan bazı ana alerjenlerin belirlenmesini gerektirmektedir (Shahali ve diğ., 2012).

Farklı bilim adamlarının yaptığı çalışmalarda Cupressaceae familyası önemli bir alerjen kaynağı olarak gösterilmektedir (Caiaffa ve diğ., 1988; Cimignoli ve diğ., 1992; D'Amato ve Liccardi, 1994; Nardi ve diğ., 1996; Alisi ve diğ., 2001; Sin ve diğ., 2008; Caimmi ve diğ., 2012; Shahali ve diğ., 2012). Cupressaceae polenlerine maruz kalma sonucunda ortaya çıkan rinokonjunktivitli ilk vakalar 1945 yılında Güney Afrika'da ve 1962 yılında Fransa'da rapor edilmiştir (Ordman, 1945; Panzani, 1962). 1970'lerin sonundan itibaren, Cupressaceae polenlerinin havadaki konsantrasyonları Akdeniz'in çeşitli bölgelerinde artış göstermiştir (Charpin ve diğ., 2005).

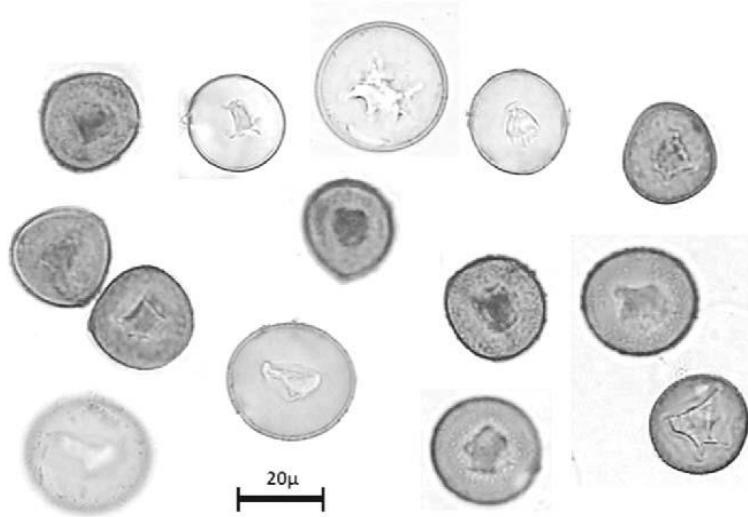
Cupressaceae familyasına dahil türlerin polen alerjisi ile ilgili ilk çalışmalar 1927 yılında *Juniperus sabinoïdes* polenleri ile Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılmıştır. Avrupa'da 1962 yılında *Cupressus sempervirens* polenlerinin neden olduğu dört vaka bildirilmiştir (Panzani ve diğ., 1991).

Türkiye'de astım/alerjik rinitli çocuk veya erişkin hastalarda Servigiller (Cupressaceae) ailesinin polenlerine karşı duyarlılığın tespit edildiği birkaç çalışma mevcuttur. Bu çalışmalardan Akdeniz bölgesinin doğusundaki farklı şehirlerden solunum yolu alerjisi olan 614 hasta üzerinde yapılan çalışmalarda deri prik testi sonucunda hastaların %21.2'sinin servi (*Cupressus*) polenlerine duyarlı olduğu belirlenmiştir (Guneser ve diğ., 1996). Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne başvuran 455 hastaya uygulanan deri prik testi

sonucu hastaların %12.5'inin sadece servi polenlerine, %14.1'inin servi ve ardıç polenlerine duyarlı olduğu belirlenmiştir (Sin ve diğ., 2008).

Servigiller (Cupressaceae) ailesinin üyeleri kozalaklı bitkilerdir ve çok fazla miktarda polen üretirler. Polenlerin yayılışı rüzgar aracılığı ile gerçekleşir (Hidalgo ve diğ., 1999). Cupressaceae polenleri birbirlerine benzerlik göstermektedir. Bu durum polenlerin cins ve tür düzeyinde belirlenmesini güçleştirmektedir. Bu familyanın polenleri Taxaceae familyasının polenleriyle de çok büyük benzerlik göstermektedir. Bu nedenle aeropalinolojik çalışmalarda her iki familya birlikte araştırılmaktadır (Bıçakcı ve diğ., 2000, 2009). Cupressaceae familyasının kendi türlerinin polenleri (Cupressus, Cryptomeria ve Juniperus) ve Cupressaceae-Taxaceae familyalarının polenleri yüksek çapraz reaktivite göstermektedir ve polenlerin aynı polinizasyon dönemlerinde yayılması alerjenik etkilere neden olmaktadır (Barletta ve diğ., 1996).

Cupressaceae-Taxaceae polenleri ortalama 20-30 µm çapında, apertürsüz, seferoidal, dairesel, pseudoapertürlü ve yüzeyi granüllüdür (Yaltırık, 1993) (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2:** Cupressaceae/ Taxaceae familyası polenleri (Bıçakcı ve diğ., 2010).

Cupressaceae familyasının tozlaşma dönemleri kışın, genellikle Ocak ve Mart aylarıdır. Ancak Ekim-Aralık ve Nisan aylarında da havada yüksek miktarda polen konsantrasyonu ölçmek mümkündür (Diaz de la Guardia ve diğ., 2006; Perez-Badia ve diğ., 2010). Bu ağaçların özellikle park ve bahçelerde süs bitkisi olarak kullanılması

nedeniyle bu alanlarda atmosfere salınan polen miktarı çimen polenlerine oranla daha fazladır (Paris-Kohler ve diğ., 2000; Sin ve diğ., 2008).

Dünya genelinde son 30 yılda özellikle kış aylarında Cupressaceae polen alerjisi önemli oranda artış göstermiştir (Paris-Kohler ve diğ., 2000; Diaz de la Guardia ve diğ., 2006; Caimmi ve diğ., 2012). Bu artışın nedenleri, farklı amaçlarla servi ağaçlarının yoğun dikimi ve bu nedenle daha fazla insanın bu polenlere maruz kalması (Hrabina ve diğ., 2003; Diaz de la Guardia ve diğ., 2006; Caimmi ve diğ., 2012) ve kışın artan hava kirliliğinin alerjeniteyi artırmasıdır (Diaz de la Guardia ve diğ., 2006).

Servi ağaçlarının erken dölllenme döneminde saçtığı polenlerin yol açtığı alerjik belirtiler, soğuk algınlığı veya grip gibi mevsimsel hastalıklar ile benzerlik gösterdiğinden servi polen alerjisinin gerçek etkisi gözardı edilebilir (Fiorina ve diğ., 2002). Servi polen alerjisi uzun yıllar boyunca az rastlanan bir hastalık olarak kabul edilmiştir. Kışın karşılaşılan solunum yolu enfeksiyonları ile benzer belirtiler göstermesi ve allerjen ekstrelerinin etkinliğinin düşük olması nedeniyle yaygınlığı hafife alınmıştır (Charpin ve diğ., 2007).

### **2.6.1. Cupressaceae Türlerinin Alerjenik Proteinleri**

Cupressaceae türlerine ait polen ekstreleri 1-D ve/veya 2-D elektroforez sonrası Western blot yöntemiyle analiz edilmiş ve alerjik hastaların IgE'leri tarafından tanınan ana allerjenler belirlenmiştir (Tablo 2.3).

Cupressaceae polenlerinde, dört ana alerjenik protein ailesinden çeşitli üyeler tanımlanmıştır. Birinci grup pektat liyaz ailesi, ikinci grup poligalakturonaz ailesi, üçüncü grup taumatin-benzeri proteinler, dördüncü grup kalsiyum bağlayıcı proteinlerden oluşur (Shahali ve diğ., 2012).

**Tablo 2.2:** Cupressaceae türlerinin belirlenmiş alerjenleri.

Alerjen adı	Tür	Biyolojik fonksiyon	Referans
Cry j 1	<i>Cryptomeria japonica</i>	Pektat liyaz	Yasueda ve diğ. (1983); Taniai ve diğ. (1988)
Cry j 2	<i>Cryptomeria japonica</i>	Poligalakturonaz	Sakaguchi ve diğ. (1990)
Cha o 1	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	Pektat liyaz	Kawamoto ve diğ. (2002)
Cha o 2	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	Poligalakturonaz	Kawamoto ve diğ. (2002)
Jun a 1	<i>Juniperus ashei</i>	Pektat liyaz	Midoro-Horiuti ve diğ. (1999)
Jun a 3	<i>Juniperus ashei</i>	Patojen-benzeri protein (PR-5)	Midoro-Horiuti ve diğ. (1999)
Cup a 1	<i>Cupressus arizonica</i>	Pektat liyaz	Di Felice ve diğ. (1994)
Cup a 2	<i>Cupressus arizonica</i>	Poligalakturonaz	Di Felice ve diğ. (2001)
Cup a 3	<i>Cupressus arizonica</i>	Taumatın-benzeri protein	Cortegano ve diğ. (2004)
Cup a 4	<i>Cupressus arizonica</i>	Ca-bağlayıcı protein	Pico de Coana ve diğ. (2010)
Cup s 1	<i>Cupressus sempervirens</i>	Pektat liyaz	Arilla ve diğ. (2004)
Cup s 3	<i>Cupressus sempervirens</i>	Taumatın-benzeri protein	Togawa ve diğ. (2006)

Polen matrisinin içeriğindeki karbohidrat, fenolik bileşikler ve pigmentler gibi maddelerin yüksek miktarlarda olması nedeniyle servi polen proteinlerinin analizinin zor olduğu bilinmektedir (Ariano ve diğ., 2006; Arilla ve diğ., 2004; Shahali ve diğ., 2010). Buna ek olarak, intin olarak bilinen servi polen çeperinin ileri derecede katmanlaşmış polisakkaritlerden (özellikle selüloz ve pektinden) oluşan iç tabakası, sayısı az olan sitoplazmik proteinlerin uygun bir şekilde izole edilmesi, belirlenmesi ve tanımlanmasını engelleyen bir bariyer oluşturmaktadır (Chichiricco ve diğ. 2009). Servi polen ekstralarının karakterizasyonu ve standardizasyonu çeşitli çalışmaların konusu olmasına rağmen, sadece iki majör alerjen net olarak tespit edilmiş ve ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmiştir. Bunlar : pektat liyaz protein ailesine ait Cup s 1 (Arilla

ve diğ., 2006) ve taumatin-benzeri bir protein olan Cup s 3 proteinleridir (Cortegano ve diğ., 2004; Togawa ve diğ., 2006).

Mevcut standart olmayan servi polen ekstraktları düşük aktivite gösterdiğinden, Akdeniz bölgesinde servi polen allerjisinin tanısı için altın standart olarak Dağ sediri (*Juniperus ashei*) polen ekstraktları tercih edilmektedir (Hrabina ve diğ., 2003).

Yapılan çalışmalarda, servi polen ekstraktlarının düşük protein konsantrasyonunun polen tanelerindeki protein içeriğinin azlığından değil, sporoderm tabakasının oluşturduğu fiziksel bariyer nedeniyle ekstraksiyon etkinliğinin düşük olmasından kaynaklandığı bulunmuştur (Shahali ve diğ., 2007; Shahali ve diğ., 2009). Nitekim sporodermin dirençli katmanlarına erişimi sağlayan deterjanlar ve kaotropik ajanların kullanılması servi polen protein ekstraktındaki protein konsantrasyonunu yaklaşık 17 kat artırarak, henüz tanımlanmamış birçok allerjenin tespitine olanak sağlamıştır. Bu yaklaşım, servi polenlerinin spesifik özelliklerine göre, deney şartlarını optimize etmek gerektiği anlamını taşımaktadır (Shahali ve diğ., 2012).

Yeni proteomik yaklaşımlar başlangıç materyali içinde mevcut protein olmayan bileşikleri ortadan kaldırmak ve düşük protein konsantrasyonunu artırmak için daha verimli ekstraksiyon ve çöktürme prosedürlerinin geliştirilmesini sağlamıştır. Bunun yanı sıra, bitki dokularında proteomun önemli bir bölümünü oluşturan düşük ve çok düşük molekül ağırlıklı az sayıdaki proteinleri yakalamak için son zamanlarda kombinasyonel peptid ligand kitaplıkları (CPLL) kullanılmaya başlanmıştır (Boschetti ve diğ., 2009).

### **2.6.2. *Cupressus* Cinsinin Coğrafi Dağılımı ve Alerjenik Bileşenleri**

Cupressaceae familyasına dahil *Cupressus* cinsi dünyada Kuzey Amerika, Himalaya, Çin, Akdeniz bölgesi gibi farklı coğrafi bölgelere yayılmıştır ve bu bölgelerde çok sayıda tür ve tür altı taksonla temsil edilmektedir (Yaltırık, 1993). Özellikle Akdeniz bölgesinde yaygın olarak bulunmaktadır (Sin ve diğ., 2008).

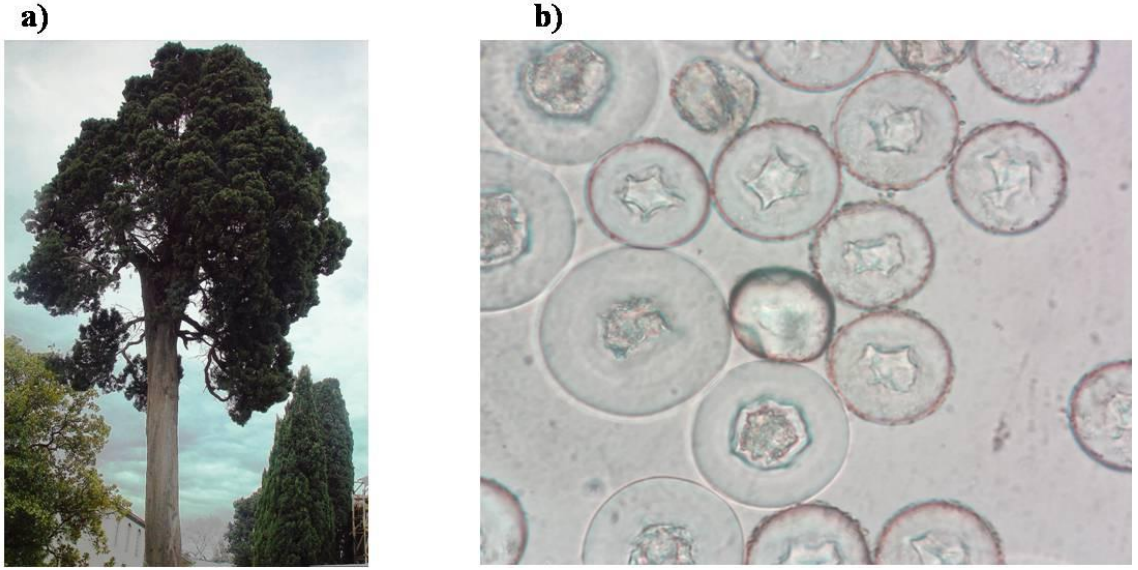
Akdeniz servisi (*C. sempervirens*) fazla miktarda serbest bıraktığı polenleri rüzgar aracılığıyla yayan, yaprak dökmeyen reçineli bir ağaçtır (Şekil 2.3). Türkiye’de doğal yayılış göstermektedir (Davis ve diğ., 1978). Ayrıca son yıllarda *Cupressus arizonica*

türü ile birlikte genellikle park ve bahçelerde süs bitkisi olarak kullanılmaktadır (Sin ve diğ., 2008). *Cupressus* polen taneleri en çok geç kış/erken ilkbaharda solunumsal alerji oluşturmaktadır. Akdeniz havzasındaki Cordoba, Toskana gibi şehirlerde yıllık polen spektrumu % 40'a çıkmaktadır (Mandrioli ve diğ., 2000, Calleja ve diğ., 2010). Doksanlı yılların başında ve sonlarında *Cupressus sempervirens* duyarlılığında en büyük artış (% 7.2-9 dan % 22-30.4'e) İtalya'da görülmüştür (D'Amato ve diğ., 2007).

Tozlaşma dönemi Fransa, İtalya ve İsrail gibi Akdeniz ülkelerinde ve Güney Batı ABD'de Ocak ayında başlayıp genellikle *Cupressus sempervirens* için Mart (bazen Nisan) ayında sona ermektedir (Charpin ve diğ., 2005).

*Cupressus sempervirens* polen ekstresindeki alerjenler Ford ve diğ., (1991) tarafından araştırılmış, molekül ağırlığı 14-96 kDa arasında değişen 17 protein'in IgE ile etkileşime girdiği belirlenmiştir. 42 kDa'luk proteinin alerjik hastaların % 81.3'ünün serumu ile reaksiyon verdiği ve bu proteinin ana alerjen olabileceği ileri sürülmüştür.

Akdeniz servisi polenleri güney Avrupa'da ana aeroalerjenlerinden birini temsil etmesine rağmen, sadece iki alerjen Cup s 1 (Arilla ve diğ., 2004) ve Cup s 3 (Togawa ve diğ., 2006) rapor edilmiştir.



**Şekil 2.2:** Akdeniz servisi (*Cupressus sempervirens* L.) a) Genel görünümü (Galleryhip.com), b) Polen görüntüsü (Olympus CX31,100X).

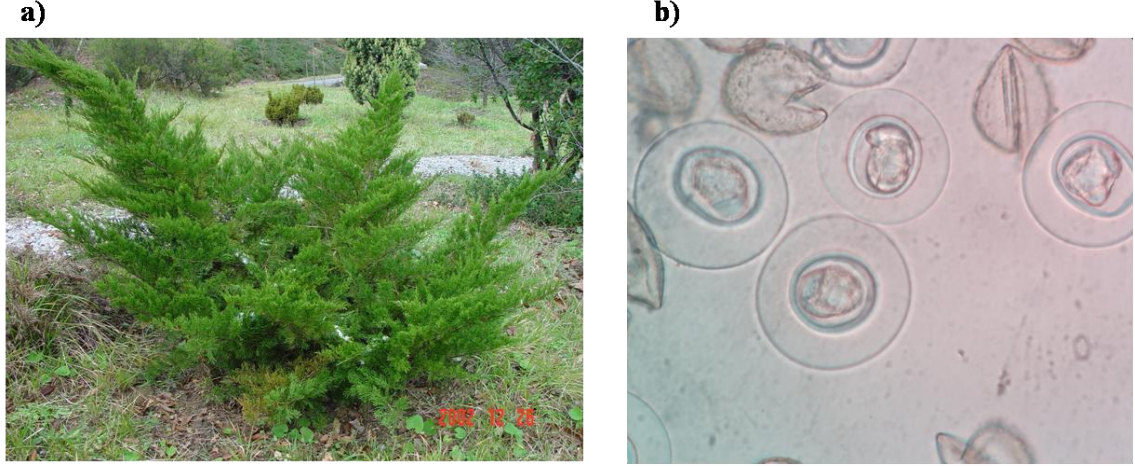
*C. sempervirens*'deki ana alerjenler Cup s 1 ve Cup s 3 ile ilgili çalışmalar son yıllarda hız kazanmıştır. Cup s 1 pektat-liyaz ailesi içerisinde yer alan 43-45 kDa büyüklüğünde bir proteindir ve günümüzde *C. sempervirens*'in ana alerjen proteini olduğu kabul edilmektedir (Arilla ve diğ., 2004). Cup s 3 ise 34 kDa büyüklüğünde, patojenlere karşı savunmada görev alan (PR 5) taumatin-benzeri protein olarak rapor edilmiştir (Togawa ve diğ., 2006). Servi polenlerinin Cup s 1 ve Cup s 3' ün yanı sıra, spesifik bir IgE'ye bağlanan moleküler ağırlıkları 14-95 kDa gibi geniş bir aralıkta yer alan başka proteinler de içerdiği ifade edilmiştir (Ford ve diğ., 1991; Shahali ve diğ., 2010).

*C. sempervirens* ve *C. arizonica* polen ekstraktları arasındaki çapraz reaksiyon Barletta ve diğ. (1996) tarafından ortaya konulmuştur. *C. sempervirens*, *C. arizonica* ve *C. lusitanica* polen ekstraktları tek veya karışım halinde elektroforetik ve immünolojik tekniklerle incelenmiştir. Amonyum sülfat ile çöktürülen proteinler içerisinde en aktif alerjenin *Cupressus arizonica* polenindeki Cup a 1 proteini olduğu belirlenmiştir (Mistrello ve diğ., 2002).

Çeşitli Cupressaceae türlerinin polen ekstraktları düşük protein ve yüksek karbohidrat içeriği ile karakterize edilmektedir (Shahali ve diğ., 2012). Taksonomik olarak ilişkili

ve ilişkili olmayan polen ailelerinin alerjenleri arasındaki çapraz reaktivitede protein ve özellikle karbohidrat epitopları rol oynamaktadır (Pauli, 2000).

### 2.6.3. *Juniperus* Cinsinin Coğrafi Dağılımı ve Alerjenik Bileşenleri



**Şekil 2.3:** Sabin ardıcı (*Juniperus sabina*) a) Genel görünümü b) Polen görüntüsü (Olympus CX31, 100X).

Cupressaceae familyasının bir üyesi olan *Juniperus* cinsi, Kuzey Yarımkürede çok sayıda türle geniş bir yayılım gösterir. Akdeniz havzası etrafında en yaygın tür *Juniperus communis*'dir. *Juniperus oxycedrus* hemen hemen tüm Akdeniz ülkelerinin kıyı kesimlerinde ve iç ormanlık bölgelerinde yetişmektedir. Diğer Cupressaceae türlerinin polen bırakma dönemlerinin dışında kıyı kesimlerde yaşayan kişilerde solunumsal alerjik belirtilerin olası sebebi olarak *Juniperus oxycedrus* polenleri gösterilmektedir (Waisel ve diğ., 1997). Lacovacci ve diğ. (2001) *Juniperus oxycedrus* türlerinin polinizasyon zamanlarını araştırmış ve polenlerin Ekim ayının sonlarında yayılmaya başladığını Kasım ayında en yüksek değere ulaştığını ve Aralık ayının ortalarında azaldığını bildirmişlerdir. *Juniperus phoenicea*'nın polinizasyon dönemi ise Ocak – Şubat ayı olarak bildirilmiştir (Lacovacci ve diğ., 2001).

Türkiye'de *Juniperus sabina* (sabin ardıcı), *Juniperus oxycedrus* (katran ardıcı), *Juniperus communis* (adi ardıç), *Juniperus excelsa* (boylu ardıç), *Juniperus phoenicea* (Finike ardıcı) ve *Juniperus foetidissima* (kokulu ardıç) türleri doğal yayılım göstermektedir (Yaltırık, 1993).



Cupressaceae familyasında yer alan *Juniperus ashei* polenlerine karşı aşırı duyarlılık nedeniyle Amerika Birleşik Devletleri'nin güneyini ve Kuzey Meksika'yı kapsayan geniş alanlarda mevsimsel alerjenik hastalıklara rastlanmaktadır. Dünya genelinde bu familyaya dahil olan benzer türler de aynı sorunlara neden olmaktadır (Platts-Mills ve diğ., 1998). Oklahama, Arkansas ve Teksas eyaletlerinden farklı zamanlarda toplanan *J. ashei* polenlerinden izole edilen alerjen Jun a 3 proteininin, patojenite ile ilişkili PR-5 proteini ile homoloji gösterdiği Western işaretleme ve ELISA yöntemleri ile belirlenmiştir (Midoro-Horiuti ve diğ., 2000).

Lacovacci ve diğ. (2001), servi (*C. sempervirens*) alerjisi olan hastaları *Juniperus oxycedrus* ile karşılaşma sıklıklarına göre iki gruba ayırmış ve her iki grupta yer alan bireylerde klinik incelemeler yaparak *J. oxycedrus*'un alerjen özelliklerini belirlemişlerdir.

Hrabina ve diğ. (2003) servi alerji tanısı için dağ sediri (*Juniperus ashei*) ekstreleriyle standart bir deri prik testi geliştirmişler ve bu testin özgüllük ve duyarlılığını incelemişlerdir. *Juniperus ashei* polen ekstresini 2-D elektroforezle analiz etmişlerdir. Referans polen ekstresi (IHRS) ile yapılan deri prik testleri servi alerjisi bulunan 28 hastada kalibre edilmiştir (Midoro-Horiuti ve diğ., 2000). Standart bir *Juniperus ashei* ekstresinin servi polen alerji tanısındaki duyarlılığı ve özgünlüğü, servi alerjisi olan 42 hastada ve alerjik olmayan 53 hastada deri prik testi ile incelenmiştir. Dağ sediri polen ekstrelerinin servi polen alerjisinin tanısında ve spesifik immünoterapisinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte, çapraz reaktivitenin moleküler temeli aydınlatılmamıştır (Midoro-Horiuti ve diğ., 1999, 2000).

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. POLEN ÖRNEKLERİ

Bu tez kapsamında Akdeniz servisi (*Cupressus sempervirens* L.) ve Sabin ardıcı (*Juniperus sabina* L.) türlerinin polenleri ile çalışılmıştır.

##### 3.1.1. Polen Örneklerinin Toplanması

Akdeniz servisi (*C. sempervirens*) polenleri Şubat-Mart 2012'de, Sabin ardıcı (*J. sabina*) polenleri Mart-Nisan 2012'de İstanbul Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Botaniği Anabilim Dalında görevli uzman araştırmacılar tarafından İ.Ü Orman Fakültesi'nin bahçesinden steril eldivenler kullanılarak toplandı ve kağıt zarflar içerisinde muhafaza edildi. Polenler erkek çiçek kurullarından ayrılması için 1 gün süreyle kurutma kağıdı üzerinde bekletildi ve daha sonra farklı gözeneklere (250, 180, 90 milimikron) sahip eleklerden geçirilerek diğer partiküllerden kurtarıldı ve altta yer alan toplama kabında biriktirildi. Mikroskop altında saflık kontrolünden geçirilen polenler, hassas terazide tartıldıktan sonra steril tüplere konuldu ve protein ekstraksiyonu için kullanılana kadar derin dondurucuda (-86°C) saklandı.

#### 3.2. POLEN EKSTRELERİNİN HAZIRLANMASI

İstanbul Üniversitesi, Orman Fakültesi'nden temin edilen polenler 1: 12 (ağırlık: hacim) oranında 125 mM amonyum bikarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) çözeltisinde +4°C'de 12 saat düşük hızlı manyetik karıştırıcıda (Heidolph, MR Hei-Standard) karıştırıldı. Polen kalıntıları santrifüjde (Centrifuge 5810 R, Eppendorf) (13000xg, +4°C, 1 saat) çöktürülerek uzaklaştırıldı. Üst sıvı faz farklı filtrasyon aşamalarından [ilk önce 125 mm kalınlığındaki Whatman kağıdı (Whatman no.1) ve filtrasyon sisteminden (Sigma, Millipore Sterifil Vacuum Filtration System)] geçirildi. Elde edilen filtrat diyaliz tüpü (Sigma-Aldrich, 33 mm) içerisine aktarıldı. Diyaliz işlemi +4°C'de 48 saat çalkalayıcıda saf suya karşı gerçekleştirildi (Lacovacci ve diğ., 1998). Diyaliz aşaması tamamlandıktan sonra kalan filtrat -80°C de tamamen dondurularak liyofilizasyona

hazır hale getirildi. Dondurulan örnekler liyofilizatörde (CHRIST/ALPHA 1-4 LD Plus) kuru toz haline gelene kadar liyofilize edildi. Toz haline gelmiş olan polen ekstreleri kullanılmaya kadar -80°C’de saklandı.

### 3.3. KLİNİK TESTLER

Klinik testler İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’ndan Etik Kurul Onay Belgesi (Ek 1) alınarak İstanbul Üniversitesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmunoloji ve Alerji Hastalıkları Bilim Dalı’ndaki uzman hekimler tarafından gerçekleştirildi. Kliniğe başvuran hastalar ve sağlıklı kontrol bireyleri yapılacak çalışmalar hakkında bilgilendirilerek onam formları (Ek 2) imzalatıldı.

Daha önceden farklı ağaç polenlerine karşı alerjisi olduğu belirlenmiş 18 hasta (10 kadın, 8 erkek) Akdeniz servisi (*C.sempervirens*) polen alerjisi için, 17 hasta (10 kadın, 7 erkek) Sabin ardıcı (*J.sabina*) polen alerjisi için deri prik ve nazal provokasyon testlerine tabi tutuldu.

Test uygulanacak kişilerin en az bir hafta antihistaminik, en az 4 hafta kortikosteroid ve diğer bir immün supresif ilaç kullanmamış olmasına, ayrıca son iki yıl içerisinde alerjen immünoterapisi almamış olmasına dikkat edildi.

Her iki polen örneği için 3’er sağlıklı kontrol birey (Akdeniz servisi için 2 kadın, 1 erkek ve Sabin ardıcı için 3 kadın), hastalara uygulanan klinik testlerden geçirildi.

Klinik testler öncesinde hasta ve kontrol bireylerden alınan kan örnekleri 14000 devir/dak hızda santrifüjle (Centrifuge 5810 R, Eppendorf) 10 dakika ayrıştırıldı. Üst fazda kalan kan serumları separatör jel içeren tüplere alındı ve Western işaretleme deneylerinde kullanılmak üzere derin dondurucuda (-80°C) saklandı.

#### 3.3.1. Deri Prik Testinin Uygulanması

Liyofilize polen ekstreleri serum fizyolojikte 1 mg/mL olacak şekilde çözündürülerek 4 farklı dilüsyonda (1, 1/10, 1/100, 1/1000) hazırlandı. Bu polenlerin ticari olarak temin edilmiş standart alerjen ekstreleri (ALBIO) ile eş zamanlı olarak, hasta ve kontrol grubu bireylerin ön kol iç yüzeylerine prik (delme) yöntemi ile uygulandı. Test sonuçlarını

değerlendirmek için pozitif kontrol olarak histamin, negatif kontrol olarak serum fizyolojik aynı metodla uygulandı. Önceden kol derisi üzerinde ayrı ayrı işaretlenen noktalara hem yeni hazırlanmış hem de ticari ekstrelerden birer damla damlatıldı ve lanset yardımı ile bu damlaların ortasından sadece epidermisi deiecek şekilde birer delik açıldı. 20 dakika beklendikten sonra kızarıklık çapı değerlendirildi. Negatif kontrolden 3 mm veya daha geniş bir kabarıklık reaksiyonu pozitif olarak kabul edildi.

### **3.3.2. Nazal Provokasyon Testinin Uygulanması**

Nazal provokasyon testi için hasta ve kontrol bireylerin burnuna serum fizyolojik ve ardından pozitif sonuç alınana kadar 1/1000, 1/100, 1/10 ve 1/1 sulandırımında polen ekstresi püskürtüldü. Uygulama öncesinde ve sonrasında anterior rinometri ile ölçüm yapıldı (Masterscope Spirometre, Jaeger). Serum fizyolojik ile reaksiyon veren hastalar hiperreaktif olarak değerlendirildi.

## **3.4. PROTEİN ANALİZLERİ**

### **3.4.1. Polen Ekstresindeki Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

Polen ekstrelerindeki protein konsantrasyonu Smith ve diğ. (1985) tarafından önerilen bişinkoninik asit (BCA) yöntemine göre, ticari bir kit (Pierce, Thermo Scientific BCA Protein Assay Kit) kullanılarak belirlendi. Bu yöntem, alkali çözeltideki proteinlerin biüre reaktifıyla işleme sokulduğunda Cu (II) iyonlarını Cu (I) iyonlarına indirgemesi ve Cu (I) iyonlarının BCA ile oluşturduğu koyu mor renkli kompleksin 562 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesi temeline dayanmaktadır. BCA yöntemi proteinin amino asit kompozisyonundan orta derecede etkilenir. Yöntemin duyarlılığı 20-100 µg/mL aralığındadır.

Örneklerin hazırlığı Walker (2002)’ın önerdiği yöntemine göre yapıldı. Öncelikle BCA kitinin içerisinde yer alan sığır serum albumin (“bovine serum albumin”, BSA) proteini suda çözündürülerek ve uygun oranlarda sulandırılarak 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/mL konsantrasyonda standartlar hazırlandı. Standartlar toz halindeki proteinlerin çözündürüldüğü distile su ile hazırlandı. Akdeniz servisi için 2.13 mg/mL konsantrasyonda, Sabin ardıcı için 2.545 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış protein örnekleri 1/5 ve 1/10 sulandırılmaları ve standartlar 96 kuyucuklu tabaklara üç tekrarlı

olarak 25'er  $\mu\text{L}$  dolduruldu. K r olarak distile su kullanıldı. Kit içeriğindeki reaktif A ve reaktif B solusyonları sırasıyla 50: 1 (v:v) oranında karıştırılarak BCA belirteci elde edildi. Protein  rnekleri, standartlar ve k r n üzerine 200'er  $\mu\text{L}$  belirteç eklendi. Tabak, 1 dakika çalkalayıcıda (Heidolph Unimax 1010) alkalandı. Daha sonra 37°C'lik etüvde (Thermo Scientific, HERACELL 1500 İ) 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda spektrofotometrede (Bio-Tek,  $\mu$ -Quant) 562 nm'deki absorbans değerleri ölçüldü. Standartlara ait konsantrasyon ve absorbans değerleri kullanılarak standart bir grafik oluşturuldu. Protein örneklerine ait absorbans değerleri, standart grafiğin doğru denklemine yerleştirilerek protein konsantrasyonları belirlendi.

#### **3.4.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez**

Suda  z nebilir proteinler, Walker (2002) tarafından önerilen yöntem kullanılarak SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez) ile mini jel elektrofrez sisteminde (Mini-PROTEAN 3 cell, Bio-Rad) analiz edildi. Elektrofrez işleminde kullanılan tüm cam malzemeler ve jel kaseti sıvı deterjan ile yıkandıktan sonra durulandı ve distile sudan geçirildi. Jel kasetine yerleştirilecek olan cam malzemeler %70'lik etanol ile silindi ve partikül kalmayacak şekilde kurulandı. Jel kaseti elektrofrez sisteminin kitapçığında belirtildiği şekilde hazırlandı. İlk olarak elektrofrezde kullanılacak çözelti ve tamponlar hazırlandı (Tablo 3.1). Ardından % 10'luk ayırma jeli için içeriği Tablo 3.2'de verilen karışım hazırlandı ve çözünmüş oksijenin uzaklaştırılması için 5 dakika ultrasonik su banyosunda (WiseClean, WUC-D10H) bekletildi. TEMED eklendikten sonra jel karışımı kasetin 4/5'ini dolduracak şekilde enjektör yardımıyla iki cam arasına (1 mm) boşaltıldı. Polimerizasyon sırasında üst yüzeyde düzgün bir hat oluşması ve polimerizasyonu engelleyen oksijenle temasın kesilmesi için, yüzeyi örtecek şekilde distile su eklendi. Daha sonra, %5'lik yükleme jeli için jel karışımı hazırlandı (Tablo 3.2) ve ultrasonik su banyosunda bekletilerek çözünmüş oksijen uzaklaştırıldı. Polimerize olmuş ve üst yüzeyindeki su dökülmüş ayırma jeli'nin üzerine enjektör yardımıyla % 5'lik yükleme jeli karışımı uygulandı. Proteinlerin yükleneceği kuyucukların oluşması için distile sudan geirilmif tarak (1 mm) dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra tarak çıkartıldı ve cepler saf suyla yıkandı. Jel kaseti 1X Tank tamponu ile doldurulmuş elektrofrez tankına yerleştirildi. Distile suda çözündürülmüş olan polen protein ekstratları 1:1 (v:v) oranında örnek uygulama tamponu (Tablo 3.1) ile karıştırılarak

kuyucuk başına 30 µg protein olacak şekilde jele yüklendi. Elektroforez sabit voltajda (200 V) boyaya ait bant, jelin alt kenarına 2-3 mm kalana dek (yaklaşık 40 dakika) yürütme işlemi gerçekleştirildi (Walker, 2002). Ceplerden en az birine protein marker karışımı (SeeBluePlus2 Prestained, Invitrogen) uygulandı. Elektroforezle ayrılmış polen ekstrelerindeki proteinlere ait bantlar, marker karışımındaki proteinlere ait bantlarla karşılaştırılarak analiz edildi.

**Tablo 3.1:** SDS-PAGE için hazırlanan çözeltiler.

<b>Çözeltiler</b>	<b>Bileşenler</b>
<b>Stok Akrilamid Çözeltisi</b>	Akrilamid.....30 g Bis-Akrilamid.....0.8 g Son hacim distile su ile 100 mL' ye tamamlandı.
<b>Tris-HCl Tamponu (1,875 M, pH 8.8) [Ayrırma jeli]</b>	Trizma-base.....45.43 g 3 N HCl ile pH 8.8'e ayarlandı Son hacim distile su ile 200 mL' ye tamamlandı.
<b>Tris-HCl Tamponu (0,6 M, pH 6.8) [Yükleme jeli]</b>	Trizma-base.....14.54 g 3 N HCl ile pH 6.8' e ayarlandı Son hacim distile su ile 200 mL' ye tamamlandı.
<b>% 10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)</b>	SDS.....10 g Son hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.
<b>% 10 APS (Amonyum Persülfat) çözeltisi</b>	APS.....1 g Son hacim distile su ile 1 mL'ye tamamlandı. Jel döküleceği zaman taze hazırlandı.
<b>5X Tank Tamponu</b>	Trizma-base.....15 g Glisin.....72 g SDS.....5 g Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
<b>2X Örnek Uygulama Tamponu (0.125 M Tris, %20 Gliserol, % 4 SDS, %10 2-Merkaptoetanol, %0.2 Bromofenol mavisi)</b>	Tris (0.6 M, pH 6.8).....2.08 mL SDS (% 10 SDS).....4 mL Gliserol.....2 mL 2-Merkaptoetanol.....1 mL Bromofenol blue.....0.02 g Son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

**Tablo 3.2:** SDS-PAGE’de kullanılan jelin hazırlanması (1 jel için gerekli miktarlar).

<b>Ayırma Jeli Bileşenleri (%10)</b>	
Tris-HCl (1.875 M, pH 8.8).....	1 mL
Distile su.....	2.262 mL
Stok Akrilamid Çözeltisi (%30).....	1.662 mL
% 10 SDS.....	0.05 mL
% 10 APS.....	0.0025 mL
TEMED.....	2 µL
<b>Yükleme Jeli Bileşenleri (%5)</b>	
Tris-HCl (0.6 M, pH 6.8).....	0,5 mL
Distile su.....	1,875 mL
Stok Akrilamid Çözeltisi (%30).....	0.338 mL
% 10 SDS.....	0.025 mL
% 10 APS.....	0.0125 mL
TEMED.....	3.5µL

### 3.4.3. Boyama Yöntemlerinin Uygulanması

#### 3.4.3.1. Coomassie Boyama

Coomassie boyama işlemi Ausubel ve diğ. (1989)’nin önerdiği yonteme göre gerçekleştirildi. Boyama işleminde kullanılan çözeltiler Tablo 3.3’de verildiği şekilde hazırlandı. Elektroforez sonunda jel kasetinden dikkatlice çıkarılan jel alkole ve aside dayanıklı plastik bir kaba aktarıldı. Fiksatif çözeltisi içinde çalkalayıcı (Heidolph Unimax 1010) kullanılarak oda sıcaklığında, düşük hızda (50 devir/dak) 2 saat çalkalandı. Fiksatif çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra boyama çözeltisi içinde (Imperial™ Protein Stain Coomassie R-250) aynı şekilde çalkalandı. Boyama çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra 2 dakika fiksatif çözeltisinde bekletildi, ardından saf su ile belirgin bantlar elde edilene kadar çalkalandı. İstenilen görüntü elde edildiğinde görüntüleme cihazı (Bio-Rad, GS-800) ile görüntü kaydedildi ve Image Lab Programı (Bio-Rad) kullanılarak değerlendirildi.

**Tablo 3.3:** Coomassie boyama yönteminde kullanılan çözeltiler.

Çözeltiler	Bileşenler
<b>Fiksatif çözeltisi</b>	Metanol..... 500 mL Asetik asit (glasiyel).....100 mL Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
<b>Boyama çözeltisi</b>	Metanol..... 500 mL Coomassie brilliant blue R-250..... 1 g Asetik asit (glasiyel)..... 100 mL Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
<b>Yıkama çözeltisi</b>	Metanol..... 125 mL Asetik asit (glasiyel)..... 175 mL Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

### 3.4.3.2. Gümüş Boyama

Gümüş boyama işleminde Heukeshoven ve Dernik (1985) tarafından önerilen yöntem kullanıldı. Boyama işleminde kullanılan çözeltiler Tablo 3.4'de verildiği şekilde hazırlandı. Elektroforez sonunda jel kasetinden dikkatlice çıkartılan jel alkole ve aside dayanıklı plastik bir kaba aktarıldı. Formaldehitli fiksatif çözeltisi içerisinde çalkalayıcı (Heidolph Unimax 1010) kullanılarak oda sıcaklığında, düşük hızda (50 devir/dak) 20 dakika çalkalandı. Fiksatif çözeltisi dökülerek iki kez 10'ar dakika saf su ile düşük hızda çalkalanarak yıkandı. Yıkama işleminin ardından sodyum tiyosülfat çözeltisinde 2 dakika çalkalandı. Çözelti dökülerek iki kez 1'er dakika saf su ile yıkandı. Son yıkama suyu uzaklaştırıldıktan sonra % 0.1'lik gümüş nitrat çözeltisinde düşük hızda 20 dakika çalkalandı. Çözelti uzaklaştırılarak jel saf su ile yıkandı. Jel tiyosülfatlı görüntü oluşturma çözeltisinde kahverengi bantlar oluşana kadar çalkalandı. Bantlar oluşuktan sonra 2.3 M sitrik asit çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu. Görüntüleme cihazı (Bio-Rad, GS-800) ile görüntü kaydedildi ve Image Lab programı kullanılarak sonuçlar değerlendirildi.



**Tablo 3.4:** Gümüş boyama yönteminde kullanılan çözeltiler.

Çözeltiler	Bileşenler
<b>Formaldehitli fiksatif çözeltisi</b>	Metanol .....400 mL
	%37 Formaldehit .....500 µL
	Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
<b>Sodyum tiyosülfat çözeltisi</b>	Sodyum tiyosülfat (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ).....0.2 g
	Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
<b>%0.1'lik Gümüş nitrat çözeltisi</b>	Gümüş nitrat (AgNO <sub>3</sub> ) .....1 g
	Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
<b>Tiyosülfatlı görüntü oluşturma çözeltisi</b>	Sodyum karbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) .....30 g
	Sodyum tiyosülfat çözeltisi .....20 mL
	Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
<b>2.3 M Sitrik asit çözeltisi</b>	Sitrik asit .....22.1 g
	Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı

### 3.5. ELEKTROTRANSFER VE WESTERN İŞARETLEME (“BLOTTING”)

Elektrotransfer işleminde Towbin ve diğ. (1979) tarafından önerilen yöntem uygulandı. Gerekli çözeltiler Tablo 3.5'te gösterildiği şekilde hazırlandı. SDS-PAGE ile molekül ağırlıklarına göre ayrılan proteinler Yarı Kuru İşaretleme Sistemi (Bio-Rad, Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell) kullanılarak poliviniliden diflorür (PVDF) membrana aktarıldı. Önce sırasıyla 1X transfer tamponunda ıslatılmış üç adet Whatman kağıdı (no:1), metanolde doyurulmuş PVDF membran, proteinlerin yürütüldüğü jel, 1X transfer tamponunda ıslatılmış üç adet Whatman kağıdı üstüste konularak transfer ünitesine yerleştirildi. Üst yüzeyde cam bir tüp yardımı ile oklova hareketleri yapılarak katmanlar arasındaki hava kabarcıklarının çıkması sağlandı ve tank transfer sistemindeki elektrotlar güç kaynağına takıldı. Transfer işlemi membran başına 0.3 A ve 25 V elektrik akımı uygulanarak 1.5 saat süreyle gerçekleştirildi. Transferi takiben

membrandaki boş alanların kapatılması için %5'lik bloklama çözeltisi (%0.05 (v/v) Tween-20 içeren PBS'de hazırlanmış %5 (w/v) süt tozu) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Bloklama işleminin ardından membranda saptanmak istenen antijene bağlanacak olan primer antikor (kan serumları), %5'lik bloklama çözeltisi ile 1:4 (v:v) oranında sulandırılarak membranın üzerine yayıldı ve +4°C'de 1 gece bekletildi. Primer antikorla inkübasyonun ardından antikor kalıntılarını uzaklaştırmak için 1X yıkama tamponu (Tablo 3.5) ile 4 kez 15'er dakika düşük devirde çalkalanarak yıkama yapıldı. Ardından sekonder antikor [fare anti-insan IgE (Fc)-HRP antikor, SouthernBiotech] bloklama tamponu ile 1:1000 (v:v) oranında sulandırılarak membranın üzerine yayıldı ve oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Membran daha sonra 1X yıkama tamponu ile 3 kez 15'er dakika yıkandı. Membran üzerindeki bantlar kemilüminesan bir kit (ECL Plus Western Blotting Detection System, Invitrogen) kullanılarak belirlendi. Kit içerisindeki A reaktifi ve B reaktifi solüsyonları 1:1 (v:v) oranında karıştırıldı. Karanlık odada, kırmızı ışık altında membran üzerine eklenen bu karışım 5 dakika bekletildikten sonra hızlı bir şekilde uzaklaştırıldı ve membran iki asetat kağıdı arasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilerek görüntüleme cihazına (Bio-Rad, GS-800) yerleştirildi. Membranda elde edilen görüntü Image Lab Programı kullanılarak analiz edildi.

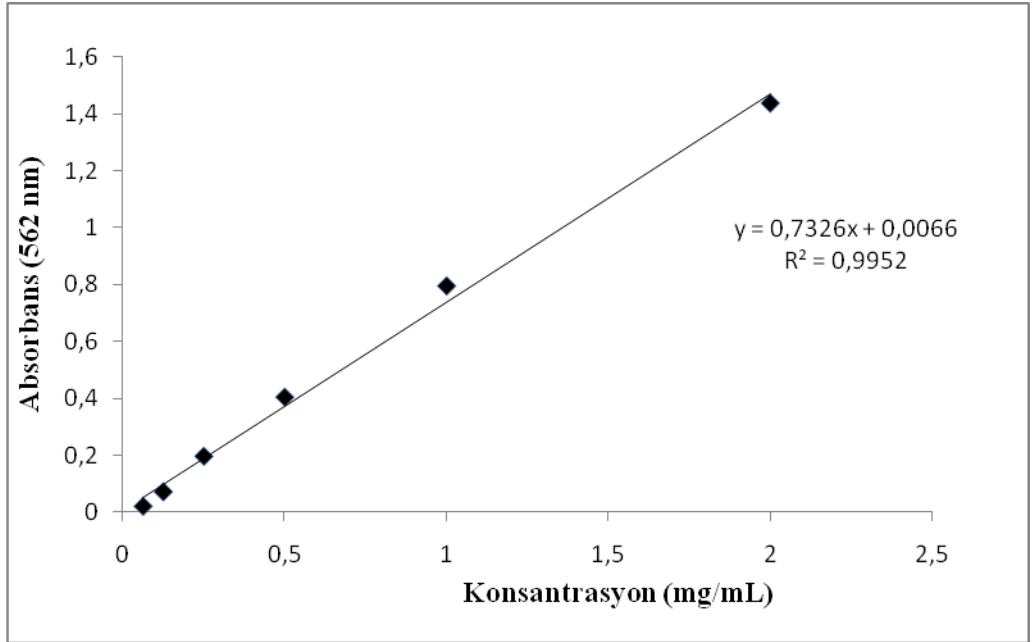
**Tablo 3.5:** Elektrotransfer ve Western işaretleme yönteminde kullanılan tampon çözeltiler.

<b>Çözeltiler</b>	<b>Bileşenler</b>
<b>10X Transfer Tamponu</b>	Trizma-base .....30,30 g Glisin.....144 g Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
<b>1X Transfer Tamponu</b>	Metanol.....200 mL 10X Transfer Tamponu.....100 mL Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
<b>% 5'lik Bloklama Tamponu</b>	Süt tozu.....5 g Son hacim 1X PBS-Tween-20 ile 100 mL'ye tamamlandı.
<b>10X Yıkama Tamponu</b>	PBS.....95,5 g Tween-20.....5 mL Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.
<b>1X Yıkama Tamponu</b>	10X Yıkama Tamponu.....100 mL Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. POLEN EKSTRELERİ VE PROTEİN KONSANTRASYONU

Akdeniz servisi (*C.sempervirens*) ve Sabin ardıcı (*J.sabina*) polen ekstrelerindeki protein konsantrasyonu Pierce BCA Protein Assay Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak belirlendi. Kit içerisinde bulunan sığır serum albümin (BSA) standartı belirli oranlarda dilüe edilerek (0.625, 0.125, 0.25, 0.50, 1, 2 mg/mL) standart grafik elde edildi ve bu grafik (Şekil 4.1) kullanılarak örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi.



Şekil 4.1: Protein konsantrasyonunu belirlemede kullanılan standart grafik.

Her iki polen ekstresi 2 mL saf su ile çözüldürüldü. Protein konsantrasyonları *C. sempervirens* polen ekstresi için 2.13 mg/mL, *J. sabina* polen ekstresi için 2.545 mg/mL olarak belirlendi.

## 4.2. KLİNİK TESTLER

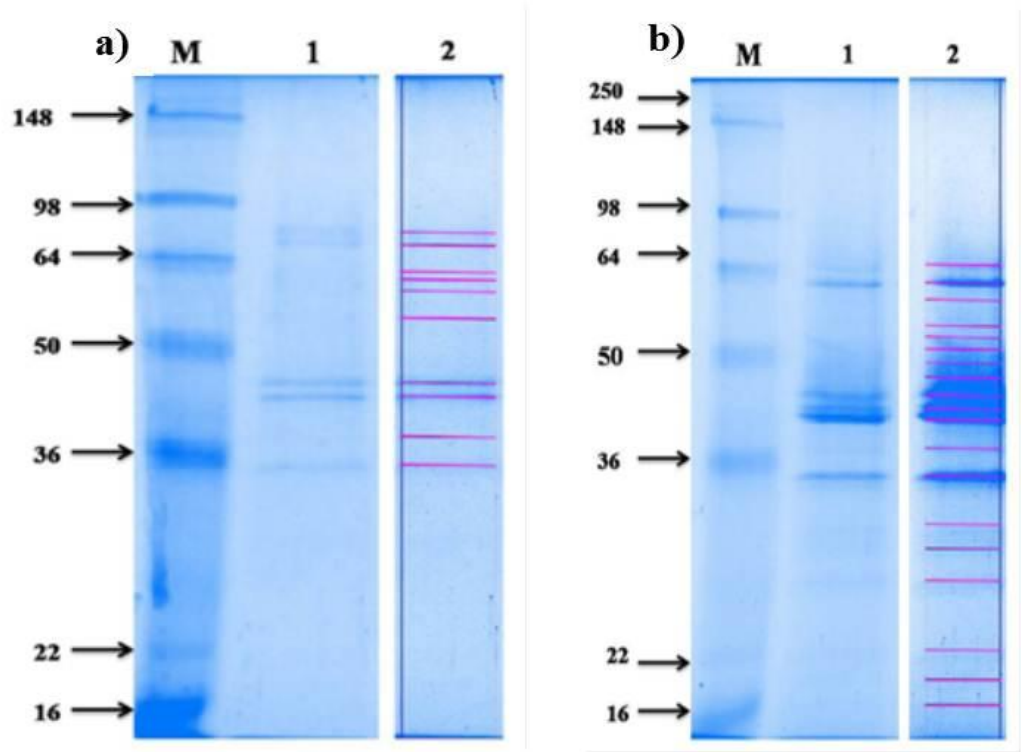
Protein konsantrasyonu belirlenmiş olan polen ekstraları, alerjik rinit hastaları (Akdeniz servisi için 18, Sabini ardıcı için 17) ve kontrol bireylerine deri prik testi (SPT) ve nazal provokasyon testi (NPT) ile uygulandı. Deri prik testinde pozitif kontrol olarak histamin, negatif kontrol olarak serum fizyolojik kullanıldı. Polen örnekleri hastalara uygulanmak üzere belirli oranlarda (1/1000, 1/100, 1/10) dilüe edildi. Negatif kontrolden 3 mm veya daha geniş bir kabarıklık reaksiyonu gösteren hastalar pozitif olarak kabul edildi. Nazal provokasyon testlerinde serum fizyolojik ile polen ekstralarına nazal direnç gösteren hastalar pozitif, sadece serum fizyolojiğe nazal direnç gösteren hastalar hiperreaktif olarak değerlendirildi.

SPT sonuçları değerlendirildiğinde, Akdeniz servisi polenlerine karşı 2, 4 ve 14 numaralı hastalar dışında pozitif yanıt gözlenmedi. Sabini ardıcı polenlerine karşı ise 1, 2, 4, 8, 9, 10, 12, 14 ve 17 numaralı hastalarda pozitif yanıt gözlendi.

NPT sonuçları değerlendirildiğinde, Akdeniz servisi polenlerine karşı 1, 2, 12, 15, 17 numaralı hastalar pozitif yanıt; 4, 5, 6, 7, 9, 10 ve 14 numaralı hastalar negatif yanıt verirken 3, 8, 11 ve 13 numaralı hastalarda hiperreaktivite gözlendi. Sabini ardıcı polenlerine karşı ise 1, 2, 7, 8, 12, 13 numaralı hastalar pozitif yanıt, 5, 6, 9, 10, 15, 16 numaralı hastalar negatif yanıt verirken 3, 4, 11, 14, 17 numaralı hastalarda hiperreaktivite gözlendi. Kontrol grubunda yer alan bireylerde NPT ve SPT'ye karşı pozitif yanıt gözlenmedi.

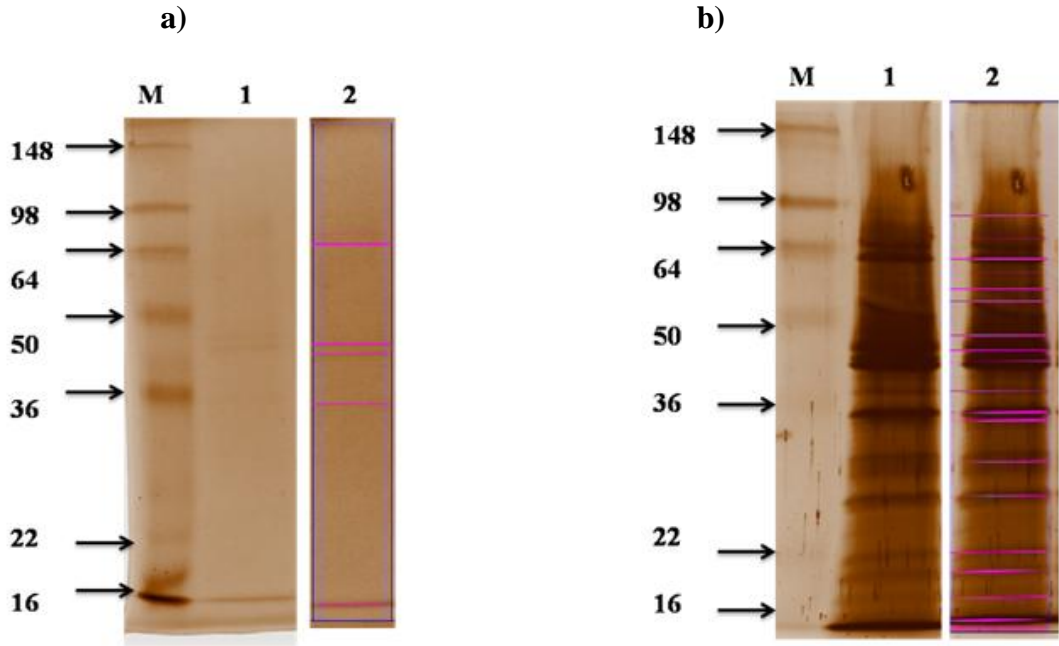
## 4.3. POLEN EKSTRELERİNİN SODYUM DODESİL SÜLFAT POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ VE BANT PROFİLLERİ

Liyofilize haldeki polen ekstraları saf su içerisinde çözündürülüp protein konsantrasyonu saptandıktan sonra, her bir kuyucukta 30 µg protein olacak şekilde örnek yükleme tamponu ile karıştırılarak 1D-SDS-PAGE jellerine yüklendi. Proteinlerin ayrıştırılma işlemi tamamlandıktan sonra jel üzerindeki proteinler Coomassie (Şekil 4.2) ve gümüş boyama (Şekil 4.3) yöntemleri ile görünür hale getirildi.



**Şekil 4.2:** Coomassie boyama yöntemi ile boyanmış örnek jel görüntüleri  
a) Akdeniz servisi polen proteinlerine ait bant profilleri; b) Sabin ardıcısı polen proteinlerine ait bant profilleri (M: Marker;  
1: boyama işleminden sonra jeldeki bantlar;  
2: Image Lab programı ile belirlenen bantlar).

1D-SDS-PAGE ile ayrıştırılan ve Coomassie boyama yöntemi ile boyanmış jelde Image Lab programı kullanılarak belirlenen bantların Akdeniz servisi için 16-77.5 kDa arasında olduğu (11 bant) gözlemlendi. En yoğun bantlar 42.9, 44.7, 70.6 ve 77.5 kDa molekül ağırlığındaki bölgelerde gözlemlendi. Sabin ardıcısında ise 16-65.3 kDa arasında 20 bant gözlemlendi. En yoğun bantlar 34.8, 41, 42.4, 44.2 ve 61.2 kDa molekül ağırlığındaki bölgelerde gözlemlendi.



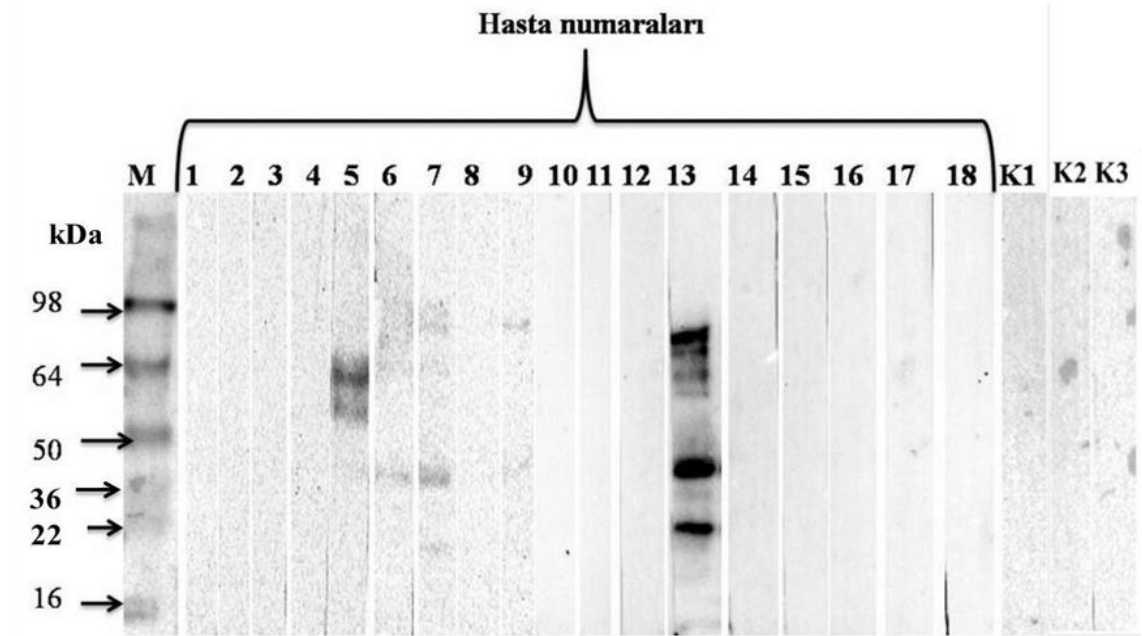
**Şekil 4.3:** Gümüş boyama yöntemi ile boyanmış örnek jel görüntüleri a) Akdeniz servisi polen proteinlerine ait bant profilleri; b) Sabın ardıcı polen proteinlerine ait bant profilleri (M: Marker;1: boyama işleminden sonra jeldeki bantlar; 2: Image Lab programı ile belirlenen bantlar).

1D-SDS-PAGE ile ayrıştırılan ve gümüş boyama yöntemi ile boyanmış jelde Image Lab programı kullanılarak belirlenen bant sayısının Akdeniz servisi için, Coomassie boyama ile aynı (11) olduğu gözlemlendi. Sabın ardıcı proteinleri gümüş boyama yöntemi ile etkin bir şekilde boyandı ve daha fazla sayıda bant (en az 25 bant) belirlendi.

#### 4.4. ELEKTROTRANSFER VE WESTERN İŞARETLEME SONUÇLARI

Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde molekül ağırlıklarına göre ayrılmış olan polen proteinleri PVDF membrana aktarıldı. Aktarım işleminin ardından membran alerjik rinit tanısı konulmuş hastalar ve sağlıklı kontrol bireylerin serumları (primer antikor) ile muamele edildi. Hasta serumlarındaki spesifik IgE'lerin bağlandığı polen proteinlerini saptamak amacıyla membranlar sekonder antikor ile muamele edildi. Sekonder antikor muamelesinden sonra antijen-antikor-sekonder antikor bağlantısının olduğu bantlar bir kit (ECL Plus Western Blotting Detection System, Invitrogen) kullanılarak kemilüminesans ışın reaksiyonu ile belirlendi ve görüntüleme cihazında görüntülendi.

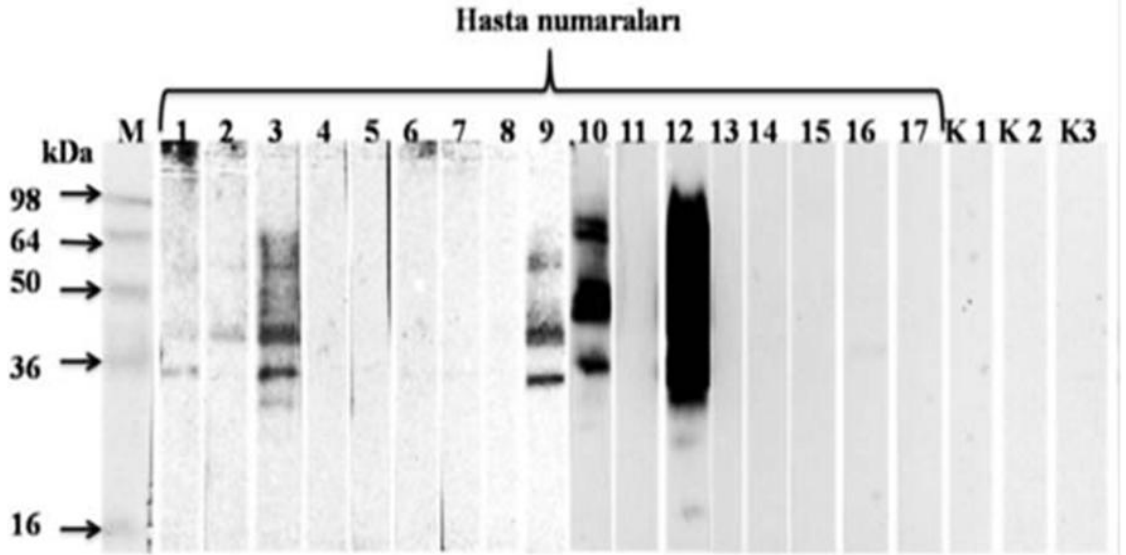
Akdeniz servisi polen ekstresi uygulanmış hastaların serumlarıyla yapılan Western işaretleme deneylerinde, 5 numaralı hastada 38 kDa ve 42.9 kDa molekül ağırlığında 2 bant, 6 numaralı hastada 29.7, 45.3, 53.9 ve 58.1 kDa molekül ağırlığında 4 bant, 7 numaralı hastada 21.9, 29.1, 39.7, 44.3, 52.2 ve 55.7 kDa molekül ağırlığında 6 bant, 9 numaralı hastada 30.7 ve 53.3 kDa molekül ağırlığında 2 bant, 13 numaralı hastada 20.8, 27.4, 36.6, 39.7, 54.7, 57.6, 62.6 ve 68.6 kDa molekül ağırlığında 8 bant saptandı. Kontrol grubu bireylerinde herhangi bir bant gözlenmedi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Akdeniz servisi polen ekstresinin Western işaretleme sonuçları (M: Marker, K1-3: kontrol bireyleri).



Sabin ardıcı polen ekstresi uygulanmış hastaların serumlarıyla yapılan Western işaretleme deneylerinde, 1 numaralı hastada 34.8, 41.9 ve 61.1 kDa molekül ağırlığında 3 bant, 2 numaralı hastada 42.4 ve 64 kDa molekül ağırlığında 2 bant, 3 numaralı hastada 28.6, 34, 41.9, 53.7, 67.7 ve 85 kDa molekül ağırlığında 6 bant, 6 numaralı hastada 32.3 kDa molekül ağırlığında 1 bant, 7 numaralı hastada 31.6 kDa molekül ağırlığında 1 bant, 9 numaralı hastada 31.7, 41 ve 61.1 kDa molekül ağırlığında 3 bant, 10 numaralı hastada 34, 42.4, 46.1, 49.6, 63.8 ve 71,7 kDa molekül ağırlığında 6 bant, 12 numaralı hastada 22.2 ve 27.8 kDa molekül ağırlığında 2 bant, 16 numaralı hastada 34.8 kDa molekül ağırlığında 1 bant saptandı. Kontrol grubu bireylerinde herhangi bir bant gözlenmedi (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5:** Sabin ardıcı polen ekstresinin Western işaretleme sonuçları (M: Marker, K1-3: kontrol bireyleri).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kozalaklı bitkiler ürettikleri fazla miktardaki polenler nedeniyle önemli alerjen kaynakları olarak kabul edilmektedir (Schwietz ve diğ., 2000). Bu bitkililer arasında yer alan servigiller (Cupressaceae) ailesinin türleri tüm dünyada olduğu gibi Ülkemizde de giderek artan alerjik etkilere neden olmaktadır (Charpin ve diğ., 2005; Scala ve diğ., 2010; Sin ve diğ., 2007).

Polenler taşımış oldukları proteinler veya glikoproteinler nedeniyle alerjik etki göstermektedir. Örneğin, Akdeniz servisi polenlerinde 43-45 kDa molekül ağırlığına sahip Cup s 1 (Arilla ve diğ., 2004) ve 34 kDa molekül ağırlığına sahip Cup s 3 (Togawa ve diğ., 2006) alerjen proteinleri belirlenmiştir. Sabin ardıcı polenlerinin alerjenitesi hakkında bilimsel çalışmalar oldukça az olup (Lorenzoni-Chiesura ve diğ., 2000), alerjenik proteinlerinin tanımlanmasına ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Polen alerjisinin tanısının ilk basamağını, yaşanan bölgede maruz kalınan polen kaynağının tespit edilmesi oluşturmaktadır. Polenlerin yapıları, havadaki miktarları, histokimyasal özellikleri ve alerjenitelerinin buldukları coğrafi bölgeye, iklime ve çevre koşullarına göre değiştiği bilindiğinden (D'Amato ve diğ., 2007), alerji tanı ve tedavi yöntemlerinin güçlendirilmesi için, gerek klinik testlerde gerekse moleküler analizlerde hastaların yaşadığı bölgelerde bulunan polenlerle çalışmak gerekir.

Bu noktadan hareketle bu tez çalışmasında, Cupressaceae ailesinden Akdeniz servisi (*Cupressus sempervirens* L.) ve Sabin ardıcı (*Junipeus sabina* L.) polenlerinin alerjenitesi ve alerjenik proteinleri araştırılmıştır.

Çalışmanın ilk basamağında, tozlaşma dönemlerinde toplanan polenlerden  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  ile ekstreler hazırlanmış ve polen ekstrelerinin protein konsantrasyonları belirlenmiştir. Akdeniz servisi polen ekstresinin protein konsantrasyonu 2.13 mg/mL, Sabin ardıcı polen ekstresinin protein konsantrasyonu 2.545 mg/mL olarak belirlenmiştir. Bu verilere göre, polen ekstrelerinin protein içeriği Akdeniz servisi için %6.085, Sabin ardıcı için %7.27 olarak hesaplanmıştır.

Daha sonra lokal bitkilerden toplanan polenlerle hazırlanmış ekstraların alerjenitesi deri prik testleri (SPT) ve nazal provokasyon testleri (NPT) ile incelenmiştir. Hasta ve kontrol bireylerinin alerjik tepkileri deri prik testinde negatif kontrol (serum fizyolojik) referans alınarak oluşan kızarıklık çapına göre, nazal provokasyon testinde ise oluşan direnç ve semptom skorlarına göre değerlendirilmiştir.

SPT sonuçlarına göre Akdeniz servisi polen ekstresi uygulanmış 18 hastadan sadece 3'ünde pozitif yanıt (kızarıklık çapı  $\geq 3$  mm'den büyük) saptanmıştır. NPT'de ise 5 hasta pozitif yanıt vermiş, 4 hastada hiperreaktivite belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, SPT testiyle hastaların en az % 17'sinde Akdeniz servisi alerjisi olduğu ortaya konulmuştur. NPT sonuçları, bu oranın daha yüksek olabileceğini (en az %28, hiperreaktifler de pozitif olarak değerlendirildiğinde %50) düşündürmektedir. Akdeniz servisi alerjisinin prevalansının Türkiye dışındaki Akdeniz ülkelerinde %9-35 arasında olduğu bildirilmektedir (Cortegano ve diğ., 2004; Charpin ve diğ., 2005; Pico de Coana ve diğ., 2010). Ülkemizde yapılan klinik çalışmalarda bu oran Akdeniz Bölgesindeki hastalarda %21.2 (Guneser ve diğ., 1996), Ege Bölgesindeki hastalarda %12.5 civarında (Sin ve diğ., 2008) bulunmuştur. Buna göre, İstanbul'da yaşayan hastaların Akdeniz servisi polenlerine daha duyarlı olduğu sonucuna varılmıştır.

SPT ile Sabin ardıcı polen ekstresi uygulanan 17 hastadan 10'unda pozitif yanıt alınmıştır. Bu sayı hastaların %58'inde Sabin ardıcına karşı alerji geliştiğini göstermektedir. Ancak, NPT sonuçlarına göre 5 hasta pozitif, 5 hasta hiperreaktiftir. Dolayısıyla NPT'de bu hastalarda alerji oranı SPT'ye göre daha düşük (%29) çıkmıştır. Ancak hiperreaktif hastalar da pozitif olarak değerlendirildiğinde Sabin ardıcı alerjenitesinin oldukça yüksek (%59) olduğu sonucuna varılmıştır. Bu değer Ege Bölgesinde yaşayan hastalar için belirlenmiş oranın (%14.1) (Sin ve diğ. 2008) çok üzerindedir.

Klinik veriler, hastaların nazal provokasyon testine pozitif yanıt verme oranının deri prik testinden daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Çalışmanın son aşamasında, polen ekstraları eşit miktarda (her cepte 30  $\mu$ g) protein içerecek şekilde poliakrilamid jele yüklenmiş ve SDS-PAGE işleminin ardından

boyama (Coomassie ve gümüş boyama) ve Western işaretleme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Akdeniz servisi polen ekstresi elektroforezle ayrıştırıldığında her iki boyama yöntemiyle de molekül ağırlığı 16-77.5 kDa arasında değişen 11 bant gözlenmiştir. Sabin ardıcı polen ekstresinin elektroforezinde Coomassie boyama ile molekül ağırlığı 16-65.3 kDa arasında değişen 20 bant, gümüş boyama ile 30'a yakın ve daha belirgin bantlar elde edilmiştir. Shahali ve diğ. (2012), polenlerinin yapısı nedeniyle Akdeniz servisinden protein elde etmenin zorluğuna dikkat çekmektedir. *C. arizonica* polenleriyle yapılan bir çalışmada benzer elektroforez bulguları elde edilmiştir (Shahali ve diğ., 2007). Bu çalışmada da bant sayısının azlığı protein ekstraksiyonundaki zorluktan kaynaklanıyor olabilir. Sabin ardıcı polen ekstresi ile yapılmış elektroforez çalışmasının sonuçlarını karşılaştıracak bir veriye literatürde rastlanmamıştır.

Akdeniz servisi (*C. sempervirens*) polen ekstresi uygulanmış hasta (18 kişi) ve kontrol bireylerinin (3 kişi) serumlarıyla yürütülen Western işaretleme deneylerinde, 5 hastanın spesifik IgE'lerinin bazı polen proteinlerine bağlandığı gözlenmiştir. Seebule Plus2 Prestained marker referans alınarak ve Image Lab programı kullanılarak IgE'lerin bağlandığı proteinlerin molekül ağırlıkları belirlenmiştir. Buna göre spesifik IgE'lerin 20-68 kDa arasında olan en az 8 polen proteinine bağlandığı tespit edilmiştir. Bu proteinler potansiyel alerjen olarak kabul edilmiştir. Kontrol bireylerinde hiçbir bant gözlenmemesi, antijen-antikor bağlantılarının alerjiye bağlı olduğunu doğrulamıştır.

Akdeniz servisi ve Cupressus cinsine dahil olan diğer türlerin alerjenik proteinleri çalışılmış ve Cup s 1 (43-45 kDa) (Arilla ve diğ., 2004), Cup s 3 (34 kDa) (Togawa ve diğ., 2006), Cup a 1 (43 kDa) (Di Felice ve diğ., 1994) alerjenik proteinleri tanımlanmıştır. Bu çalışmada saptanan IgE'ye bağlanan bazı proteinlerin molekül ağırlıkları mevcut literatür bilgileriyle uyumludur. Ek olarak 21.9, 29.1, 29.7, 30.7, 52.2, 53.3, 54.7, 55.7, 57.6, 62.6 ve 68.6 kDa'luk polen proteinlerinin de IgE'ye bağlandığı gözlemlendiğinden lokal polen örneklerinin yeni alerjenik proteinler taşıyabileceği öngörülmüştür. Ancak bu hipotezin doğrulanması için, bu proteinlerin saflaştırılarak hastalara uygulanması ve alerjenitelerinin ispatlanması ve 2D-jel elektroforezi yanında MS, MALDI-TOF gibi kütle spektrometrik yöntemler ve protein

mikroçip teknolojileri gibi ileri proteomik teknikler uygulanarak söz konusu proteinlerin tanımlanması gerekmektedir.

Sabin ardıcı (*J. sabina*) polen ekstresi uygulanmış hasta (17 kişi) ve kontrol bireylerinin (3 kişi) serumlarıyla yürütülen Western işaretleme deneylerinde, 9 hastanın spesifik IgE'lerinin bazı polen proteinlerine bağlandığı gözlenmiştir. Seeblye Plus2 Pre-stained marker referans alınarak ve Image Lab programı kullanılarak IgE'lerin bağlandığı proteinlerin molekül ağırlıkları belirlenmiştir. Buna göre spesifik IgE'lerin 22-85 kDa arasında olan en az 9 polen proteinine bağlandığı tespit edilmiştir. Bu proteinler potansiyel alerjen olarak kabul edilmiştir. Kontrol bireylerinde hiçbir bant gözlenmemesi, antijen-antikor bağlantılarının alerjiye bağlı olduğunu doğrulamıştır.

Juniperus cinsine dahil olan diğer türlerin alerjenik proteinleri çalışılmış ve *J. ashei* polenlerinde Jun a 1 (43 kDa) (Midoro-Horiuti ve diğ., 1999), Jun a 2 (43 kDa) (Yokoyama ve diğ., 2000) ve Jun a 3 (30 kDa) (Midoro-Horiuti ve diğ., 2000) alerjenik proteinleri, *J. oxysedrus* polenlerinde Jun o 2 (29 kDa) (Tinghigo ve diğ., 1998) alerjenik proteini ve *J. saninoides* polenlerinde 50 kDa molekül ağırlığında Jun s 1 alerjenik proteini tanımlanmıştır (Gross ve diğ., 1978). Bu çalışmada saptanan IgE'ye bağlanan bazı proteinlerin molekül ağırlıkları mevcut literatür bilgilerine yakın değerlerdedir. Ek olarak 22.2, 27.8, 49.6, 53.7, 61.1, 63.8, 67.7, 71.7 ve 85 kDa'luk polen proteinlerinin de IgE'ye bağlandığı gözlemlendiğinden lokal polen örneklerinin yeni alerjenik proteinler taşıyabileceği öngörülmüştür. Ancak bu hipotezin de doğrulanması için, bu proteinlerin saflaştırılarak hastalara uygulanması ve alerjenitelerinin ispatlanması ve 2D-jel elektroforezi yanında MS, MALDI-TOF gibi kütle spektrometrik yöntemler ve protein mikroçip teknolojileri gibi ileri proteomik teknikler uygulanarak söz konusu proteinlerin tanımlanması gerekmektedir.

Çapraz reaktivite ("cross-reactivity") Western sonuçları değerlendirilirken dikkate alınması gereken önemli bir faktördür. Çapraz reaktivite ile ilgili bilgiler teşhis için önemlidir. Aynı cinse ve/veya farklı bir cinse ait polenler arasında çapraz reaktivite bildirilmiştir (Pham ve Baldo, 1995; Weber, 2003; Sastre ve diğ., 2004). Bazı kaynaklara göre 15, 18, 19, 20, 40-46, 60 ve 70 kDa molekül ağırlığındaki proteinler ağaçlar ve diğer bitki türleri arasındaki çapraz reaktivitede rol oynar (Heiss ve diğ., 1996; Schwietz ve diğ., 2000; Gruehn ve diğ., 2003). Akdeniz servisi (*C. sempervirens*)

alerjen proteini olan Cup s 1, Cup a 1 ve Cry j 1 ile çapraz reaktivite gösterir (Arilla ve diğ., 2004). Zeytin ve imen polenleri de Cupressacea polen bileşenleriyle çapraz reaksiyona girebilen Ole e 2, Phl p 12 (profilin) ve Phl p 7 (kalsiyum bağlayıcı protein) gibi alerjenler içermektedir (Swoboda ve diğ., 2008; Constantin ve diğ., 2009; Sastre, 2010). Polen ekstreleri uygulanmış hastalarda elde edilen farklı molekül ağırlığındaki bantlar çapraz reaktivite nedeniyle ortaya çıkmış olabilir.

Sonuç olarak, bu tezde İstanbul'da yetişen Akdeniz servisi ve Sabin ardıcı polenlerinin alerjenitesi ve alerjenik proteinleri ilk kez ortaya konulmuştur. Bulgular, her iki ağaç poleninin de İstanbul'da yaşayan alerji hastaları için önemli bir risk oluşturduğunu ve bilinen alerjenlerden farklı alerjenik proteinler içerebileceğini göstermektedir.

Bundan sonraki çalışmalarda söz konusu polenlerin yeni potansiyel alerjenlerini tanımlamak için proteomik analizler yürütülebilir; aday alerjenler rekombinant DNA teknolojisi ile klonlanabilir ve saflaştırılarak alerjeniteleri araştırılabilir. Böylece servigiller (Cupressacea) ailesindeki ağaçların yol açtığı polen alerjilerinin tanı ve tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilebilir.

**KAYNAKLAR**

- Aalberse, R.C., 2000, Structural biology of allergens, *Journal of allergy and clinical immunology*, 106:228-238.
- Aalberse, R.C. and Akkerdaas, J.H., van Ree, R., 2001, Cross-reactivity of IgE antibodies to allergens, *Allergy*, 56, 478–490.
- Aboulaich, N., Bouziane, H., El Kadiri, M. and Riadi, H., 2008, Male phenology and pollen production of *Cupressus sempervirens* in Tetouan (Morocco), *Grana*, 47, 130–138.
- Agea, E., Russano, A., Bistoni, O., Mannucci, R., Nicoletti, I., Corazzi, L., Postle, G., De Libero, A.D., Porcelli, S.A. and Spinozzi, F., 2005, Human CD1- restricted T cell recognition of lipids from pollens, *The journal of experimental medicine*, 202, 295-308.
- Ahlholm, J.U., Helander, M.L., Savolainen, J., 1998, Genetic and environmental factors affecting the allergenicity of birch (*Betula pubescens ssp. Czerepanovii* Hamet-ahiti) pollen, *Clinical and experimental allergy*, 28: 1384–1388.
- 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.
- Alisi, C., Afferni, C., Iacovacci, P., Barletta, B., Tinghino, R., Butteroni, C., Puggioni, E.M.R., Wilson, I.B.H., Federico, R., Schininà, M.E., Ariano, R., Di Felice, G. and Pini, C., 2001, Rapid isolation, characterization, and glycan analysis of Cup a 1, the major allergen of Arizona cypress (*Cupressus arizonica*) pollen, *Allergy*, 56:978-84.
- Ariano, R., Mistrello, C., Mincigrucchi, G., Bricchi, E., Iannotti, O., Frenguelli, G., Passalacqua, G. and Panzani, R.C., 2006, *In vitro* and *in vivo* biological activities of old and fresh *Cupressus arizonica* pollen, *Journal of investigational allergology and clinical immunology*, 16:177-82.
- Arilla, M.C., Ibarrola, I., Martinez, A. And Asturias, J.A., 2004, Quantification assay for the major allergen of *Cupressus sempervirens* pollen, Cups1, by sandwich ELISA, *Allergol immunopathology*, 32:319-25.
- Arnon, R. and van Regenmortel, M.H., 1992, Structural basis of antigenic specificity and design of new vaccines, *Federation of american societies for experimental biology journal*, 6, 3265–3274.

- Asturias, J.A., Ibarrola, I., Amatw, P., Tellaz, R., Maletw, A., Cistero-Bahimaz, A., Enrique, E., Malek, T. and Martinez, A., 2006, Purified allergens vs. complete extract in the diagnosis of plane tree pollen allergy, *Clinical and experimental allergy*, 36, 1505-1512.
- Ausubel, F.M. Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl K., 1989, Protein expression, *Current protocols in molecular biology*, 2, 16-4.
- Aytuğ, B., Aykut, S., Merev, N. ve Edis, G., 1974, Belgrad ormanının ve İstanbul çevresi bitkilerinin polinizasyon olayının tespiti ve değerlendirilmesi, *Türkiye bilimsel ve teknolojik araştırma kurumu yayınları*, 221(29), 1-700.
- Bacsi, A., Dharajiya, N., Choudhury, B.K., Sur, S. and Boldogh, I., 2005, Effect of pollen-mediated oxidative stress on immediate hypersensitivity reactions and late-phase inflammation in allergic conjunctivitis, *Journal of allergy and clinical immunology*, 116: 836-843.
- Barletta, B., Afferni, C., Tinghino, R., Mari, A., Di Felice, G., Pini, C., 1996, Cross reactivity between *Cupressus arizonica* and *Cupressus sempervirens* pollen extracts, *Journal of allergy and clinical immunology*, 98:797-804.
- Beggs, P.J. and Bambrick, H.J., 2005, Is the global rise of asthma an early impact of anthropogenic climate change, *Environment health prospect*, 113:915-919.
- Behrendt, H., Becker, W.M., Friedrichs, K.H., Darson, V., Tomingas, R., 1992, Interaction between aeroallergens and airborne particulate matter, *International archives of allergy and immunology*, 99:425-428.
- Behrendt, H. and Becker, W.M., 2001, Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors, *Journal current opinion in immunology*, 13, 709-715.
- Behrendt, H., Becker, W.M., Friedrich K.H. and Ring J., 1997, Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants, *International archives of allergy and immunology*, 113, 69-74.
- 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 immunology*, 124: 121-125.
- Bicakci, A. and Akyalcin, H., 2000, Analysis of airborne pollen fall in Balıkesir, Turkey, 1996-1997, *Annals of agricultural and environmental medicine*, 7, 5-10.
- Bicakci, A., 2006, Analysis of airborne pollen fall in Sakarya, Turkey, *Biologia, bratislava*, 61, 457-461.



- Bicakci, A., Altunoglu, M.K., Bilisik, A., Celenk, S., Canitez, Y., Malyer, H., and Sapan, N., 2009, Airborne pollen grains of Turkey, *Asthma allergy immunology*, 7:11-17.
- Boldogh, I., Bacsı, A., Choudhury, B.K., Dharajiya, N., Alam, R., Hazra, T.K., Mitra, S., Goldblum, R.M., Sur, S., 2005, ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation, *Journal of clinical investigation*, 115:2169–2179.
- Boral, D., Chatterjee, S. and Bhattacharya, K., 2004, The occurrence and allergising potential of airborne pollen in West Bengal, India, *Annals of agricultural and environmental medicine*, 11:45-52.
- Burney P., 1993, Evidence for an increase in atopic diseases and possible causes, *Clinical and experimental allergy*, 23: 484-492.
- Bush, R.K., 1989, Aerobiology of pollen and fungal allergens, *Journal of allergy and clinical immunology*, 84(6), 1120-1124.
- Boschetti, E., Bindschedler, L.V., Tang, C., Fasoli, E. and Righetti, P.G., 2009, Combinatorial peptide ligand libraries and plant proteomics: a winning strategy at a price, *Journal of chromatography a*, 1216:1215-22.
- Caiaffa, M.F., Macchia, L. and Tursi, A., 1988, *La pollinosi da Cupressaceae*. 3<sup>o</sup> Congress Naz Ass, Italy, *In aerobiologia* (pp. 145–154). Pavia, Italy.
- Caimmi, D., Raschetti, R., Pons, P., Dhivert-Donnadieu, H., Bousquet, P.J., Bousquet, J. and Demoly, P., 2012, Epidemiology of cypress pollen allergy in Montpellier, *Journal of investigational allergology and clinical immunology*, 22(4), 280–285.
- Calleja, M., Farrera, I., Golliot, F., Le Pape, A. and Plaisant, I., 2010, Pollen et consommation médicamenteuse: la part des Cupressaceae en Languedoc-Roussillon. Paper presented at the Pollens: Exposition et Impact Sanitaire, Nimes, *Le réseau national de surveillance aérobiologique* 4, 35–36.
- Cecchi, L., D'Amato, G., Ayres, J.G., Galan, C., Forastiere, F., Forsberg, B., Gerritsen, J., Nunes, C., Behrendt, H., Akdis, C., Dahl, R. and Annesi-Maesano, I., 2010, Projections of the effects of climate change on allergic asthma: the contribution of aerobiology, *Allergy*, 65 1073–1081.
- Celenk, S., Altunoglu, M.K., Canitez, Y., Bicakci, A., Malyer, H. and Sapan, N., 2008, Daily pollen concentration of three allergenic families in the atmosphere of Bursa (NW Turkey), 2003–2004, *Allergy*, 63, 396–397.
- Celik, A., Guvensen, A., Uysal, I. and Ozturk, M., 2005, Differences in concentrations of allergenic pollens at different heights in Denizli, Turkey, *Pakistan journal of botany*, 37(3), 519–530.

- Chakraborty, P., Gupta-Bhattacharya, S. and Chanda, S., 1996, Comparative aerobiology, allergenicity and biochemistry of three palm pollen grains in Calcutta, India, *Journal aerobiologia*, 12, 47–50.
- Charpin, D., 2000, Epidemiology of cypress allergy, *Allergy and immunology*, 32: 83-85.
- Charpin, D., Calleja, M., Lahoz, C., Pichot, C. and Waisel, Y., 2005, Allergy to cypress pollen, *Allergy*, 60:293-301.
- Charpin, D., Gouitaa, M., Dron-Gonzalvez, M., Fardeau, M. F., Massabie-Bouchat, Y.P., Hugues, B., Fabre, C., Vivinus, S., Pegliasco, H. and André, C., 2007, Immunotherapy with an aluminium hydroxide adsorbed *Juniperus ashei* foreign pollen extract in seasonal indigenous cypress pollen rhinoconjunctivitis, *International archives of allergy and immunology*, 143:83-91.
- Chichiricco, G., Spano, L., Torraca, G. and Tartarini, A., 2009, Hydration, sporoderm breaking and germination of *Cupressus arizonica* pollen, *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 11:359-68.
- Cimignoli, E., Brocucci, L., Cernetti, C., Gerli, R. and Spinozzi, F., 1992, Isolation and partial characterization of *Cupressus sempervirens* allergens, *Aerobiologia*, 8, 465–470.
- Constantin, C., Quirce, S., Poorafshar, M., Touraev, A., Niggemann, B., Mari, A., Ebner, C., Akerström, H., Heberle-Bors, E., Nystrand, M. and Valenta, R., 2009, Micro-arrayed wheat seed and grass pollen allergens for component-resolved diagnosis, *Allergy*, 64:1030-7.
- Cortegano, I., Civantos, E., Aceituno, E., del Moral, A., Lopez, E., Lombardero, M., del Pozo, V. and Lahoz, C., 2004, Cloning and expression of a major allergen from *Cupressus arizonica* pollen, Cup a 3, a PR-5 protein expressed under polluted environment, *Allergy*, 59:485-90.
- D'Amato, G., 1984, *La pollinosi in italia rilievo regionale dei principali pollini allergenici*, Napoli: Lepetit.
- D'Amato, G., Spiekma, F.Th.M., Liccardi, G., 1998, Pollen-related allergy in Europe. position paper of the European academy of allergology and clinical immunology. *Allergy*, 53:567–578.
- 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*, 62 (9), 976–990.
- D'Amato, G., 2000, Urban air pollution and plant derived respiratory allergy, *Clinical and experimental allergy*, 30: 628-636.

- D'Amato, G., Liccardi, G., D'Amato, M., and Cazzola, M., 2001, The role of outdoor air pollution and climatic changes on the rising trends in respiratory allergy, *Respiratory medicine*, 95, 606-611.
- D'Amato, G., Liccardi, G., D'Amato, M., Cazzola, M., 2002, Outdoor air pollution, climatic changes and allergic bronchial asthma, *European respiratory journal*, 20: 763-776.
- Davis, P.H., 1978, *The moving staircase: a discussion on taxonomic rank and affinity*, Royal Botanic Garden Edinburgh, 36, 325-40.
- Davis, P.H., 1988, *Flora of turkey and the east aegean islands v: 1-9*. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Demoly, P., Persi, L., Dhivert, H., Delire, M. and Bousquet, J., 2002, Immunotherapy with keyhole limpet hemocyanin-conjugated decapeptide vaccine in cypress pollen allergy, *Clinical and experimental allergy*, 32:1071-6.
- Devalia, J.L., Rusznak, C. and Davies, R.J., 1998, Allergen/irritant interaction its role in sensitization and allergic disease, *Allergy*, 53: 335-345.
- Di Felice, G., Caiaffa M. F., Bariletto G., Affernia, C., Di Paolab, R., Maria, A. and Pinia, C., 1994, Allergens of Arizona cypress (*Cupressus arizonica*) pollen: characterization of the pollen extract and identification of the allergenic components, *Journal of allergy and clinical immunology*, 94:547-55.
- Di Felice, G., Barletta, B., Tinghino, R. and Pini, C., 2001, Cupressaceae pollinosis: identification, purification and cloning of relevant allergens, *International archives of allergy and immunology*, 125:280-9.
- Diaz de la Guardia, C., Alba, F., de Linares, C., Nieto-Lugilde, D. and Lopez Caballero, J., 2006, Aerobiological and allergenic analysis of Cupressaceae pollen in Granada (Southern Spain), *Journal of investigational allergology and clinical immunology*, 16(1), 24-33.
- 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*, 21(1), 1-12.
- Driessen, M.N.B., Derksen, J.W.M., Spieksma, F.T.M. and Roetman, E., 1988, *Pollen atlas Van DeNederlandse Atmosfeer*, Leusden: Fisons.
- Durham, S.R., Church, M.K., 2001, *Principles of allergy diagnosis*, In: S.T. Holgate, Church, M.K. and Lichtenstein, L.M. (eds), *Allergy*, 2<sup>nd</sup> ed. Mosby, London, pp. 3-16.

- Dykewicz, M.S., Hamilos, D.L., 2010, Rhinitis and sinusitis, *Journal of allergy and clinical immunology*, 125:103-15.
- Emberlin, J., 1998, The effect of air pollution on allergic pollen, *European respiratory review*, 53, 164–167.
- Fiorina, A., Scordamaglia, A., Guerra, L., Canonica, G.W., Passalacqua, G., 2002, Prevalence of allergy to cypress, *Allergy*, 57;861-2.
- Fitter, A.H., Fitter, R.S., 2002, Rapid changes in flowering time in British plants, *Science*, 296:1689–1691.
- Ford, S.A., Baldo, B.A., Panzani, R. and Bass, D., 1991, Cypress (*Cupressus sempervirens*) pollen allergens: Identification by protein blotting and improved detection of specific IgE antibodies, *International archives of allergy and applied immunology*, 95:178-83.
- Fuertes-Rodriguez, C.R., González-Parrado, Z., Vega-Maray, A.M., Valencia-Barrera, R.M. and Fernández-González, D., 2007, Effect of air temperature on forecasting the start of Cupressaceae pollen type in Ponferrada (León, Spain), *Annals of agricultural and environmental medicine*, 14:237-42.
- Gadermaier, G., Dedic, A., Obermeyer, G., Frank, S., Himly, M. and Ferreira, F., 2004, Biology of weed pollen allergens, *Current allergy and asthma reports*, 4:391-400.
- García-Mozo, H., Galán, C., Jato, V., Belmonte, J., de la Guardia, C., Fernández, D., Gutiérrez, M., Aria, J.M., Roure, J.M., Ruiz, L., Trigo, M.M., Domínguez-Vilches, E., 2006, Quercus pollen season dynamics in the Iberian peninsula: response to meteorological parameters and possible consequences of climate change, *Annals of agricultural and environmental medicine*, 13:209–224.
- Gell, P.G.H. and Coombs R.R.A., 1968, Clinical aspects of immunology, 2nd ed. Oxford: Blackwell, 575-596.
- Ghanati, F. and Majd, A., 1995, The effect of air pollution on the allergenicity of *Pinus eldarica* pollen, *Grains*, 34, 208–221.
- Gielen, M.H., Van der Zee, S.C., Van Eijenen, J.H., Van Steen, C.J. and Brunekreef, B., 1997, Acute effects of summer air pollution on respiratory health of asthmatic children, *American journal respiratory critical care medicine abbreviation*, 155: 2105-2108.
- González-Buitrago, J.M., Ferreira, L., Isidoro-García, M., Sanz, C., Lorente, F. and Dávila, I., 2007, Proteomic approaches for identifying new allergens and diagnosing allergic diseases, *Clinica chimica acta*, 385 21–27.

- Gross, G.N., Zimburean, J.M. and Capra, J.D., 1978, Isolation and partial characterization of the allergen in mountain cedar pollen, *Scandinavian journal of immunology*, 8(5):437-41.
- Gruehn, S., Suphioglu, C., O'Heir, R.E. and Volkmann, D., 2003. Molecular cloning and characterization of Hazel Pollen protein (70 kD) as a luminal binding protein (BiP): a novel cross-reactive plant allergen, *International archives of allergy and immunology*, 131, 91–100.
- Gunawan, H., Takai, T., Kamijo, S., Wang, X. L., Ikeda, S., Okumura, K., and Ogawa, H., 2008a, Characterization of proteases, proteins, and eicosanoid-like substances in soluble extracts from allergenic pollen grains, *International archives of allergy and immunology*, 147: 276–288.
- Gunawan, H., Takai, T., Ikeda, S., Okumura, K., and Ogawa, H., 2008b, Protease activity of allergenic pollen of cedar, cypress, juniper, birch and ragweed, *Allergology international*, 57: 83–91.
- Guneser, S., Atici, A., Cengizler, I. and Alparslan, N., 1996, Inhalant allergens: as a cause of respiratory allergy in east Mediterranean area, Turkey, *Allergologia and immunopathologia*, 24:116-9.
- Guvensen, A., Uysal, I., Celik, A. and Ozturk, M., 2005, Analysis of airborne pollen fall in Canakkale, Turkey, *Pakistan journal of botany*, 37(3), 507–518.
- Hamilton, R.G. and Adkinson F.N., 2004, In vitro assays for the diagnosis of IgE-mediated disorders, *Journal of allergy and clinical immunology*, 114:213-25.
- Heiss, S., Fischer, S., Muller, W.D., Weber, B., Hirschwehr, R., Spitzauer, S., Kraft, D. and Valenta, R., 1996, Identification of a 60 kD cross-reactive allergen in pollen and plant derived food, *Journal of allergy and clinical immunology*, 98, 938–947.
- Heppt, W., Dinh, Q.T., Cryer, A., Zweng, M., Noga, O., Peiser, C., Melvan, M., Witt, C., Ficher, A. and Gronberg, D.A., 2004, Phenotypic alteration of neuropeptide-containing nerve fibres in seasonal intermittent allergic rhinitis, *Clinical and experimental allergy*, 34:1105-10.
- Heukeshoven, J. and Dernick, R., 1985, Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining, *Electrophoresis*, 103–112.
- Hidalgo, P.J., Galán, C. and Dom'inguez, E., 1999, Pollen production of the genus Cupressus, *Grana*, 38, 296–300.
- Hjelmeroos, M., Schumacker, M. and van Hage-Hamster, V., 1994., Variations in birch pollen (*Betula verrucosa*) allergens between different trees in view of both the provenance and air pollution. Proceedings of the 5th International Conference on Aerobiology, Bangalore, India.

- Hollins, P.D., Kettlewell, P.S., Atkinson, M.D., Stephenson, D.B., Corden, J.M., Millington, W.M. and Mullins, J., 2004, Relationships between airborne fungal spore concentration of *Cladosporium* and the summer climate at two sites in Britain, *International journal of biometeorology*, 48:137–141.
- Hrabina, M., Dumur, J.P., Sicard, H., Viatte, A. and André, C., 2003, Diagnosis of cypress pollen allergy: *in vivo* and *in vitro* standardization of a *Juniperus ashei* pollen extract, *Allergy*, 58:808-13.
- Ishizaka, K. and Ishizaka, T., 1967, Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity, *The journal of immunology*, 99:1187-98.
- Johansson, S.G.O., Hourihane, J.O.B., Bousquet, J., Bruijnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., Kowalski, M.L., Mygind, N., Ring, J., van Cauwenberge, P., van Hage-Hamsten, M. and Wuthrich, B., 2001, A revised nomenclature for allergy An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force, *Allergy*, 56: 813–824.
- Jones, N.S., Smith, P.A., Carney, A. S. and Davis, A., 1998. The prevalence of allergic rhinitis and nasal symptoms in Nottingham, *Clinical otolaryngology*, 23:547–554.
- Kamijo, S., Takai, T., Kuhara, T., Tokura, T., Ushio, H., Ota, M., Harada, N., Ogawa H. and Okumura, K., 2009, Cupressaceae pollen grains modulate dendritic cell response and exhibit IgE-inducing adjuvant activity *in vivo*, *The journal of immunology*, 183:6087-6094.
- Kaneko, Y., Motohashi, Y., Nakamura, H., Endo, T. and Eboshida, A., 2005, Increasing prevalence of Japanese cedar pollinosis: a meta-regression analysis, *International archives of allergy and immunology*, 136:365-71.
- Kato, T., Takai, T., Fujimura, T., Matsuoka, H., Ogawa, T., Murayama, K., Ishii, A., Ikeda, S., Okumura, K., and Ogawa, H., 2009, Mite serine protease activates protease-activated receptor-2 and induces cytokine release in human keratinocytes, *Allergy*, 64: 1366–1374.
- Kawamoto, S., Fujimura, T., Nishida, M., Tanaka, T., Aki, T., Masubuchi, M., Hayashi, T., Suziki, O., Shigeta, S. and Ono, K., 2002, Molecular cloning and characterization of a new Japanese cedar pollen allergen homologous to plant isoflavone reductase family, *Clinical and experimental allergy*, 32, 1064–1070.
- Knox, R.B., 1979, Pollen and allergy, London, *Edward arnold limited*, 60 p.
- Knox R.B., 1984, The pollen grain, *Embryology of angiosperms*. Springer, Berlin, pp. 197–271.
- Knox, R.B. and Heslop-Harrison, J., 1970, Pollen-wall proteins: Localization and enzymic activity, *Journal of cell science*, 6, 1–27.

- King, T.P., Hofmann, D.I., Loewenstein, H., Marsh, D.G., Platts-Mills, T.A.E. and Thomas W., 1994, Allergen nomenclature, WHO/IUIS Allergen nomenclature subcommittee, *International archives of allergy and immunology*, 105:224-33.
- Koenig, J.Q., 1999, Air pollution and asthma, *Journal of allergy and clinical immunology*, 104: 717-722.
- Lacovacci, P., Afferni, C. and Barletta, B., 1998, *Juniperus oxycedrus*: a new allergenic pollen from the Cupressaceae family, *Journal of allergy and clinical immunology*, 101: 755–761.
- Lacovacci, P., Pini, C., Afferni C, Barletta, B., Tinghino, R., Schinina, E., Federico, R., Mari, A. and Di Felice, G., 2001, A monoclonal antibody specific for a carbohydrate epitope recognizes an IgE-binding determinant shared by taxonomically unrelated allergenic pollens, *Clinical and experimental allergy*, 31(3): 458-465.
- Longhi, S., Cristofori, A., Gatto, P., Cristofolini, F., Grando, M.S. and Gottardini, E., 2009, Biomolecular identification of allergenic pollen: A new perspective for aerobiological monitoring, *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 103, 508–514.
- Lorenzoni-Chiesura, F., Giorato, M. and Marcer, G., 2000, Allergy to pollen of urban cultivated plants, *Aerobiologia*, 16: 313–316.
- Majd, A. and Kiabi, S., 1997, The effect of Tehran's polluted atmosphere on ultrastructural changes and allergenicity of *Cupressus arizonica* pollen grains, *Aerobiologia*, 407–417.
- Mandrioli, P., De Nuntiis, P., Ariatti, A. and Magnani, R., 2000, Cypress in Italy: landscape and pollen monitoring, *Allergy and immunology (Paris)*, 32, 116, 119–121.
- Mariani, V., Gilles, S., Jakob, T., Thiel, M., Mueller, M.J., Ring, J., Behrendt, H. and Traidl-Hoffmann, C., 2007, Immunomodulatory mediators from pollen enhance the migratory capacity of dendritic cells and license them for Th2 attraction, *The journal of immunology*, 178: 7623–7631.
- Mazzitelli, A. and Grilli Caiola, M., 2003. Cross-recognition of Fagaceae pollen allergen by IgE raised against allergen of *Cupressus arizonica* pollen, *Acta biologica cracoviensia series botanica*, 45(1), 115–118.
- Midoro-Horiuti, T., Goldblum, R.M., Kurosky, A., Wood, T.G., Schein, C.H. and Brooks, E.G., 1999, Molecular cloning of the mountain cedar (*Juniperus ashei*) pollen major allergen, Jun a 1, *Journal of allergy and clinical immunology*, 104:613–617.

- Midoro-Horiuti, T., 1992, Evaluation of allergenicity of the extract of Japanese juniper pollen reacting to sera from asthmatic children—by the methods of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblotting, *Japanese journal of allergology*, 41: 1459–1465.
- Midoro-Horiuti, T., Goldblum R.M., Kurosky, A., Wood, T.G. and Brooks, E.G., 2000, Variable expression of pathogenesis-related protein allergen in mountain cedar (*Juniperus ashei*) pollen, *Journal of immunology*, 164:2188–2192.
- Mistrello, G., Roncarolo, D., Zanoni, D., Zanotta, S., Amato, S., Falagiani, P. and Ariano, R., 2002, Allergenic relevance of *Cupressus arizonica* pollen extract and biological characterization of the allergoid, *International archives of allergy and immunology*, 129:296-304.
- Molina, R.T., Rodriguez, A.M., Palacios, I.S. and Lopez, F.G., 1996, Pollen production in anemophilous trees, *Grana*, 35, 38–46.
- Mothes, N., Horak, F. and Valenta R., 2004, Transition from a botanical to a molecular classification in tree pollen allergy: implications for diagnosis and therapy, *International archives of allergy and immunology*, 135:357-73.
- Nardi, G., Canziani, A., Striani, P., Santini, N., Coccia, C., Seghetti, L. and Kranic, R., 1996, Cupressaceae pollen in the atmosphere of Ascoli Piceno (Central Italy) and sensitization of allergic subjects, *Aerobiologia*, 12, 269–271.
- Nilsson, S., Proglowski, J. and Nilsson, I., 1977, *Atlas of airborne pollen grains and spores in northern Europe*, Stockholm: Natur och Kultur.
- Nilsson, S. and Persson, S., 1981, Tree pollen spectra in the Stockholm region (Sweden), 1973–1980, *Grana*, 20, 179–182.
- Ordman D., 1945, Cypress pollinosis in South Africa. A study of seasonal hay-fever and allergic conjunctivitis occurring in the winter-spring period, *South african medical journal*, 19:142-6.
- Öneş, Ü., Sapan, N., Malyer, H., Güler, N., Bıçakçı, A., Tamay, Z. and Çelenk, S., 2008, İstanbul ilinin alerjik polen takvimi, *Türkiye bilimsel ve teknolojik araştırma kurumu*, 102S021.
- Panzani, R., 1962, L'allergie respiratoire aux pollens de conifères, *Revue française d'allergologie*, 3:164-8.
- Panzani, R., Zerboni, R. and Ariano, R., 1991, Allergenic significance of Cupressaceae pollen in some parts of the Mediterranean area. Allergenic pollen and pollinosis in Europe, pp. 81–84, *Blackwell scientific publications, Oxford*.
- Paris-Kohler, A., Demoly, P., Persi, L., Lebel, B., Bousquet, J. and Arnoux, B., 2000, *In vitro* diagnosis of cypress pollen allergy by using cytofluorimetric analysis of basophils (Basotest), *Journal of allergy and clinical immunology*, 105(2), 339–345.



- Pauli G., 2000, Evolution in the understanding of cross-reactivities of respiratory allergens: the role of recombinant allergens, *International archives of allergy and immunology*, 123:183–95.
- Perez-Badia, R., Rapp, A., Morales, C., Sardinero, S., Galán, C. and Mozo, G.H., 2010, Pollen spectrum and risk of pollen allergy in central Spain, *Annals of agricultural and environmental medicine*, 17:139-51.
- Pham, N.H. and Baldo, B.A., 1995, Allergenic relationship between taxonomically diverse pollens, *Clinical and experimental allergy*, 25, 599–606.
- Pico de Coana, Y., Parody, N., Fuertes, M.A., Carnes, J., Roncarolo, D., Ariano, R., Sastre, J., Mistrello, G. and Alonso, C., 2010, Molecular cloning and characterization of Cup a 4, a new allergen from *Cupressus arizonica*, *Biochemical and biophysical research communications*, 401(3), 451-457.
- Platts-Mills, T., Mueller, G. and Wheatley, L., 1998, Future directions for allergen immunotherapy, *Journal of allergy and clinical immunology*, 102:335–343.
- Platts-Mills, T.A., 2005, Asthma severity and prevalence: an ongoing interaction between exposure, hygiene, and lifestyle, *Public library of science medicine*, 2(2), e34.
- Plotz, S. G., Traidl-Hoffmann, C., Feussner, I., Kasche, A., Feser, A., Ring, J., Jakob, T., and Behrendt, H., 2004, Chemotaxis and activation of human peripheral blood eosinophils induced by pollen-associated lipid mediators, *Journal of allergy and clinical immunology*, 113: 1152–1160.
- Radauer, C. and Breiteneder, H., 2006, Pollen allergens are restricted to few protein families and show distinct patterns of species distribution, *Journal of allergy and clinical immunology*, 117:141-7.
- Ramirez, D.A., 1984, The natural history of mountain cedar pollinosis, *Journal of allergy and clinical immunology*, 73:88– 93.
- Ring, J., Przybilla, B., Ruzicka, T., 2006, Atopy: Condition, Disease, or Syndrome?, *Handbook of Atopic Eczema*, 2th ed. Springer, Germany, ISBN 3-540-23133-1
- Rokade, S.S., Tidke, J.A. and Chikhale, N.J., 2010, In-silico characterization of pollen-specific protein Bn m1 from *Arabidopsis thaliana* L., *International journal of genomics and proteomics*, 1(1), 1–8.
- Ruffin, J., Williams, D., Banerjee, U., and Pinnix, K., 1983, The effect of some environmental gaseous pollutants on pollen wall proteins of certain airborne pollen grains, *Grana*, 22, 171–175.
- Runswick, S., Mitchell, T., Davies, P., Robinson, C. and Garrod, D.R., 2007, Pollen proteolytic enzymes degrade tight junctions, *Respirology*, 12:834–842.

- Sakaguchi, M., Inouye, S., Taniai, M., Ando, S., Usui, M. and Matuhasi, T., 1990, Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen, *Allergy*, 45:309–312.
- Samolinski, B., Rapiejko, P., Arcimowicz, M. and Zawisza, E., 1996, Comparison of cumulated pollen count and frequency of positive skin test reactions to pollen allergens in population of Warsaw, Poland, *Annals of agricultural and environmental medicine*, 3, 183–187.
- Sastre, J., Lluch-Bernal, M., Bustillo, A.M., Carnes, J., Maranon, F., Casanovas, M. and Fernandez-Caldas, E., 2004, Allergenicity and cross-reactivity of Russian olive pollen (*Eleagnus angustifolia*), *Allergy*, 59, 1181–1186.
- Sastre J., 2010, Molecular diagnosis in allergy, *Clinical and experimental allergy*, 40:1442-60.
- Seto, T., Takai, T., Ebihara, N., Matsuoka, H., Wang, X.L., Ishii, A., Ogawa, H., Murakami, A. and Okumura, K., 2009, SLPI prevents cytokine release in mite protease-exposed conjunctival epithelial cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 379: 681–685.
- Scala, E., Alessandri, C., Bernardi, M. L., Ferrara, R., Palazzo, P., Pomponi, D., Quarantino, D., Rasi, C., Zaffiro, A., Zennaro, D. and Mari, A., 2010, Cross-sectional survey on immunoglobulin E reactivity in 23 077 subjects using an allergenic molecule-based microarray detection system, *Clinical and experimental allergy*, 40, 911–921.
- Schwietz, L.A., Goetz, D.W., Whisman, B.A. and Reid, M.J., 2000, Cross-reactivity among conifer pollens, *Annals of allergy, asthma and immunology*, 84, 87–93.
- Shahali, Y., Majd, A., Pourpak, Z., Tajadod, G., Haftlang, M. and Moin, M., 2007, Comparative study of the pollen protein contents in two major varieties of *Cupressus arizonica* planted in Tehran, *Iran journal allergy asthma immunol*, 6(3): 123-127.
- Shahali, Y., Pourpak, Z., Moin, M., Mari, A. and Majd, A., 2009, Instability of the structure and allergenic protein content in Arizona cypress pollen, *Allergy*, 64:1773-9.
- Shahali, Y., Sutra, J.P., Fasoli, E., D'Amato, A., Righetti, P.G., Futamura, N., Boschetti, E., Sénéchal, H. and Poncet, P., 2012, Allergomic study of cypress pollen via combinatorial peptide ligand libraries, *Journal of proteomics*, 77, 101–110.
- Shahali, Y., Sutra, J.P., Peltre, G., Charpin, D., Sénéchal, H. and Poncet, P., 2010, IgE reactivity to common cypress (*C. sempervirens*) pollen, extracts: evidence for novel allergens, *World allergy organization journal*, 3:229-34.
- Singh, A.B., Kumar, P., 2003, Aeroallergens in clinical practice of allergy in India, an overview, *Annals of agricultural and environmental medicine*, 10, 131–136.

- Sin, A.B., Pinar, N.M., Misirligil, Z., Ceter, T., Yildiz A. and Alan, S., 2007, Polen Alerjisi, *Türkiye Alerjik Bitkilerine Genel Bir Bakış*, Engin Press, Ankara.
- Sin, A.Z., Ersoy, R., Gulbahar, O., Ardeniz, O., Gokmen, N.M. and Kokuludag, A., 2008, Prevalence of cypress pollen sensitization and its clinical importance in Izmir, Turkey, with cypress allergy assessed by nasal provocation, *Journal of investigational allergology and clinical immunology*, 18(1), 46–51.
- Singh, M.B., Hough, T., Theerakulpisut, P., Avjioglu, A., Davies, S., Smith, P.M., Taylor, P., Simpson, R.J., Ward, L.D., McCluskey, J., Puy, R. and Knox, R.B., 1991, Isolation of cDNA encoding a newly identified major allergenic protein of rye-grass pollen: Intracellular targeting to the amyloplast, *Proceedings of the national academy of sciences*, 88, 1384–1388.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G. T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Frovenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C., 1985, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical biochemistry*, 19, 76-85.
- Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L., 2007, Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, 1978 0521 88009-1.
- Spieksma, F.T.M., Kramps, J.A. and van der Linden, A.C., 1990, Evidence of grasspollen allergenic activity in the smaller micronic atmospheric aerosol fraction, *Clinical and experimental immunology*, 20:273-280.
- Spieksma, F.T.M., 1991, Regional European pollen calendars. In: D'Amato G, Spieksma, F.T.M, Bonini S editors, Allergenic pollen and pollinosis in Europe. Oxford: Blackwell Sci. Publ., 49–65.
- Stix, E., 1981, *Pollenkalender. Regionale and jahreszeitliche verbreitung von pollen*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Stewart, G.A. and Holt, P.G., 1985, Submicronic airborne allergens, *The Medical Journal of Australia*, 143(9), 426.
- Suphioglu, C., Singh, M.B., Taylor, P. and Knox, R.B., 1992, Mechanism of grass-pollen in induced asthma, *Lancet*, 339: 569–572.
- Swoboda, I., Twaroch, T., Valenta, R. and Grote, M., 2008, Tree pollen allergens, *Journal of allergy and clinical immunology*, 21:87-105.

- Taniai, M., Ando, S., Usui, M., Kurimoto, M., Sakaguchi, M., Inouye, S. and Matuhasi, S., 1988, N-terminal amino acid sequence of a major allergen of Japanese cedar pollen (Cry j I), *Federation of european biochemical societies letters*, 239:329–332.
- Tarkan, Ö., Sürmelioglu, Ö. ve Tuncer, Ü., 2009, Alerjik rinitte güncel tanı ve tedavi, *Çukurova üniversitesi tıp fakültesi kulak, burunve boğaz hastalıkları anabilim dalı arşiv*, 15, 156-170.
- Tinghino, R., Barletta, B., Palumbo, S., Afferni, C., Iacovacci, P., Mari, A., Di Felice, G. and Pini, C., 1998, Molecular characterization of a cross-reactive Juniperus oxycedrus pollen allergen, Jun o 2: a novel calcium-binding allergen, *Journal of allergy and clinical immunology*, 101(6 Pt 1):772-7.
- Togawa, A., Panzani, R.C., Garza, M.A., Kishikawa, R., Goldblum, R.M. and Midoro-Horiuti, T., 2006, Identification of Italian cypress (*Cupressus sempervirens*) pollen allergen Cup s 3 using homology and cross-reactivity, *Annals of allergy, asthma and immunology*, 97:336-42.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J., 1979, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proceedings of the national academy of sciences*, 76(9), 4350-4354.
- Traidl-Hoffmann, C., Kasche, A., Jakob, T., Huger, M., Plotz, S., Feussner, I., Ring, J. and Behrendt, H., 2002, Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes, *Journal of allergy and clinical immunology*, 109: 831–838.
- Traidl-Hoffmann, C., Mariani, V., Hochrein, H., Karg, K., Wagner, H., Ring, J., Mueller, M.J., Jakob, T. and Behrendt, H., 2005, Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization, *The journal of experimental medicine*, 201: 627–636.
- Ventura, M.T, Gelardi, M., Di Gioia, R., Buquicchio, R., Accettura, G., Tummolo, R. A. and et al., 2007, Statistical evaluation and parameters of rhinosinosis in patients sensitized to cypress, *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 21:41-8.
- von Pirquet, C., 1906, Allergie, *Münchener medizinische Wochenschrift*, 53, 1457-1458.
- Vrtala, S., Grote, M., Duchene, M., van Ree, R., Kraft, D., Scheiner, O. and 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, 160–169.

- Waisel, Y., Ganor, E., Glikman, M., Epstein, V. And Brenner, S., 1997, Seasonal distribution of airborne pollen in the Coastal Plain of Israel, *Aerobiologia*, 13: 127-134.
- Walker, J.M., 2002, The Protein Protocols Handbook, Second edition, Humana press.
- Wallace, D.V., Dykewicz, M.S., Bernstein, D.I., Bernstein, I.L., Blessing-Moore, J., Cox, L., Khan, D.A., Lang, D.M., Nicklas, A.R., Oppenheimer, J., Portnoy, J.M., Randolph, C.C., Schuller, D., Spector, S.L. and Tilles, S.A., 2008, The Joint Force on Practice Parameters, representing the AAAAI, ACAAI, JCAAI, The diagnosis and management of rhinitis: An updated practiceparameter, *Journal of allergy and clinical immunology*, 122:S1-84.
- Wang, X.L., Takai, T., Kamijo, S., Gunawan, H., Ogawa, H. and Okumura, K., 2009, NADPH oxidase activity in allergenic pollen grains of defferent species, *Biochemical and biophysical research communications*, 387: 430–434.
- Wayne, P., Foster, S., Connolly, J., Bazzaz, F. and Epstein, P., 2002, Production of allergenic pollen by ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) is increased in CO<sub>2</sub>-enriched atmospheres, *Annals of allergy, asthma and immunology*, 88:279–282.
- Weber, R.W., 2003, Patterns of pollen cross allergenicity, *Journal of allergy and clinical immunology*, 112, 229–239.
- Weerd, N.A., Bhalla, P.L. and Singh, M.B., 2002, Aeroallergens and pollinosis: molecular and immunological characteristics of cloned pollen allergens, *Aerobiologia* 18: 87–106.
- Wheeler, A.W. and Woroniecki, S. R., 2004, Allergy vaccines: new approaches to an old concept, *Expert opinion on biological therapy*, 4:1473-81.
- Williams, R. 2005, Climate change blamed for rise in hay fever, *Nature*, 434(7037), 1059-1059.
- Williams, P., Sewell, W.A.C., Bunn, C., Pumphrey, R., Read, G. and Jolles, S., 2008, Clinical Immunology Review Series: An approach to the use of the immunology laboratory in the diagnosis of clinical allergy, *Clinical and experimental immunology*, 153: 10–18.
- Wilson, A.F., Novey, H.S., Berke, R.A. and Surprenant, E.L., 1973, Deposition of inhaled pollen and pollen extract in human airways, *The new england journal of medicine*, 288(20), 1056.
- Yaltrık, F., 1993, Dendroloji I, Gymnospermae (Açık Tohumlular), 2. Baskı. İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi Yayınları, *İstanbul üniversitesi yayını*, 3443.
- Yaltrık, F., Efe, A. ve Uzun, A., 1997, Tarih Boyunca İstanbul'un park, bahçe ve koruları, egzotik, ağaç ve çalıları, *İstanbul asfalt fabrikaları yayını*, 4, 1–14.

Yasueda, H., Yui, Y., Shimizu, T. and Shida, T., 1983, Isolation and partial characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen, *Journal of allergy and clinical immunology*, 71:77–86.

Yokoyama, M., Miyahara, M., Shimizu, K., Kino, K. and Tsuno, H., 2000, Purification, identification, and cDNA cloning of Jun a 2, the second major allergen of mountain cedar pollen, *Biochemical and biophysical research communications*, 18;275(1):195-202.

Ziska, L.H., Gebhard, D.E., Frenz, D.A., Faulkner, S., Singer, B.D. and Straka, J.G., 2003, Cities as harbingers of climate change: common ragweed, urbanization, and public health, *Journal of allergy and clinical immunology*, 111:290–295.




<http://www.wipo.int/pctdb/en/>, Ziyaret tarihi 10/01/2014 saat 13:25.

<http://isaac.auckland.ac.nz/>, Ziyaret tarihi 10/01/2014 saat 11:30.

<http://www.aaaai.org/nab>, Ziyaret tarihi 12/01/2014 saat, 20:00.

<http://www.allergen.org>, Ziyaret tarihi 12/01/2014, saat, 14:00.

**EKLER****Ek 1. Etik kurul onay belgesi.**

	<p>T.C. İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU</p>	
Sayı : 722		Tarih : 20.06.2013
Konu : Prof.Dr.Nazlı ARDA		
<b>İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA</b>		
<b>İlgi :İ.Ü. Fen Fakültesinin 31/05/2013 gün ve 3307 sayılı yazısı</b>		
<p>Sorumlu araştırmacılığını İ.Ü. Fen Fakültesi Öğretim Üyesi Prof.Dr.Nazlı ARDA'nın üstlendiği ve Yüksek Lisans Öğrencisi Şahin TAŞ'ın yürüteceği 2013/692 dosya numaralı "İstanbul'daki Akdeniz Servisi (Cupressus sempervirens L.) ve Sabin Ardıcı (Juniperus sabina L.) Polenlerinin Alerjenik Proteinleri" başlıklı tez çalışması kurulumuzun 07/06/2013 gün ve 11 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.</p>		
<p>Kararın İ.Ü. Fen Fakültesi Öğretim Üyesi Prof.Dr.Nazlı ARDA'ya ulaştırılması için gereğini arz ederim.</p>		
		
<p>Prof.Dr. A. Yagiz ÜRESİN İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı</p>		
<p>Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu</p>		

## Ek 2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

Bu form, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans öğrencisi, Şahin Taş tarafından hazırlanan “İstanbul’daki Akdeniz Servisi (*Cupressus sempervirens* L.) ve Sabin Ardıcı (*Juniperus sabina* L.) Polenlerinin Alerjenik Proteinleri” konulu tez çalışması ile ilgilidir.

Alerjik hastalıklara neden olan en önemli aeroalerjen grubunu polenler oluşturmaktadır. Ağaç ve ayır polenleri çok miktarda üretilmektedir ve atopik hastalarda alerjik duyarlılığın artmasına neden olmaktadır. Polenler çok sayıda alerjik protein içermektedir ve polenlerin yapısı, içeriği coğrafik bölge ve iklimden etkilenmektedir. Hastanın yaşadığı bölgedeki bitkilerin polen içeriğindeki proteinlerin kimyasal yapısının ve alerjenik özelliklerinin aydınlatılması polen alerjisinin tanı ve tedavisinde önem taşımaktadır. Bu noktadan hareket ederek İstanbul’da yaygın olarak bulunan Akdeniz servisi (*Cupressus sempervirens* L.) ve Sabin ardıcı (*Juniperus sabina* L.) polenlerinin protein içerikleri ve alerjeniteleri araştırılacaktır.

Proje kapsamında Akdeniz servisi (*Cupressus sempervirens* L.) ve Sabin ardıcı (*Juniperus sabina* L.) polen örneklerinden elde edilen toz halindeki proteinler İstanbul Tıp Fakültesi,İç Hastalıkları Anabilim Dalı/Alerji BD’da hasta/kontrol gruplarında deri testleri, nazal provokasyon testleri ve rinomanometri ölçümlerini yapılacaktır. Hasta ve kontrol gruplarından alınan kan serum rnekleri, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’nde, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi(SDS-PAGE) ile ayrılıp Western blotlama yöntemi ile PVDF membrana aktarılmış polen proteinleri ile muamele edilerek olası alerjenik proteinler araştırılacaktır.

Size bu ağaçlardan toplanarak uygun yöntemlerle ekstre haline getirilen bazı polen türleri ile deri testi uygulanarak ve bu testlerin sonuçları bu polenlerin alerjenitesi hakkında değerli bilgiler verecektir. Bu testler sizin için diğer standart ekstreler ile yapılan testlere kıyasla ekstra bir yan etki riski taşımamaktadır.

Ayrıca, sizlerden yapılan işlemler nedeniyle ücret alınmayacak ve ödeme yapılmayacaktır. Çalışmaya katılmayı kabul etmezseniz veya ayrılmak isterseniz bu durum olağan tıbbi bakımlarınızı etkilemeyecektir.



Ayrıca test öncesi ve sonrası tüm sorunlarınızda Dr Aslı Gelincik'i 0212 4142000-32458 nolu telefondan arayabilirsiniz. Araştırmanın herhangi bir aşamasında çalışmayı terk edebilirsiniz.

Tüm yukarıdaki bilgiler tarafıma Dr. Aslı Gelincik tarafından anlatıldı.

Şahsıma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Alerji Bilim Dalı laboratuvarında yukarıda adı geçen tüm ilaçlı-ilaçsız tetkik yöntemlerinin hepsinin yapılmasını ve her türlü sonucunu kabul ediyorum.

#### Gönüllü Onay Formu

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

#### Gönüllünün

Adı-Soyadı,..... Tarih:.....  
Adresi: ..... Telefon no:.....  
İmzası.....:

#### Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin

Adı-Soyadı:..... Tarih:.....  
Adresi: ..... Telefon no:.....  
İmzası.....:

Doktor Adı Soyadı: .....  
İç Hastalıkları AD/Alerji BD

İmza:  
Tarih:

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Şahin TAŞ
Uyruğu	TC
Doğum tarihi, Yeri	1987, Tokat
E-mail	mbgsahintas@gmail.com

### Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	2015
Lisans	Ankara Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2010
Lise	Mehmet Akif Ersoy Lisesi	2006