

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***SESAMUM İNDİCUM L. (SUSAM) X PAPAVER SOMNİFERUM
L. (HAŞHAŞ) ARASINDAKİ ÇAPRAZ REAKSİYONLARIN
WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE GÖSTERİLMESİ***

Damla YILDIZ

**Alerjik Hastalıkların Moleküler ve İmmünolojik Temelleri Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2021

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SESAMUM İNDİCUM L. (SUSAM) X PAPAVER SOMNİFERUM
L. (HAŞHAŞ) ARASINDAKİ ÇAPRAZ REAKSİYONLARIN
WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE GÖSTERİLMESİ

Damla YILDIZ

Alerjik Hastalıkların Moleküler ve İmmünolojik Temelleri Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Bülent E. ŞEKEREL

ANKARA
2021

ONAY SAYFASI

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
SESAMUM İNDİCUM L. (SUSAM) X PAPAVER SOMNİFERUM L. (HAŞHAŞ)
ARASINDAKİ ÇAPRAZ REAKSİYONLARIN WESTERN BLOT YÖNTEMİ İLE
GÖSTERİLMESİ
Öğrenci: Damla YILDIZ
Danışman: Prof. Dr. Bülent E. ŞEKEREL

Bu tez çalışması 02.02.2021 tarihinde jürimiz tarafından "Alerjik Hastalıkların Moleküler ve İmmünolojik Temelleri Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Özge UYSAL SOYER*
(Hacettepe Üniversitesi)
Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Bülent E. ŞEKEREL*
(Hacettepe Üniversitesi)
Üye: *Prof. Dr. Ümit Murat ŞAHİNER*
(Hacettepe Üniversitesi)
Üye: *Doç. Dr. Esra BİRBEN*
(Hacettepe Üniversitesi)
Üye: *Doç. Dr. Ceren ACAR*
(İnönü Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

03 Şubat 2021

Prof. Dr. Diclehan Orhan
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayımlanan "**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

02/02/2021

Damla YILDIZ

¹"**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**"

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlerle ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince **enstitü** veya **fakülte** tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında zgn olduğunu, Tez Danışmanının Prof. Dr. Bülent E. ŞEKEREL danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Damla YILDIZ

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca desteğini benden esirgemeyen, bu çalışma süresince bana güvendiğini hep hissettiren ve meslek hayatım boyunca da bu alanda bana yaptığı katkılarla izleri hep var olacak olan danışmanım **Prof. Dr. Bülent E. ŞEKEREL**'e çok teşekkür ederim. Ayrıca engin laboratuvar bilgisini ve tecrübelerini benimle paylaşan **Doç. Dr. Esra BİRBEN**'e, gerek mesleki bilgi birikim gerekse de entelektüel tecrübelerinden yararlandığım hocalarım; **Prof. Dr. Özge UYSAL SOYER**'e, **Prof. Dr. Ümit Murat ŞAHİNER**'e, hastaların belirlenmesi ve serumların temin edilmesi sürecindeki yardımları ve mükemmel arkadaşlığı için **Uzman Melike OCAK** 'a,

Tez ve ders dönemim boyunca beni her zaman motive eden canım iş arkadaşım ve büyüğüm **Asuman ÇETİN**'e, görüntüleme işlemlerindeki katkıları ve güzel arkadaşlıklarından dolayı Hacettepe Üniversitesi Çocuk Metabolizma Laboratuvarından **Selda ACAR**'a, doktora öğrencileri **Neşe VARDAR**'a, **Damla AYGÜN**'e, ve diğer laboratuvar çalışanlarına, bana sundukları çalışma ortamından ve hiç azalmayan desteklerinden dolayı Hacettepe Üniversitesi Çocuk Alerji Bilim Dalında çalışan iş arkadaşlarım **Dilara ÇALIKER**'e, **Nagihan DUMLU**'ya, **Ahmet Gökhan KALIN**'a, **Mustafa KAYA**'ya, **Ayşe BİÇER**'e, **Aylin PEKİN**'e, **Fernuse DERELİ**'ye, **Şule DEMİRYILMAZ**, **Birsen ATA**'ya, **Ayşegül HİÇDÖNMEZ**'e **Pınar KARACAKAYA**'ya,

Ayrıca eğitim-öğrenim hayatım boyunca üzerimde emeği bulunan tüm öğretmenlerime,

Beni, tarifi imkansız duygularla tanıştıran, lisansüstü eğitimine ilk başladığım günlerde hayatıma giren ve yeniden yaşadığım öğrencilik heyecanına annelik heyecanını da ekleyen, çalışmamızın başlangıç ve gelişim sürecine kendi gelişim ve büyüme sürecini de dahil eden canım oğlum **Ali Çayan**'a, bu yoğun çalışma döneminde bana verdiği destek ve göstermiş olduğu sabırdan dolayı canım eşime, ve her an desteklerini yanımda hissettiğim aileme, arkadaşlarım **Emek TUNA**'ya, **Özlem KARAPINAR**'a sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Yıldız D., Sesamum indicum L. x Papaver somniferum L. Arasındaki Çapraz Reaksiyonların Western Blott Yöntemi ile Gösterilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Alerjik Hastalıkların Moleküler ve İmmünolojik Temelleri Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2021. Besin alerjisi görülme sıklığı dünyada belirsiz nedenlerle artmaktadır. IgE aracılı besin alerjisi, popülasyonun yaklaşık %3'ünü etkilemektedir. Susam alerjisi en sık teşhis edilen besin alerjileri arasında yer alırken, haşhaş alerjisinin görülme sıklığı düşüktür ancak ciddi reaksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. Araştırmacılar, besin alerjenlerinin moleküler özelliklerini karakterize etmeye başladıklarından beri farklı besinlerin çapraz reaksiyon gösterme durumları hakkında bilgi sahibi olmuşlardır. Daha önemlisi bu durum, hastalardaki alerjik reaksiyonların ciddiyetini ve türlerini tahmin etmeye yönelik fayda sağlamıştır. Tez kapsamında, DPT ve spesifik IgE sonuçlarına göre provokasyon testi yapılan 20 hastada, hastalar susam ve/veya haşhaş tüketebilme durumlarına göre kategorize edildikten sonra çapraz reaksiyon gösterme durumunun Western Blot ve inhibisyon deneyleri neticesinde gösterilmesi amaçlanmıştır. Sonuç olarak, kliniğimizdeki hastalarda büyüklük itibarı ile susama (*Sesamum indicum L.*) ait olduğu düşünülen daha önceden tanımlanmış 9 kDa, 15 kDa, 17 kDa, 45 kDa, 52 kDa ve 57 kDa bantlar ve daha önceden tanımlanmamış yaklaşık 22 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 65 kDa ağırlığında ve 65-80 kDa, 80-115 kDa aralığında, bantlar belirlenmiştir. Büyüklük itibarı ile haşhaşa ait olduğu düşünülen daha önceden tanımlanmış 14 kDa, 17 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 45 kDa moleküler ağırlığında bantlar ve 9 kDa moleküler ağırlığında, 15-25 kDa, 25-30 kDa, 30-40 kDa, 50-65 kDa aralığında tanımlanmamış bantlar gösterilmiştir. Bu bantlardan yaklaşık 15 kDa, 17 kDa, 10-15 kDa, 15-25 kDa, 25-30 kDa, 65-80 kDa aralığındaki, 25 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 45 kDa, 52 kDa, 57 kDa, 65 kDa moleküler ağırlığındaki susam bantlarının haşhaş alerjeni tarafından inhibe edildiği belirlenmiştir. 14 kDa, 17 kDa, 45 kDa, 25-30 kDa, 30-40 kDa, 80-115 kDa aralığındaki haşhaş (*Papaver somniferum L.*) bantlarının da susam alerjeni tarafından kısmen inhibe edildiği gözlenmiştir. Western analizi ve inhibisyon deneyleri neticesinde susam (*Sesamum indicum L.*) ve haşhaş (*Papaver somniferum L.*) besinleri arasında çapraz reaksiyon varlığı belirlenmiştir. Çapraz reaksiyonun gösterilmesinin reaksiyon şiddetini öngörerek besin provokasyon testi ihtiyacını azaltmada, sorumlu alerjenin belirlenmesi ve klinik tanı konmasında, gerçek duyarlanmayı çapraz reaksiyona bağlı olarak gelişen duyarlanmadan ayırmada yararlı olacağı kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: Susam, haşhaş, besin alerjisi, alerji, çapraz reaksiyon.

TYL-2018-17519 nolu bu çalışma Hacettepe Üniversitesi BAP birimleri tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Yıldız D., Determination Of The Cross Reaction Between *Sesamum indicum* L. x *Papaver somniferum* L. With Western Blott Method Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Molecular and Immunological Basics of Allergic Diseases, Master's Thesis , Ankara 2021. The prevalence of food allergies is increasing worldwide for uncertain reasons. IgE mediated food allergy affects approximately 3% of the population. While sesame allergy is among the most commonly diagnosed food allergies, the incidence of poppy allergy is low, but it is known to cause serious reactions. Since researchers began to characterize the molecular properties of food allergens, they have learned about the cross-reactivity of different foods. More importantly, this has been useful in predicting the severity and types of allergic reactions in patients. Within the scope of the thesis, it is aimed to show the cross-reaction status as a result of Western Blot and inhibition experiments after categorizing the patients according to their ability to consume sesame and / or poppy in 20 patients who underwent provocation test according to SPT and specific IgE results. In conclusion, we identified previously defined bands of approximately 9 kDa, 15 kDa, 17 kDa, 45 kDa, 52 kDa, 57 kDa in patients in our clinic, which are thought to belong to sesame by size. We identified previously undefined bands in the range of 65-80 kDa, 80-115 kDa range, approximately 9 kDa, 22 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 65 kDa thought to belong to sesame. Previously identified bands in the molecular weight of 14 kDa, 17 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 40 kDa and 45 kDa which are thought to belong to poppy by size, unidentified bands in the molecular weight of 9 kDa and bands in the range of 15-25 kDa, 25-30 kDa, 30-40 kDa, 50-65 kDa are shown. From these bands approximately 15 kDa, 17 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 45 kDa, 52 kDa, 57 kDa, 65 kDa molecular weight, 10-15 kDa, 15-25 kDa, 25-30 kDa, 30-40 kDa, 65-80 kDa range it was determined that sesame bands were inhibited by the poppy allergen. Poppy (*Papaver somniferum* L.) bands in the range of 14 kDa, 17 kDa, 45 kDa, 25-30 kDa, 30-40 kDa, 80-115 kDa were also partly inhibited by the sesame allergen. As a result of Western analysis and inhibition experiments, there is a cross-reaction between sesame (*Sesamum indicum* L.) and poppy (*Papaver somniferum* L.) foods. We believe that the demonstration of the cross-reaction will be useful in reducing the need for food provocation testing by predicting the reaction severity, determining the responsible allergen and making clinical diagnosis, and separating the true sensitization from the sensitization that develops due to cross-reaction.

Key Words: Sesame seed, Poppy seed, food allergy, allergy, cross-reaction.

This study numbered TYL-2018-17519 was supported by Hacettepe University BAP units.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Aşırı Duyarlılık Tepkileri	5
2.1.1. Tip 1 Aşırı Duyarlılık	5
2.1.2. Tip 2 Aşırı Duyarlılık	5
2.1.3. Tip 3 Aşırı Duyarlılık	6
2.1.4. Tip 4 Aşırı Duyarlılık	6
2.2. Besin Alerjisi	6
2.2.1. IgE-Aracılı Besin Alerjisi	7
2.2.2. Non-IgE Aracılı Besin Alerjisi	10
2.2.3. Miks IgE ve Non-IgE-Aracılı Besin Alerjisi	11
2.3. Antijen – Antikor Yapısı	12
2.4. Alerjenlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması	13
2.5. Susam	17
2.6. Haşhaş	19
2.7. Besin Alerjisi Tanısı	20
2.7.1. <i>In vitro</i> Tanı Yöntemleri	20
2.7.2. <i>In vivo</i> Tanı Testleri	21
2.8. Western Blot	23

3. GEREÇ ve YÖNTEM	25
3.1. Hasta Seçimi	25
3.2. Besin Spesifik IgE Ölçümü	25
3.3. Deri Testi	26
3.4. Hasta Gruplarının Oluşturulması	26
3.5 Alerjen İzolasyonu	27
3.6. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini	27
3.7. Coomassie Blue Boyama Yöntemi	27
3.7.1. Jel Elektroforezi	28
3.8. Western-Blot Yöntemi	29
3.8.1. Jel Elektroforezi	29
3.8.2. Proteinlerin Membrana Transferi	29
3.8.3. Bloklama	29
3.8.4. Antikor- Antijen Bağlanması (Antikor İnkübasyonu)	30
3.8.5. Görüntüleme	30
3.8.6. Analiz	31
3.9. Çapraz Reaksiyonun İnhibisyon Yöntemi ile Gösterilmesi (İnhibisyon Deneyleri)	31
4. BULGULAR	34
4.1. Hastalarla İlgili Veriler	34
4.2. Coomassie Blue Boyama Yöntemiyle Susam ve Haşhaş Ekstraktlarından Elde Edilen Alerjenlerin Bant Paternleri	35
4.3. Hastalara Ait Western Blott Görüntüleri	35
4.3.1. Grup 1	35
4.3.2. Grup 2	38
4.3.3. Grup 3	41
4.4. İnhibisyon Deneyleri	43
4.4.1. İnhibisyon Deneyinin Gösterilmesi	43
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
7. KAYNAKLAR	59
8. EKLER	66

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	66
EK-2: Tez Çalışması Orjinallik Raporu	67
9. ÖZGEÇMİŞ	Error! Bookmark not defined.

SİMGELER ve KISALTMALAR

BDT	: Besin Provokasyon Testi
BDT	: Bileşene Dayalı Tanı
BSA	: Bovine Serum Albumin
DPT	: Deri Prick Testi
EG	: Eozinofilik Gastroenterit
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EO	: Eozinofilik Özofajit
FPIES	: Gıda proteinine bağlı Enterekolit Sendromu
FPIP	: Gıda proteinine bağlı Proktokolit Sendromu
Ig	: İmmünglobulin (Alfa, Delta, Epsilon, Gama, Mü)
IL	: İnterlökin
kDa	: kilo Dalton
nsLTP	: spesifik olmayan lipit transfer protein
PAF	: Trombosit aktive edici faktör
PVDF	: Polivinilidendiflorür
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid
TBS-T	: Tris Buffered Saline (Tween'li)
TGF- β	: Transforming Growth Factor
Th	: yardımcı T hücresi
TNF	: Tumor Necroz Factor
Tr	: regülatör T hücresi

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Akut ve geç faz reaksiyonları. histamin, trombosit aktive edici faktör (PAF), 5-hidroksitriptamin (5HT; serotonin).	10
2.2. Bir antikor molekülünün yapısı.	13
2.3. Susam yağındaki lignin benzeri yapıların kimyasal şekilleri.	18
2.4. Western blot yönteminin şematik gösterimi.	23
4.1. Susam ve Haşhaş ekstraktlarının Coomassie Blue Staining Yöntemiyle analizi (Marker - Susam ekstraktı - Haşhaş ekstraktı - Susam ekstraktı - Haşhaş ekstraktı).	35
4.2. Grup 1'in 6, 3, 4, 1 ve 5 numaralı hastalarında Western Blot yöntemiyle susam ile bağlanma gösteren bantlarının gösterilmesi.	36
4.3. Grup 1'in 7 numaralı hastasında Western Blot yöntemiyle susam ile bağlanma gösteren bantların gösterilmesi.	37
4.4. Grup 1'in 2 ve 8 numaralı hastalarında Western Blot yöntemiyle susam ile bağlanma gösteren bantların gösterilmesi.	37
4.5. İzole susam alerjisi olan Grup 1 hastalarının (4, 3, 2, 1, 7, 6 numaralı hastalar) haşhaşa alerjisinin olmadığına Western Blot ile gösterilmesi.	38
4.6. İzole susam alerjisi olan Grup 1 hastalarının (5 ve 8 numaralı hastalar) haşhaşa alerjisinin olmadığına Western Blot ile gösterilmesi.	38
4.7. Grup 2 A'nın 11, 9 ve 13 numaralı hastalarında Western Blot yöntemiyle susam ile bağlanma gösteren bantların gösterilmesi.	39
4.8. Grup 2'nin 10 ve 12 numaralı hastalarında Western Blot yöntemiyle susam ile bağlanma gösteren bantların gösterilmesi.	40
4.9. Grup 2'nin 9, 10, 11, 12 ve 13 numaralı hastalarında Western Blot yöntemiyle haşhaş ile bağlanma gösteren bantlarının gösterilmesi.	40
4.10. Grup 3'ün 17, 19, 18, 15 ve 16 numaralı hastalarının Western Blot yöntemiyle susama bağlanma gösteren bantlarının gösterilmesi.	42
4.11. Grup 3'ün 14 numaralı hastasının susam bantlarının gösterilmesi. 14 numaralı hastanın yaklaşık 17 kDa moleküler ağırlığındaki bantı görülüyor.	42
4.12. Grup 3'ün 16, 15, 17, 19, 14 numaralı hastalarının Western Blot yöntemiyle haşhaşa bağlanma gösteren bantlarının gösterilmesi.	43
4.13. 13 numaralı hastaya ait susam) ve haşhaş besini arasındaki çapraz reaksiyonun inhibisyon görüntüsü.	44
4.14. Grup 1'deki hastaların serumlarından eşit hacimde alınarak karıştırılmasıyla oluşturulan havuzun inhibisyon görüntüsü.	45
4.15. Grup 2'deki hastaların serumlarından eşit hacimde alınarak karıştırılmasıyla oluşturulan havuzun inhibisyon görüntüsü..	46

- 4.16.** Grup 3'deki hastaların serumlarından eşit hacimde alınarak karıştırılmasıyla oluşturulan havuzun inhibisyon görüntüsü. 47
- 4.17.** Sağlıklı bir kontrole ait Susam ve Haşhaş bant paternlerinin Western Blot yöntemiyle teşhisi. 48

TABLolar

Tablo	Sayfa
2.1. Besin alerjisinde bağışıklık yanıtı.	7
2.2. En yaygın protein ailelerinin temel özellikleri.	14
2.3. Sınıf 1 gıda alerjenlerinden örnekler.	14
2.4. Sınıf 2 gıda alerjenlerinin örnekleri.	15
2.5. Çapraz reaksiyonlara bağlı yaygın ve nadir besin alerjileri	16
2.6. Besin alerjeni çapraz reaktiviteleri.	17
3.1. Hasta gruplarının belirlenmesinde kullanılan parametreler.	27
4.1. Hastalara ait klinik veriler.	34
4.2. Hasta sayılarının gruplara göre dağılımı.	35

1. GİRİŞ

Alerji, alerjene özgü IgE antikorlarının ve eşlik eden ilgili klinik semptomların varlığı olarak tanımlanmaktadır (1). Alerjik hastalıkların artan prevalansı sosyoekonomik düzeyi önemli ölçüde etkilemekte; iş üretkenliğinin, okul performansının, boş vakitlerinin ayrıca yaşam kalitesinin azalmasına neden olmaktadır (2). Alerjik hastalıkların fenotipik ekspresyonundan genetik ve çevresel faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir (3). Besin alerjisi ciddi bir halk sağlığı problemidir. Genellikle yaşamın ilk 1-2 yılında görülen bağışıklık sisteminin spesifik gıda proteinlerine çoğunlukla alerjene özgü immünglobulin E (IgE) tipi antikor gelişimiyle cevap vererek duyarlılaşmasına besin alerjisi denir. Besin alerjisinin klinik tablosunda ürtiker, atopik dermatit, anjioödem, astım, rinit, anafilaksi görülebilir (4,5). Besinler birçok mekanizmayla alerjik reaksiyonlara yol açabilir. Gıdalara olumsuz yanıt; IgE aracılı mekanizmayla, IgE içermeyen diğer immünolojik mekanizmalarla, besin intoleransı veya besin aversiyonu şeklinde verilebilir (5). Çocuklarda görülme sıklığı yetişkinlere göre daha fazladır. Bunların başında inek sütü alerjisi, yumurta alerjisi, fındık alerjisi ve buğday alerjisi gelmektedir. Gıdalardaki proteinler çocuklar için önemli alerjenlerdir (3).

Çocukların beslenmesine tohumların eklenmesiyle tohum duyarlılığında artış görülmektedir. Susam, ayçiçeği, haşhaş, keten tohumu, kabak çekirdeği yaygın olarak tüketilen tohumlardır ve susam alerjik reaksiyonlarından sorumlu tohumların başında gelmektedir. Susam Orta Doğu ve Afrika'ya özgü bir tohumdur. Geleneksel olarak tohum ve helva olarak tüketilirken batı ülkelerinde kraker ve ekmeklere sos olarak da kullanılmaktadır. Susam tohumunda tanımlanmış alerjenler; ses i1 ve ses i 2 (2S Albumin), ses i 3 (7S Vicilin benzeri Globulin), ses i 4 ve ses i 5 (Oleosin), ses i 6 ve ses i 7 (11S Globulin), ses i 8 (Profilin)dir. Klinik olarak susam tohumu fındık, kivi, çavdar tanesi ile çapraz reaksiyon gösterebilmektedir.

Haşhaş Papaveraceae ailesinden bir bitkidir; tıbbi, süs bitkisi, tohum ve tohum yağı olarak kullanılmaktadır. Haşhaş alerjisi yaygın görülmemektedir ancak klinik tablosunda hafif semptomlardan anafilaksiye kadar uzanan reaksiyonlar görülebilmektedir. Haşhaş tohumu çavdar, kivi, susam, fındık ayrıca karabuğday ile

çapraz reaktivite göstermektedir (7,8,9,10). Avusturya Viyana'da haşhaş alerjisi tanımlanmış 11 hastada 3, 4, 5, 14, 17, 20, 25, 30, 40, 45 kDa protein bantları saptanmıştır (11).

Bir hastanın sorumlu yiyeceğe karşı gerçek alerjisi olabileceği gibi, bazı durumlarda sorumlu yiyeceği sorunsuzca tüketebilir ancak spesifik IgE ve deri testleri pozitif olarak belirlenir. Bu duruma çapraz reaksiyon adı verilir (12). Çapraz reaksiyon gösteren besinlerin ve alakalı alerjik semptomların tanınması doğru teşhisin yapı taşıdır. Çapraz reaktif alerjenler önemlidir çünkü klinik olarak anlamlı olmayan pozitif test sonuçlarına neden olabilir (13). Poliklonal veya monoklonal antikorlar tarafından tanınan spesifik antijenleri tanımlamak için moleküler biyoloji ve proteomikte en sık kullanılan yöntemlerden biri Western Blot tekniğidir. Western Blot, proteinleri ve proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonlarını saptayabilir, biyolojik numunelerde kantitatif veya yarı kantitatif veriler sağlayabilir. Yaygın olarak proteinler için kullanılan çok aşamalı bir yöntemdir. Protein ekstraksiyonu hazırlanması ve protein konsantrasyonunun ölçülmesi, proteinlerin sodyum dodesil sülfat (SDS) poliakrilamid jel üzerinde elektroforez ile ayrılması, bu ayrılmış proteinlerin nitroselülöz veya PVDF membran üzerine immobilizasyonu, spesifik olmayan proteinlerin membran üzerinde bloke edilmesi, hedef proteinlerin spesifik primer antikorlar inkübasyonu, bir enzim veya radyoaktif işaretli sekonder antikor ile muamelesi, antijen antikor bağlanmasını yansıtan sinyal tespiti ve ilgilenilen protein bantlarının analizi aşamalarından oluşmaktadır. Başlangıçta bu yöntemle hedef protein hakkında evet/hayır yanıtı sağlaması amaçlanmışken günümüzde nitel veriler üretmekle sınırlı kalmamaktadır (14,15,16,17).

Yapılan çalışmalar, *Sesamum indicum* L. (Susam) ve *Papaver somniferum* L. (Haşhaş) besinlerine karşı yüksek oranda deri prick testi pozitifliği bulunduğunu göstermiştir. Kliniğimize susam alerjisi ile başvuran hastalarımızın bir kısmının aynı zamanda haşhaş alerjisi de olduğunu belirledik. Bu çalışmayla susam ve haşhaş alerjisi olan çocuklarda çapraz reaksiyon varlığının araştırılması, elde edilen verilerin ışığında gerçek alerjiye neden olan besinin belirlenmesi ve gereksiz yere besinlerin diyetten çıkarılmasının önlenmesi, çocukların iyileştirilerek gelişimleri için gerekli besinleri tüketmelerine yardımcı olunması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Alerjen: Alerjik reaksiyonları başlatma yeteneğinde olan maddelerdir.

Alerjen Bileşeni: İmmünglobulin E antikorlarına bağlanan alerjenik molekül. Doğal alerjen kaynaklarından çoğaltılabilir veya genetik mühendislik teknikleri ile üretilebilir.

Alerjen özü: Doğal bir alerjenin kaynağından elde edilen alerjenik ve alerjenik olmayan moleküllerin karışımından oluşur. Genel olarak proteinler, glikoproteinler, lipoproteinlerden oluşur. IgE yanıtına neden olabilir.

Alerji: Klinik semptomların varlığı ile birlikte alerjene özgü IgE antikorlarının varlığı.

Atopi: Genetik olarak alerjik hastalıklara yatkınlık.

Epitop (B hücre) : Bir antijenin antikora ve B hücrelerine bağlanan kısmıdır.

IgE Çapraz Reaktivitesi: Oldukça benzer veya özdeş epitop taşımaları nedeniyle hedef alerjeninkine benzer şekilde epitopları tanıyan ve bağlanan IgE antikorlarının reaksiyonu.

İzoalerjen: Aminoasit sekanslarının %67den fazlasını paylaşan aynı alerjen türlerinden alerjik moleküller. Çapraz reaktivite olasılığı yüksektir.

Major alerjen: Klinik reaksiyonlardan genel olarak sorumlu olan alerjenlerdir.

Panalerjen: Evrimsel olarak aminoasit dizilerini, yapısını, işlevini yüksek oranda korumuş alerjenler grubunun hepsinde bulunabilen alerjenlerdir.

Polisensitizasyon: İki'den fazla alerjene duyarlılık.

Duyarlılık: Bağışıklık sisteminin alerjen spesifik IgE üretmek üzere uyarılması.

İstenmeyen gıda reaksiyonlarını ilk olarak Tıbbın Babası olarak bilinen Hippocrates günümüzden 2000 yıl önce tanımladı ancak tıp camiası bu reaksiyonları araştırmakta sessiz kaldı. Daha sonra birinci ve ikinci yüzyıllarda diğer Yunan bilim insanları inek sütüne karşı reaksiyonlar bildirdiler. İlk anafilaktik reaksiyon 16. yüzyılda Marcello Donati tarafından yumurtaya karşı tanımlandı. Daha sonra 17. Yüzyılda ise Philipp Sachs tarafından balığa karşı anafilaktik reaksiyon rapor edildi. 20. yüzyılın başlarında ise gıda alerjileriyle artan egzama döküntüleri olan birçok çocuk vaka olduğu bildirildi. 1950 yılından sonra Loveless gıda alerjisi tanısını koyabilmek ve hasta öyküsünün güvenilirliğini test etmek için ilk kez kör, plasebo kontrollü gıda yükleme yöntemini kullandı. Ardından Goldman ve arkadaşları üç başarılı süt yükleme testi sırasında semptomların yeniden üretilmesini sağlayan bir tanı protokolü önerdiler ve inek sütü alerjisinden şüphelenilen 89 bebek hastanın değerlendirmesinin sonuçlarını yayınladılar. Mayıs 1976'da besin alerjisi testi için çift kör ve plasebo kontrollü yapılan bir çalışmada oral provokasyon testlerinin kullanımı tanımlandı. Bu protokol gıda kaynaklı alerjik hastalıkların teşhisinde altın standart olarak kullanılmaya başlandı (18). Yaklaşık yüzyıl önce (1906) Çocuk doktoru ve bilim adamı olan Clemens Freiherr Von Pirquet (1874-1929) "alerji" (Yunancada allos "başka ve farklı"; ergia ise "değişim veya tepki verme kapasitesi" anlamına gelmektedir.) terimini kullanan ilk kişidir (19,20). İlk kez 1819 yılında "Saman nezlesi" tanımlandı. 1960'lı yıllarda literatürde anafilaksi, gıda, böcek ve ilaçlara dair ilk vaka bildirimleri görüldü (21).

Alerjiler farklı antijen kategorilerine göre; gıda, ilaç, eviçi, evdışı vb alerjisi veya tetiklediği farklı alerjik hastalıklara göre atopik dermatit, alerjik rinit, alerjik astım vb. şekilde ayrılır. Prevelans değerleri farklı antijen türlerinde ve farklı alerjik hastalık türlerinde değişiklik göstermektedir. Bir çalışmada gıda alerjisi için %4-6, alerjik astım için %4-10, alerjik rinit için %5-49 olarak prevelans değerleri bildirilmiştir (22). Türkiye'nin farklı bölgelerindeki 5 il merkezinde (Ankara, Manisa, Antalya, Trabzon, Van) 9-11 yaş arası çocuklarda yapılan bir araştırmada 70 okuldan 6963 çocuğun %35'inin en az 1 alerjik hastalık belirtisi gösterdiği raporlara

kaydedilmiştir. Ebeveyn raporlarına göre genel prevalans oranları hırıltılı solunum % 15.8, rinokonjonktivit % 23.5, egzema % 8.1 olarak tespit edilmiştir (23). Antijenle temas edildiğinde (mikroplar, polenler, gıdalar, vb.), immün sistemde bir değişim meydana gelir. Bu değişim koruyucu veya zararlı bir tepkiyle sonuçlanabilir. Koruyucu tepki; kişi antijene karşı bağışıklık kazanır, yani o antijene maruz kaldıktan sonra herhangi bir belirti veya bulgu ortaya çıkarmaz. Zararlı tepki; temastan sonra semptomlara neden olur. İlk cevap 'bağışıklık', ikincisi ise 'aşırı duyarlılık' (alerji) olarak isimlendirilir (20). Aşırı duyarlılık reaksiyonları Coombs ve Gilbert tarafından 4 farklı tipe sınıflandırılmıştır; Tip 1 veya Anafilaktik Yanıt, Tip 2 veya Sitotoksik Aracılı Yanıt, Tip 3 veya İmmünokompleks Reaksiyonlar ve Tip 4 veya Gecikmiş Yanıt. Bunlardan tip 1, tip 2 ,tip 3 24 saat içinde meydana gelmektedir ve IgE, IgM, IgG gibi antikorlar aracılık etmektedir. Tip 4 reaksiyonda ise T hücre lenfositleri ve hücre aracılı immün yanıtları söz konusudur (24).

2.1. Aşırı Duyarlılık Tepkileri

2.1.1. Tip 1 Aşırı Duyarlılık

Yabancı proteinlere (polen, toz akarları, hayvan tüyleri, besinler ve çevresel proteinler) karşı oluşturulmuş bağışıklık reaksiyonlarıdır. Tip 1 reaksiyonlarında başlıca bazofiller, mast hücreleri ve immünglobulin E antikorları rol oynar. Bu immünglobulinler (IgE) mast hücre ve bazofillerdeki FcεRI reseptörüne bağlanarak degranülasyona neden olur. Mast hücre ve bazofillerden enflamatuar molekülleri içeren granüller salınır.

2.1.2. Tip 2 Aşırı Duyarlılık

Vücut hücrelerinde bulunan yüzey antijenlerine karşı üretilen IgG veya IgM'nin aracılık ettiği hümmoral tepkidir. 1. İmmünglobulinler kompleman sistemini aktive edebilir. 2. Natural Killer hücreleri aktive ederek fagositozla hücrelerin lizisine yol açar. 3. Fagositik hücreler tarafından IgG ve IgM'nin Fc fragmanlarının tanınmasını ve hedef hücrelerin opsonizasyonunu sağlar.

2.1.3. Tip 3 Aşırı Duyarlılık

Çözünür antijenlerle reaksiyona giren IgG ve IgM antikorları ile oluşan immün kompleksler aracılık eder. Lökositlerin aktivasyonu ile enflamatuvar yanıt oluşur. Doku hasarı, immün komplekslerin tetiklendiği immün etkilerden kaynaklanmaktadır. Yanıt 4-6 saat arasında ortaya çıkar.

2.1.4. Tip 4 Aşırı Duyarlılık

T hücrelerinin aracılık ettiği geç yanıttır. Bir antijene maruz kalıdıktan sonra hafıza T hücrelerinin üretilmesiyle sonuçlanan T hücre tepkilerinden oluşmaktadır (22).

Alerjik hastalıkların en önemli mediatörü histamindir. Bu sınıflandırmaya bakılarak besin alerjisinin, bronşiyal astımın, alerjik rinitin, alerjik dermatitin, alerjik konjonktivitin ve anafilaktik şokun Tip 1 aşırı duyarlılık sınıfına dahil olduğu belirlenmiştir (25).

2.2. Besin Alerjisi

Besin alerjisi, farklı populasyonlarda farklılıklarla gelişen bir halk sağlığı problemidir. Besin alerjisi tanısının konması için, belirli bir yiyeceğe maruziyette duyarlılık hem de o besin ile karşılaşma ile belli semptomların oluşması gerekir. Dünyada en çok alerjik reaksiyonlara neden olan klasik 8 besin grubu arasında inek sütü, yumurta, yer fıstığı, ağaç yemişleri, buğday, soya, balık ile kabuklu deniz hayvanları yer almaktadır. Ancak besin alerjisinin etiyolojisinin spektrumu, sıklığı, dağılımı kültürel, beslenme ve etnik farklılıklara bağlı olarak popülasyonlar arasında farklılık göstermektedir. Doğu Akdeniz bölgesinde yaşayan 0-2 yaş arası çocuklarda immunoglobulin E aracılı besin alerjisi prevalansını değerlendiren bir çalışmada en sık teşhis edilen besin alerjileri yumurta akı %75.9, inek sütü %55.7, ağaç kuruyemişleri %31.5, susam %20.6 olarak belirlenmiştir (26). Reaksiyonlar ürtikerden anafilaksi ve ölüme kadar değişir. Besin alerjileri çocuklarda daha yaygındır, hayatı tehdit edici olabilir (27). Amerika Birleşik Devletleri'nde çocuk ve

yetişkinlerin sağlık ve beslenme durumlarının değerlendirildiği ‘‘NHANES’’ (National Health and Nutrition Examination Survey) araştırmasının sonucuna göre, çocuklarda 2007’den 2010’a kadar bildirilen besin alerjisi prevalansının %6,53 olduğu saptanmıştır. Atopi ve aile öyküsü güçlü bir risk faktörüdür. Alerjisi olan bir aile üyesine sahip kişilerde, gıda alerjisi riskinin %40 arttığı görülmüştür (28). Çocuklarda görülme sıklığı artmaktadır. Genellikle yaşamın erken döneminde gelişir ve çocukların %10’unu etkiler. Besin alerjisi reaksiyonlarının yönetimi ve önlenmesi birincil öneme sahiptir. Suçlu alerjenlerden kaçınma, gıda kaynaklı anafilaksi için epinefrin kullanımı, gözlem ve daha fazla reaksiyonu önlemek için eğitim önemlidir (29).

Besin alerjisinde bağışıklık yanıtı IgE aracılı, IgE aracılı olmayan ve her ikisinin birlikte görüldüğü tablolar şeklinde sınıflandırılabilir. (Tablo 2.1.) IgE aracılı besin alerjisi, besin alerjisi duyarlılığını (bir gıda alerjenine karşı serum spesifik IgE antikorunun üretilmiş olması), ikincisi de o yiyeceğe maruziyetle ilgili belirti ve semptomların gelişmesini gerektirir. IgE aracılı olmayan besin alerjisinde T hücresi aracılı süreçler baskındır.

Tablo 2.1. Besin alerjisinde bağışıklık yanıtı.

BESİN ALERJİSİ		
IgE Aracılı	IgE Aracılı Olmayan	Karma Tip
Ürtiker, anjiyoödem, rinit, bronkospazm, oral alerji sendromu, laringospazm, ishal/kusma, anafilaksi	Gıda Proteini Kaynaklı Enterokolit Sendromu Gıda Proteini Kaynaklı Proktokolit Sendromu Gıda Proteini Kaynaklı Enteropatiler	Eozinofilik Özofajit Eozinofilik Gastroenterit

2.2.1. IgE-Aracılı Besin Alerjisi

Bağırsaklar doğası gereği büyük mukozal yüzeyinin, gıda proteinlerinden komensal bakterilere ve patojenlere kadar sürekli olarak yabancı maddelere karşı hassas olmasını gerektirir. Mukozal bağışıklık sistemi, patojenik organizmalara, toksinlere karşı koruyucu tepkiler oluşturmak için ve zararsız komensal bakterilere, gıda bileşenlerine aşırı tepki vermemek için gereklidir. Bağırsakların fiziksel

özellikleri (gastrik asit, sindirim enzimleri, mukozal bütünlük ve mukus sekresyonu) yutulan patojenlerin ve gıda proteinlerinin penetrasyonunu azaltır. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, (doğal immünite, *innate immunity*) birçok patojende ortak olan molekülleri hedefler. Uyarlanabilir bağışıklık sistemi ise, lenfositler, sitokinler, salgılanan IgA ve Gut İlişkili Lenfoid Doku aracılığı ile spesifik proteinlere karşı tolerans yanıtı veya zararlı tepki yanıtı geliştirir. Bu immün eksklüzyon, gastrointestinal sistemden alınan potansiyel alerjenik protein miktarını en aza indirir. Bu protein yükünün, özellikle erken yaşlarda, mide-bağırsak bağışıklık sistemi ile etkileşimi, gelecekte tek tek proteinlere yanıtın belirlenmesinde önemlidir. Faktörlerin karşılıklı etkileşimi, mukozal IgA sekresyon cevabının mı, sistemik bir bağışıklık yanıtının mı yoksa yeniden maruziyet sonucu lokal ve sistemik tolerans mı olacağına karar verir.

IgE aracılı besin alerjisi, aslında parazitlerin hedeflenmesinde etkili olan adaptif bir bağışıklık yanıtının, gıda proteinlerine karşı yanıt verilmesiyle ortaya çıkar. Gıda antiijenleri, antiijen sunan hücreler tarafından alınır ve yardımcı T hücrelerine sunulur. Sitokin salınımı, baskın bir TH1 veya TH2 tepkisi olup olmadığını belirler. TH1 cevabı, hücre içi bakteriye ve protozoaya karşı etkili hücre aracılı yanıttır. Buna karşılık TH2 cevabı, IgE üreten B hücreleri ile birlikte eozinofillerin, bazofillerin ve mast hücrelerinin uyarılması ile parazitleri hedefler. Besin proteinleri bir TH2 baskın yanıtını uygunsuz bir şekilde tetiklediğinde, sonuç Tip 1 hipersensitivite ve IgE aracılı besin alerjisidir.

Besin alerjisi belirtileri genellikle tetikleyici gıdaya maruz kalındığında ortaya çıkar ve yanıtın IgE aracılı bir yanıt olarak sınıflandırılabilmesi için 2 saat içinde gerçekleşmelidir. Deri prick testi ve gıdaya özgü spesifik IgE antikor seviyeleri ölçülerek tespit edilir (27).

İmmünglobulin E aracılı besin alerjisinde 3 önemli mekanizma bulunmaktadır: 1- Oral Tolerans, 2- Gıda alerjenlerine duyarlılaşma, 3- Gıda alerjenlerine anafilaktik reaktivite.

Oral Tolerans

İmmün sistemin besinlerle alınan ve normal florada bulunan çok sayıdaki antijene karşı yanıtızsız kalmasına denilmektedir. Bu yanıtızsızlık durumu oral yolla alınan antijenin yok edilmesiyle ya da hücreseel baskılanmasıyla oluşmaktadır.

Oral toleransın sağlanmasından sorumlu başlıca hücreler barsaklarda bulunan barsak epitelyum hücreleri, dendritik hücreler ve T regülatör (Tr) hücrelerdir. İntestinal immüniteden sorumlu T hücreler; interlökin 10 (IL-10) sentezleyen CD4+ Tr1 hücreler, ‘Transforming Growth Factor’ (TGF- β) sentezleyen CD4+ T yardımcı (Th) hücreler, CD8+ supresör T hücreler, CD4+CD25+ Tr hücreler, ve gama delta T hücrelerden oluşmaktadır. Non-enflamatuar peyer plakları ile lamina propriadaki dendritik hücrelerden IL-10 ve IL-4 sentezlenmesi, ortamda toleransının sağlanmasında rol oynar. Ortamda TGF- β bulunduğu takdirde epitelin bariyer etkinliği güçlenmektedir (30).

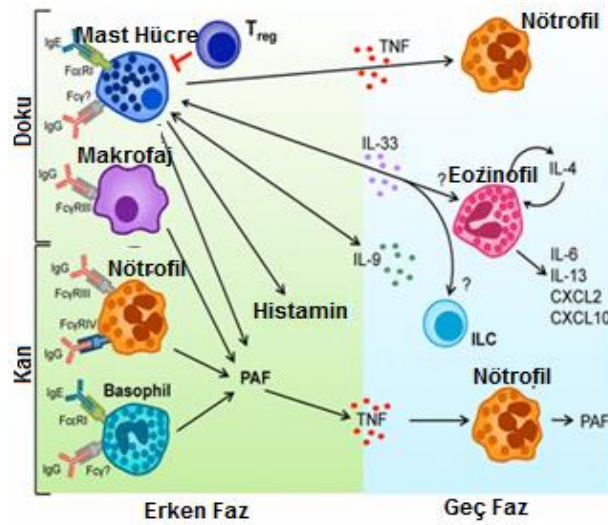
Besin Alerjenlerine Duyarlanma

Alerjik yanıt, ilk olarak duyarlanma ile başlar. ‘‘Duyarlanma’’ yatkınlığı olan kişilerde allerjenin deri yolu, inhalasyon, oral veya enjeksiyon yolu ile vücuda alınması ile başlamaktadır. Dendritik hücreler, allerjenle karşılaştıktan sonra işlemiş oldukları antijeni küçük peptitlere çevirip T hücrelerine sunarlar ve lenf nodlarına göç ederler (31). Naif T hücreler, Th2 sitokinleri (özellikle IL-4 ve IL-13) açısından zengin bir ortam varlığında aktive olur ve Th2 hücrelere farklılaşırlar. Alerjene özgü T hücrelerinin, B hücreleriyle teması sonucu ve salgıladıkları IL-4 ve IL-13 sitokinleri aracılığıyla lenf nodunda IgE üretimi sağlanır (32). B hücreleri tarafından üretilip salgılanan IgE antikorları, dokuda bulunan mast hücre veya periferel kan bazofilleri üzerindeki yüksek afiniteli ‘‘Fc ϵ RI’’ reseptörlerine bağlanır (33). Alerjenle yeniden temas sonucu ise alerjik yanıtta ikinci aşama başlar. Duyarlılaşmış kişi, antijenle veya benzer yapıda başka bir allerjenle karşılaşma halinde, bazofil ve mast hücrelerinin yüzeyindeki Fc ϵ RI reseptörüne (yüzeyindeki yüksek afiniteli IgE reseptörü) bağlı özgül IgE molekülüne bağlanır. Fc ϵ RI reseptörlerinin moleküler köprüleşmesi neticesinde hücrelerin aktivasyonu gerçekleşir ve bu hücrelerden

histamin, sitokinler ve diğer inflamatuvar mediatörlerin salınmasına neden olur (34). Salgılanan maddeler sinir uçlarını uyarır, kan damarlarını genişletir, bronşiyal düz kasların kasılmasına yol açar ve reaksiyon bölgesine inflamatuvar hücreler çeker. Bunu kaşıntı, eritem, sekretuar akıntı veya konjunktiva ve göz kapağı şişmesi gibi klinik semptomlar izler (25). Astım, egzama, alerjik rinit ve besin alerjisi tipik olarak alerjik hastalıklar olarak kabul edilir (35).

Besin Alerjenlerine Anafilaktik Reaktivite

Gıda alerjisi reaktivitesinin ayırt edici bir özelliği olan anafilaksi mekanizmaları bifaziktir. Alerjene maruziyetten hemen sonra akut bir reaksiyon, birkaç saat sonra ise geç faz reaksiyonu meydana gelir. Akut reaksiyon sırasında ortaya çıkan semptomlar önceden oluşturulmuş aracılardan salınmasına bağlıdır. Geç faz reaksiyonu inflamatuvar hücrelerin bir dizi akışını içerir. (Şekil 2.1.) Klinik olarak akut ve geç faz reaksiyonları bazı hastalarda farklılık gösterebilmektedir.



Şekil 2.1. Akut ve geç faz reaksiyonları. histamin, trombosit aktive edici faktör (PAF), 5-hidroksitriptamin (5HT;serotonin) (30).

2.2.2. Non-IgE Aracılı Besin Alerjisi

IgE aracılı olmayan besin allerjilerinin immünopatolojik mekanizmaları konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır. Şüpheli besinin tüketiminden birkaç saat sonra oluşan klinik semptomlar Tip 4 hücre aracılıklı hipersensitivite reaksiyonları

ile oluşmaktadır. Eozinofilik özefajit ve eozinofilik gastroenteropatilerde T hücre aracılıklı enflamasyon yanında tutulan dokuda yoğun eozinofil infiltrasyonu vardır (36). Üç ana klinik ögesi vardır. Bunlar, Gıda Proteine Bağlı Enterokolit Sendromu (FPIES), Gıda Proteine Bağlı Proktokolit (FPIP) ve Gıda Proteine Bağlı Enteropatilerdir. Çoğu zaman çocukluk ile sınırlıdır.

Gıda Proteini Kaynaklı Enterokolit Sendromu

Gıdaya karşı belirgin bir immün yanıt meydana getiren nadir besin alerjisidir. Sadece gastrointestinal semptomlara (ishalli veya ishalsiz kusma) neden olur. FPIES'deki test sonuçları metabolik asidoz, nötrofil ve trombositoz gösterebilir. Tanı kliniklidir, ancak kan, eozinofiller, lenfositler veya dışkıda artmış indirgeyici maddelerin varlığı destekleyicidir.

Gıda Proteini Kaynaklı Proktokolit

Yeni doğanların dışkısında kan ve mukus görülmesi ile ilgili bir durumdur. İnek sütü proteini en yaygın sorumludur. Tanı, diğer sistemik semptomlar yoksa rektal kanamanın varlığına dayanır.

Gıda Proteini Kaynaklı Enteropatiler

İlk olarak 1960'larda inek sütüyle ilişkili malabsorbsiyon olan bir bebek grubunun tanımlanmasından sonra açıklanmıştır. Bu bebeklerde yaşamın ilk aylarında kronik diyare, steatore ve zayıf kilo artışı gelişir. En yaygın tetikleyiciler inek sütü ve soyadır. İnce bağırsakta, spesifik olmayan villöz atrofi ve lenfositik infiltrasyon ile bir T-hücresi aracılı immün tepkiyi oluşturur.

2.2.3. Miks IgE ve Non-IgE-Aracılı Besin Alerjisi

Eozinofilik özofajit (EO) ve Eozinofilik gastroenterit (EG) içerir. Eozinofilik bozukluklar EO ve EG'de, gıda alerjisinin patojenezinde rol oynadığına dair kanıtlar görülmüştür.

Eozinofilik Özofajit

Hem çocuk hem de yetişkinleri etkileyen özofagusun giderek artan şekilde inflamasyonu ile gelişen kronik inflamatuvar bir durumdur. Eozinofilik özofajit ve astım, alerjik rinit ve egzama gibi atopik hastalıklar arasında güçlü bir ilişki vardır. Periferik eozinofili yaygındır. EO'lu hastalar genellikle gıda alerjisi öyküsüne sahiptir.

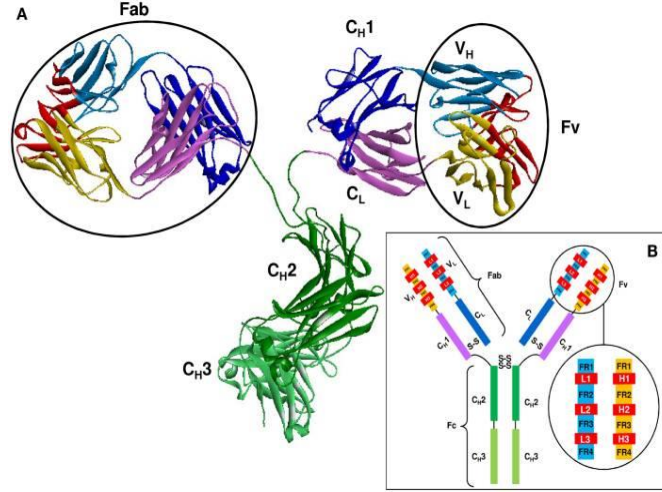
Eozinofilik Gastroenterit

Atopi ve eliminasyon diyetlerine verilen yanıt eozinofilik gastroenterit ve besin alerjisi ilişkisinin kanıtı olarak görülmektedir. Eozinofilik gastroenteritli hastaların çoğunda atopi, periferik eozinofili ve total serum IgE bulunur. Nadir görülür, kortikosteroid ilaçlarla tedavi edilir (27).

2.3. Antijen – Antikor Yapısı

Bağışıklık tepkisini başlatabilen ve antikorlara bağlanma yeteneği olan moleküllere antijen ya da immünojen adı verilir. Bir maddenin yabancılık özelliği göstermesi, molekül büyüklüğünün ne olduğu, kimyasal karmaşıklığı, molekülün yapısal sertliği, çözünülebilirliği, emilimi, elektrik yükü, canlıların genetik yapısı, antijenin dozu, organizmaya verilmiş veya giriş yolu, adjuvan madde varlığı antijenik özelliğe sahip olması açısından önemlidir. Antikorlar, antijenlere spesifik olarak bağlanabilirler ve bağışıklık sisteminin diğer bileşenlerini aktive edebilirler. Antijen ile bir antikor arasındaki ilişki antijen üzerindeki bağlanma bölgesi - epitop ve antikor üzerindeki bağlanma bölgesi arasındaki kovalet olmayan etkileşimlerin oluşmasıyla başlamaktadır. Antikorum temel yapısı 4 zincirden oluşur: 2 eş ağır zincir (VH), 2 eş hafif zincir (VL). Ağır zincir ve hafif zincirler üzerinde değişken V “Variable”, ve sabit C “Constant” bölgeler bulunur. (Şekil 2.2.) Zincirler arası bağ sayıları farklı olabilmekte birlikte hafif ve ağır zincirler ve iki ağır zincir disülfid bağları ve kovalent olmayan bağlarla birbirlerine bağlıdır. Antikorum Y gibi olduğu bölgeye menteşe bölgesi denir. Menteşe bölgesiyle antikor esneklik kazanır. Değişken bölge antijeni tanıyan ve yüksek polimorfizme sahip CDR bölgelerinden

oluşur. İmmünglobulinler, papainle muamele sonucu menteşe bölgesinden kırılır. İki Fab 1 Fc domainine ayrılır. Fab antijen bağlayan bölge, Fc efektör uçtur. Antikorlar ağır zincirdeki polipeptik yapısına göre IgG (gama), IgA (alfa), IgM (mü), IgD (delta), IgE (epsilon) olarak adlandırılırlar (37).



Şekil 2.2. Bir antikor molekülünün yapısı.

2.4. Alerjenlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması

Latince ismine göre adlandırılma yapısıdır. İlk 3 harf cinsini belirtir. Bulunuş sırasına göre numara verilir. Örnek : Ev tozu akarı *Dermatophagoides pteronyssinus* alerjen; Der p 1 ve Huş ağacı (Birch) poleni antijeni Latince ismi *Betulaverrucosa*; Bet v 1.

Alerjenik moleküllerin yapı ve işlevlerine göre farklı protein ailelerinde sınıflandırılırlar. (Şekil 2.2.) Bu sınıflandırılmayla lokal veya sistemik reaksiyonların gelişme olasılığı tahmin edilebilir. Aynı zamanda aynı protein ailesi içindekiler beklenen semptomların şiddeti açısından pH stabilitesi ve sıcaklık açısından benzer özellikler gösterirler.

Tablo 2.2. En yaygın protein ailelerinin temel özellikleri.

Protein Ailesi	Özellikleri
Lipocalin	Hayvansal kökenli kararlı proteinler ve önemli alerjenlerdir.
nsLTP (Spesifik Olmayan Lipid Transfer Protein)	Isıya ve sindirime dayanıklı proteinler olarak bilinirler. Bu yüzden pişmiş gıdalarda da reaksiyon gelişir. Lipitleri hücre zarlarından geçiren spesifik olmayan lipid transfer proteinleridir. Genellikle Oral Alerji Sendromu, ayrıca sistemik reaksiyonlarla ilişkilidir.
Parvalbumin	Balıkta bulunan majör alerjendir. Isıya ve sindirime karşı direnç gösterirler. Pişmiş gıdalarda reaksiyona neden olurlar.
Polcalsin (kalsiyuma bağlanan proteinler)	Farklı polen türleri arasında çapraz reaksiyon için belirteçtir.
PR-10 Benzeri Protein	Isıya ve proteazlara duyarlıdır. Oral Alerji Sendromu gibi lokal semptomlarla alakalıdır.
Profilin	Isıya ve sindirime duyarlıdır. Polen alerjik hastalarda yaygın bulunur. Klinik semptomlar nadirdir ancak lokal ve ciddi reaksiyonlar meydana gelebilir.
Serum Albumin	Isıya ve sindirime oldukça hassastır. Hayvanların farklı biyolojik sıvılarında (tükürük, süt) ve yerlerinde (et) bulunur. Farklı türlerin serum albuminleri arasında çapraz reaksiyon gösterebilir.
Tropomiyosin	Kas liflerinde aktin bağlayıcı proteinlerdir. Isıya ve sindirime dirençlidir. Oral Alerji Sendromu'na ilaveten daha şiddetli sistemik reaksiyonlara yol açarlar.

(1)

İki tür besin alerjisi vardır. Birinci sınıf gıda alerjenleri birincil sensitizörlerdir. Suda çözünür glikoproteinlerdir. Isı, asit ve proteazlara karşı dayanıklıdır. (Tablo 2.3.)

Tablo 2.3. Sınıf 1 gıda alerjenlerinden örnekler.

İnek sütü	Kazeinler (a,b,k), alfa-laktoalbumin, betalaktoglobulin, serumalbumin
Tavuk yumurtası	Ovomucoid, ovalbumin, ovotransferrin
Fıstık	Vicilin, conglutin, glisin
Soya fasülyesi	Glisin, profilin, tripsin inhibitör
Karides	Tropomiyozin
Balık	Parvalbumins
Meyveler ve sebzeler	Lipid transfer proteinleri (LTPs)

Sınıf 2 gıda alerjenleri genellikle bitki kaynaklı proteinlerle çapraz reaktiftir. Çapraz reaktivite yaygın olarak oral alerji sendromu veya lateks-meyve sendromu ile sonuçlanır. Bunlar yüksek ısıya dayanıksız ve izolasyonu güçtür. (Tablo 2.4.)

Tablo 2.4. Sınıf 2 gıda alerjenlerinin örnekleri.

Patojen ilişkili protein 2 grubu “Glukanaz”	Kestane, avokado, muz, latex, incir
Patojen ilişkili protein 3 grubu “Kitinaz”	Lateks (Hev b6), avokado
Patojen ilişkili protein 5 grubu “Taumatin benzeri”	Kivi, elma, kiraz
Huş ağacı v1 homologları “Patojen ilişkili proteinler 10”	Fındık, kayısı, kiraz, şeftali, armut, havuç, kereviz, maydanoz, elma
Huş ağacı Bet v2 homologları Profilin	Lateks, kereviz, patates, armut, fıstık, soya

Bir besin alerjeni ham haldeyken alerjiye neden olabilirken, iyi piştiğinde olmayabilir. Gıda işleme, besinlerin alerjen durumunu (epitopu) değiştirebilir (38).

Çapraz reaksiyon, bir IgE antikorunun, homolog alerjen yapılarına konformasyonel epitoplara (yani yapısal benzerliklere) bağlanmasına dayanır. Bu gibi yapılar benzer işlevlere sahip proteinler arasında korunabilir. Bazı çapraz reaktivitelerde birincil sensitizör bilinmektedir (Bet v 1 homologları gibi), thaumatin benzeri proteinlerin neden olduğu diğer çapraz reaktiviteler için daha az bilgi mevcuttur. Alerjenik epitopları paylaşan alerjenlerin örnekleri, pan alerjen aileleri PR10, profilinler, glukanazlar ve tropomiyosinlerdir. Çapraz reaksiyonlar aynı zamanda, kararlı gıda proteinlerinin (örneğin, fındık ve diğer kabuklu yemişlerde, yer fıstığı ve diğer baklagillerde, inek ve keçi sütünde, morina balığı ve diğer balık türlerinde) neden olduğu birincil gıda alerjisinde de sık olarak görülür. Besin alerjisinden şüpheleniliyorsa, çapraz reaktiviteye yol açan inhalan alerjenlere karşı duyarlılık konusunda bilgi sahibi olmak çok faydalıdır. (Tablo 2.5)

Tablo 2.5. Çapraz reaksiyonlara bağlı yaygın ve nadir besin alerjileri.

İnhalan Alerjen	Gıda Alerjeni
Gıdalara karşı ortak çapraz reaksiyonlar	
Ağaç Polenleri	Soya, yer fıstığı, patates, kivi, havuç, elma, nektari, şeftali, fındık, kereviz, vişne
Gıdalara daha az ortak çapraz reaksiyonlar	
Pelin otu poleni	Ayçiçeği tohumu, üzüm, şeftali, baharatlar, kereviz, mango, havuç
Doğal lateks	Ananas, avokado, muz, patates, domates, kestane, kivi
Gıdalara nadir çapraz reaksiyonlar	
Ficus benjamina	İncir
Kuş alerjenleri	Kümes hayvanları, yumurta
Ev tozu akarları	Kabuklu deniz hayvanları ve yumuşakçalar
Çınar / şeftali	Kayısı, erik, elma, marul
Hayvan epidermisi	İnek sütü, et
Gıdalara karşı kanıtlanmamış çapraz reaksiyonlar	
Artemisia ve Ambrosia poleni	Kavun, kabak, salatalık, muz
Çimen ve tahıl poleni	Un, kepek, bakliyat

(39)

Alerjenin vücuda alınış yolu, karşılaşılan allerjen dozu, alerjen ile aynı anda karşılaşılan çevresel mikroorganizmaların varlığı ve kişinin genetik yapısı ise alerjik reaksiyonun şiddetini belirlemektedir.

Çapraz reaksiyon, hangi antijenlerin immun sistem üzerinde benzer etkiler yarattığını belirlemek için yapılan bir yöntemdir. Özgünlüğün moleküler etkenleri ve çapraz reaksiyon, antijenik varyasyonların doğasını ve varyantların popülasyonlardaki dağılımını şekillendiren seçici süreçleri açıklamaktadır (40). IgE aracılı besin alerjilerinin önemli bir kısmı besin ve inhalan alerjenlerinde bulunan çapraz reaktiflere duyarlılıktan kaynaklanmaktadır. (Tablo 2.6.) Sekonder besin alerjenlerinin klinik görünümünde heterojenlik görülebilmektedir ve teşhisi ciddi şekilde olumsuz etkileyebilir. Pozitif deri prick testi ve/veya spesifik IgE sonucu her zaman gerçek alerjiyi yansıtmayabilir, klinik olarak anlamlı olmayan duyarlılığı gösteriyor olabilir. Oral provokasyon testinin sonucu klinik için öngörücü değere sahiptir (41).

Tablo 2.6. Besin alerjeni çapraz reaktiviteleri.

Primer alerjen	Çapraz reaktiviteleri
Inek sütü	Keçi sütü %90, sığır eti %10
Tavuk yumurtası	Hindi, ördek, kaz yumurtaları
Soya	Diğer baklagillerle çapraz reaksiyon nadir görülür.
Yer fıstığı	Diğer baklagiller genellikle iyi tolere edilir.
Balık	Türler arası belirgin çapraz reaktivite
Kabuklu ağaç yemişleri	Diğer kabuklu ağaç yemişleri ile yüksek çapraz reaktivite
Kabuklu deniz ürünleri	Kabuklular arasında belirgin çapraz reaktivite vardır. Yumuşakçalar arasında çapraz reaktivite kabuklular kadar iyi tanımlanmamıştır.
Buğday	Nadir

(27)

2.5. Susam

Susam (*Sesamum indicum* L.), Pedaliaceae ailesinden bir bitkidir (42). Hindistan, Çin, Kore, Rusya, Türkiye, Meksika, Güney Amerika ve Afrika'nın birçok ülkesinde yetiştirilen önemli bir yağlı tohumdur. Susam tohumları yağ, protein, doymamış yağ asitleri, vitaminler, mineraller ve folik asit açısından zengindir. Dünya susamının yaklaşık %70'i yağ ve yemek olarak işlenirken, geri kalanı gıda ve şekerleme endüstrilerinde kullanılır (43).

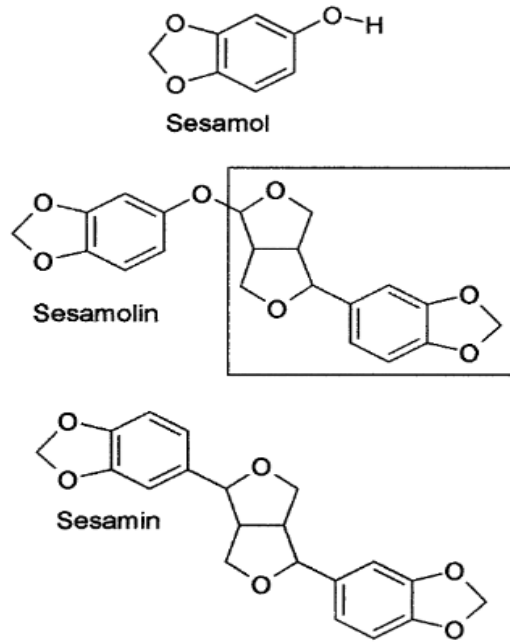
%50-55 oranında yağ (palimitk asit, stearik asit, oleik asit, linolik asit, lineleik asit), %20 protein (aminoasitler; arg, his, leu, lys, met, phe, thr, trp, ile),

%14-20 karbonhidrat,

%2-3 lif içerir.

100 gramı 565 kcal=2390 kJ enerji sağlar ve yaklaşık 5,3 gram mineral (sodyum, potasyum, magnezyum, kalsiyum, demir, selenyum, bakır, fosfor) içerir. Total protein miktarının %60-70 kadarı 11S Globulinden yaklaşık %25'i ise 2S Albuminden oluşmaktadır (44,45). Anti-aterosklerotik olmasının dışında, plazma lipidlerini azaltmak, anti-enflamatuar, hiperglisemi düşürülmesi, yüksek kan basıncını azaltmak plazma lipid profilini geliştirmek ve oksidatif stresi azaltmak gibi faydaları bulunur (46).

Susam tohumları 3 renkte (siyah, beyaz, kahverengi) bulunmakta olup protein miktarı niceliksel farklılıklar olmasına rağmen (beyaz tohum, siyah tohuma göre daha fazla proteine sahiptir.) 3 çeşidin de alerjik reaksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. Susam alerjenleri kimyasal yapılarına göre 2 kategoriye ayrılmaktadır. Birincisi, geniş moleküler kütleyle sahip (7-78 kDa) proteinler veya glikoproteinler; ikincisi, susam yağındaki lignin benzeri (sesamin, sesamol, sesamolin) moleküllerdir. (Şekil 2.4.)



Şekil 2.3. Susam yağındaki lignin benzeri yapıların kimyasal şekilleri. (47)

Susam alerjisi en yaygın tohum alerjisidir. Farklı popülasyonların değişik beslenme alışkanlıkları nedeniyle susam alerjisi görülme sıklığında farklılıklar vardır. Yaşamın erken döneminde başlar (genellikle 2 yaş). Klinik belirtiler; mukokutanöz, solunumsal ve gastrointestinal hastalıklardan yaşamı tehdit eden sistemik anafilaksiye kadar uzanır (48).

Susam besini alerjisinin prevalansı, son yıllarda artmıştır ve morbiditeyi etkilemektedir (49). Fransa'da 1993-1997 yılları arasında besin alerjisi ilişkili anafilaksi geçiren 80 vakanın %5'i, Fransa Nancy ve Toulouse'de besin provokasyonu ile tanısı yapılmış 544 besin alerjisi olan çocuğun %0,9'u, 1994-1996 yılları arasında İsveç'te besin aracılı anafilaksi geçiren 61 vakanın %4,9'u, ABD

Manchester 1994-1996 yılları arasında besin alerjisi kaynaklı anafilaksi geçiren 90 hastanın %2,2'si susam alerjisi olarak bildirilmiştir (11). Çapraz reaksiyona giren alerjenler susam duyarlılığında rol oynayabilir, yanlış pozitif susam IgE sonuçları verebilir ve yanlış tanıları neden olabilir (50).

Son yıllarda tanımlanan birkaç susam tohumu alerjenleri: Ses i 1 (9 kDa), Ses i 2 (7 kDa), Ses i 3 (45 kDa), Ses i 4 (17 kDa), Ses i 5 (15 kDa), Ses i 6 (52 kDa), Ses i 7 (57 kDa). Bunlardan Ses i 1 ve Ses i 2 düşük molekül ağırlığa sahip 2S Albumin proteinleridir. İki oleosin Ses i 4 ve Ses i 5 Fransız popülasyonunda tanımlanmıştır (51,52).

2.6. Haşhaş

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Papaveraceae ailesinden bir bitkidir. Bilinen en eski şifalı bitkilerden biridir ve Hindistan, İran, Türkiye, Hollanda, Polonya, Romanya, Çekoslovakya, Yugoslavya, Kanada'da büyük çapta yetiştirilmektedir (53). Yenilebilir tohumu için yetiştirilen eski bir tıbbi bitkidir. Ayrıca, morfin, thebain, kodein dahil olmak üzere önemli farmasötik ilaçların kaynağıdır (54). Haşhaş tohumu alerjik tip I duyarlılık raporları nadirdir. Literatüre göre, ağırlıklı olarak polen veya kabuklu ağaç yemişleri alerjisi olan hastaları etkileyen ciddi reaksiyonlar meydana gelebilir. Haşhaş tohumu solunduğunda eritem ve anjioödem, konjonktivit ve dispne gelişebilir (55). Avusturya Viyana'da haşhaş alerjisi tanımlanmış 11 hastada 3 kDa, 4 kDa, 5 kDa, 14 kDa, 17 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 45 kDa protein bantları saptanmıştır (56).

Haşhaş tohumu ve diğer gıda alerjenleri arasındaki çapraz duyarlılıklar susam, fındık, çavdar tanesi, kivi meyvesi ile tanımlanmıştır (57). Haşhaş tohumunda molekül kütlesi 45 kDa olan IgE bağlı glikoprotein major alerjen olarak bildirilmiştir. 100 gramında yaklaşık 20,2 gram protein (aminoasit; Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr, Val), yaklaşık 42,2 gram yağ, 4,2 gram karbonhidrat, 6,8 gram mineral (sodyum, potasyum, magnezyum, kalsiyum, manganez, demir, bakır, çinko, fosfor) bulunmaktadır (56).

1 hastada haşhaş tohumu ekstresi ile 10 ve 12 kDa susam tohumu alerjenlerine ve susam tohumu ekstresi ile 12 kDa haşhaş tohumu alerjenine IgE aracılı inhibisyonu bildirilmiştir (45).

2.7. Besin Alerjisi Tanısı

Hasta ve yakınının yeterli objektif öyküsü, anamnez tanıda kuvvetli bir araç olabilmektedir. Spesifik IgE ölçümleri ve besin alerjenleri ile yapılan deri testleri besine karşı duyarlılık olup olmadığını göstermektedir. IgE aracılıklı besin alerjisinde, duyarlılık yanında besin tüketimi sonrasında semptomların görülmesi, tanıyı güçlendirmektedir. Hücresel immün yanıtı bağlı olarak gelişen besin allerjilerinde ise spesifik IgE ve deri testleri sonucu negatif olmaktadır. Hasta öyküsünde besin tüketimi ile semptomların ortaya çıkışı, bazı olgularda pozitif atopi yama testi ve eozinofilik gastroenteropatilerde doku örneklerinde eozinofil infiltrasyonu hücre aracılı besin allerjisini destekler. Ancak besin provokasyon testleri tüm besin allerjilerinde altın standart tanı yöntemi olarak bilinmektedir.

2.7.1. *In vitro* Tanı Yöntemleri

Besin Spesifik IgE Ölçümü

Allerji tanısında *In vitro* testler sıklıkla kullanılmaktadır. Bilhassa erken çocukluk döneminde ve antihistamin grubu ilaç kullanan veya ciddi atopik dermatitli hastalarda deri testleri yerine tercih edilmektedir. Besin spesifik IgE düzeylerinin ‘‘pozitif’’ olması duyarlılığı göstermekle birlikte deri prik testlerinde olduğu gibi tanı koymada klinik korelasyon gerektirmektedir.

Total Serum IgE Ölçümü

Besin allerjisi olan çocuklarda genellikle total serum IgE düzeyi ölçümü gerekmezken ancak atopik dermatitli çocuklarda faydalı bir test olabilmektedir. Atopik dermatitli hastalarda total serum IgE düzeyleri yüksek olabilmekte ve ayrıca

bu hastalarda her türlü aeroallerjen veya besin allerjenlerine karşı gerçek allerji olmasa da sensitizasyona bağlı pozitiflik görülebilmektedir.

Bileşene (Komponente) Dayalı Tanı

Besin maddelerinde bulunan farklı proteinlere karşı gelişmiş IgE antikorlarının miktarı spesifik IgE testleri ile total olarak ölçülür. Bileşene dayalı tanı (BDT) ise besinlerdeki farklı proteinleri bileşenlerine ayırarak her bir protein grubuna bağlanan spesifik IgE antikor seviyesinin ayrı ayrı ölçülmesine imkan sağlar. Bileşene dayalı tanı ile sIgE ölçümü, alerjen duyarlılığının moleküler analizinde bizi bir basamak ileri götürmektedir. Hastanın besin ile karşılaştığında allerjik reaksiyon oluşma riskini öngörmeye, besin bileşenine spesifik IgE'lerin besine spesifik IgE'den daha değerli olabilecekleri düşünülmektedir. Besin provokasyon (yükleme) testleri doğası gereği riskli olabilmektedir ve bileşen spesifik IgE ölçümünün besin provokasyon testi ihtiyacını ortadan kaldırabileceği veya azaltabileceği öngörülmektedir. Minör alerjenlere duyarlılık söz konusu ise standart ekstrelerde bulunmayan ya da yeterli düzeyde olmayan bu allerjenler ile BDT duyarlılığı arttırır. Klinik reaksiyonun şiddeti veya reaksiyon riski veya diğer klinik bulgular ile ilişkili olduğunda BDT yöntemlerinin özgünlüğü yükselir. Allerjenik komponentlerin tek tek ölçüldüğü FDA onaylı kantitatif sonuç veren 2 ayrı ELISA yöntemi bulunmaktadır. Bileşene dayalı tanı yöntemleri diğer testler gibi besin alerjisine duyarlılık geliştiğini belirtir, direkt olarak klinik reaksiyonu göstermez. Bu nedenle sonuçlar klinikle birlikte ve dikkatli yorumlanmalıdır.

2.7.2. *In vivo* Tanı Testleri

Deri Testleri

Deri prik testleri (DPT), allerjik hastalıkların tanısında en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Basit olması, hızlı sonuç vermesi, yüksek sensitivite ve düşük maliyetli olması avantajları arasında yer almaktadır. Deri prik testinde kullanılacak allerjenlerin seçilmesi ve sayısı hikayeye uygun olmalıdır. Deri üstüne besin allerjeni damlatıldıktan sonra tek kullanımlık bir lanset yardımıyla allerjenin

epidermal tabakaya ulaşması sağlanır. Ödem plağının ortalama çapı ölçülür. Negatif kontrole ait ödem çapı çıkarıldıktan sonra besin allerjeninin yol açtığı ödem çapı 3 mm'den büyükse, test sonucu ‘pozitif’ kabul edilir. Ödem çapı arttıkça, hastanın o besine reaksiyon verme olasılığı da artmaktadır.

Alerjik Besinin Diyetten Uzaklaştırılması

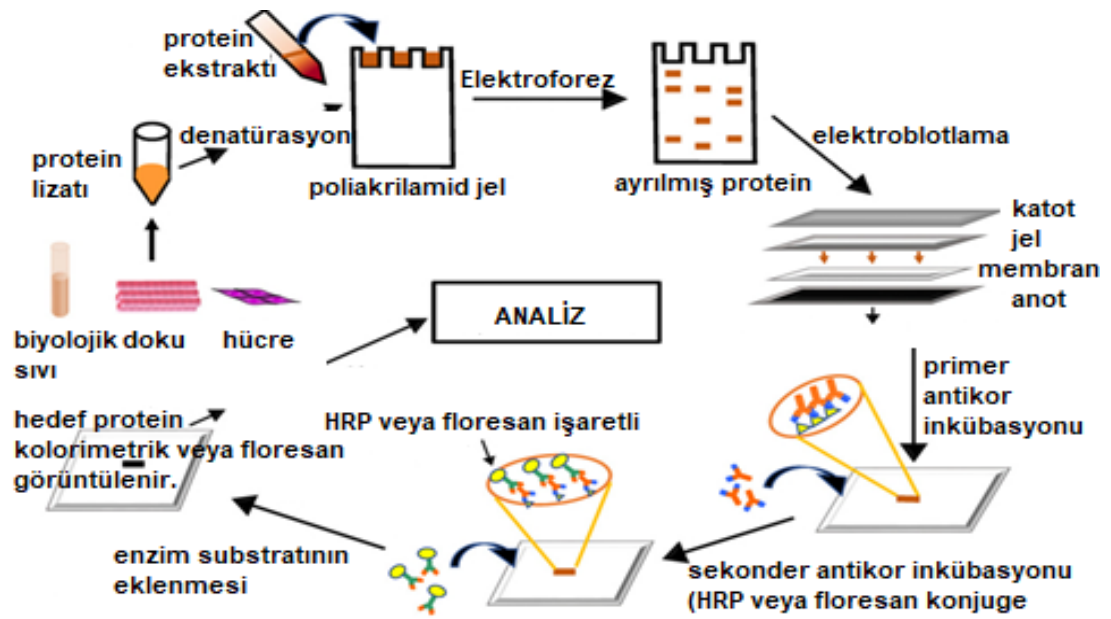
Allerjik reaksiyonlara yol açan besinin diyetten çıkarılmasıyla semptomların azalması, şüphe edilen besinin bu reaksiyonda rol oynadığı düşüncesini kuvvetlendirir. Semptomların şiddetine göre şüpheli besin diyetten en az 1-6 hafta kadar süreyle uzaklaştırılmalıdır. Büyüme çağındaki çocuklarda mutlak alınması gereken besinler diyetten uzaklaştırıldığında besin desteği için diyetisyenden yardım alınmalıdır. Eliminasyon diyetinden sonra remisyonun sağlanması ve reaksiyonların azalması besin allerjisi tanısı koymak için yeterli görülmemektedir. Kesin tanı için oral besin yükleme “challenge” testleri yapılmalıdır; besin allerjilerinde altın standart tanı yöntemi olarak bilinmektedir.

Besin Provokasyon Testleri

Besin allerjisi tanısı için pozitif deri prik testi ve/veya besin spesifik IgE antikorların varlığı yeterli görülmemektedir. Çünkü iki test de herhangi bir besine karşı sadece sensitizasyonu gösteriyor olabilir. Süt ve yumurta gibi besin allerjileri yaşa bağlı olarak kaybolabilir, besin provokasyon testleri sayesinde besin allerjisinin seyri izlenebilir. IgE aracılı olmayan besin allerjisinde besin spesifik IgE tanıda yararlı olmadığından tek kesin tanı yöntemi oral besin provokasyon testidir. Özellikle IgE aracılı besin allerjilerinde, ağır atopik dermatitte ve enterokolit sendromunda oral besin provokasyon (yükleme, “challenge”) testleri sırasında ağır reaksiyonların gelişebilme riski vardır. Bu nedenle IgE aracılı besin allerjisi şüphesinde besin “challenge” testleri kesinlikle evde yapılmamalıdır. Allerji uzmanı gözetiminde ve ortaya çıkabilecek reaksiyonlara önlemler alınarak mutlaka hastanede gerçekleştirilmelidir. Besin provokasyon testleri açık, kapalı ve plasebo kontrollü olarak uygulanabilmekte olup en ideal şekli çift kör ve plasebo kontrollü besin provokasyon testleridir (58,59,60,61).

2.8. Western Blot

Western Blot, proteinlerin yanı sıra proteinler üzerindeki translasyon sonrası modifikasyonların tanımlanmasını ve karakterizasyonunu sağlayan önemli bir yöntemdir. İlk kez 1979 yılında Towbin ve arkadaşları tarafından kullanılan bu yöntemde hedef protein hakkında kantitatif veya yarı kantitatif veriler elde edilebilir. Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile proteinler ayrıştırılır ve elektroforetik olarak nitroselülöz veya poliviniliden florür (PVDF) membrana aktarılır. Ardından ilgilenilen proteinin görselleştirilebilmesi için işaretlenmiş özel bir antikorla inkübe edilir. Bağlanmayan antikorlar yıkama işlemiyle uzaklaştırılır. Görünür bantın kalınlığı var olan proteinin miktarıyla ilgilidir (62,63,64,65).



Şekil 2.4. Western blot yönteminin şematik gösterimi. (61)

Proteinlerin jelden membrana transferi jelin yapısına, transfer edilen proteinlerin moleküler kütesine ve kullanılan membrana bağlı olarak değişmektedir. Nitroselülöz ve PVDF (poliviniliden diflorür) proteinleri tutmak için başarıyla kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan nitroselülöz membranın proteinlerin kovalent olarak bağlanamaması ve kuruyken kırılabilir olması nedeniyle dezavantajlı olduğu düşünülmektedir. Küçük proteinler nitroselülöz membran boyunca hareket etme eğilimindedir ve toplam protein miktarının yalnızca bir kısmı bağlanabilmektedir.

Daha küçük porlara sahip membran kullanımı bu durumu engelleyebilmektedir. PVDF membranlar yüksek protein bağlama kapasitesi, fiziksel dayanıklılık ve kimyasal stabilite nedeniyle daha avantajlı görünmektedir. Ayrıca nitroselülöz membran Coomassie ile boyanamazken, PVDF membran boyamaya uygundur. Proteinler jelden membrana 3 şekilde aktarılabilir: Basit difüzyon, vakum destekli çözücü transferi, elektroblotlama.

Basit difüzyon: Zarın üstüne bir yığın kuru filtre kağıdı gelecek şekilde jelin yüzeyine bir zar yerleştirilir. Difüzyon sürecini kolaylaştırmak için genellikle bir cam levha veya belirli bir ağırlığa sahip nesne yerleştirilir. Bu protokol, kantitatif protein transferi olmaması nedeniyle yaygın kullanılmamaktadır. İmmüblotlamaya kıyasla total proteinin %25-50'sini membrana aktarabilmektedir.

Vakumlu kurutma: Basit bir blotlama yöntemidir. Hem düşük hem de yüksek moleküler ağırlıklı proteinler bu yöntem kullanılarak transfer edilebilmektedir. Ayrılmış polipeptitleri jelden nitroselülöz membrana aktarmak için bir levha kurutucu sistemine bağlı bir pompanın emme gücüne dayanır. Düşük moleküler ağırlıklı proteinler kullanılırken, küçük gözenekli nitroselülöz membranlar kullanılmalıdır.

Elektroblotlama: En yaygın kullanılan prosedürdür. Transferin hızı ve tamlığı nedeniyle diğer yöntemlere göre daha avantajlı sayılmaktadır. Islak transfer ve yarı kuru transfer şeklinde gerçekleştirilir. Islak transferde sandviç elektrotlu bir tampon tankına yerleştirilir. Proteinleri jelden zara enine verimli bir şekilde aktarır. Yarı kuru transfer, transfer tamponu olarak sadece jel ve filtre kağıtlarında bulunan sıvı ve sandviçteki diğer pedler kullanılarak gerçekleştirilir. Jellerin daha kolay blotlanması, elektrotların ucuzluğu ve buna bağlı olarak transfer için daha az güce gerek olması avantajları arasındadır (66).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmamızda öncelikle susam ve/veya haşhaş alerjisi olan bireylerde alerjiden sorumlu olabilecek bantları göstermeyi hedefledik. Ayrıca bu tohumlara duyarlı olup alerjik olmayanları da çalışmamıza dahil ederek bant paternlerini inceledik. Bunun yanısıra inhibisyon testleri ile belirlenen susam ve haşhaş bantlarının hangilerinin inhibe edildiğini araştırmak istedik. Testlerde kullanılan susam ve haşhaş alerjenlerinin protein içerikleri SDS-PAGE yöntemiyle analiz edilmiştir. Son olarak, seçilen sağlıklı bir bireye uyguladığımız Western Blot yöntemi, deneyin doğruluğunu test etmemize olanak sağlamıştır.

3.1. Hasta Seçimi

GO 18/707 sayılı etik kurul kararının kriterine uygun şekilde 1. Gruba 8 hasta, Grup 2'ye 5 hasta, 3. Gruba 6 hasta aşağıdaki kriterlere göre seçildi. 2 yaş altı ve onam vermeyenler çalışmaya dahil edilmedi.

- 2-18 yaş aralığında olmak,
- doktor tanımlı besin alerjisi hastası olmak,
- susama ve/veya haşhaşa karşı deri prick testi pozitifliği göstermek

3.2. Besin Spesifik IgE Ölçümü

Alerji ve otoimmünite testi için tasarlanmış Phadia 100 cihazıyla İmmunoCAP sistemi kullanılarak seçilen hastaların spesifik IgE ölçümleri yapılmıştır. Bu testle kalitatif (pozitif/negatif), semikantitatif (klas 0/1/2/3/4/5/6) ve kantitatif (kU/L, ng/ml) sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar; 0-0,34 kU/L class 0, 0,35-0,70 kU/L class 1, 0,71-3,5 kU/L class 2, 3,51-17,50 kU/L class 3, 17,51-50 kU/L class 4, 50-100 kU/L class 5, >100 kU/L class 6 skorlamasına göre değerlendirilmiştir. 0,35 kU/L ve üzerinde olanlar pozitif kabul edilmiştir.

3.3. Deri Testi

Hastalara Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Allerji Bilim Dalı'nda hindistan cevizi, kivi, çörekotu, hardal, karabuğday, yulaf, soya fasulyesi, bakla, keten tohumu, çavdar, fındık, fıstık, badem, ceviz, pekan cevizi, kaju, Antep fıstığı, ay çekirdeği, kinoa, chia, kabak çekirdeği, susam, haşhaş ve tahin alerjenlerinin yer aldığı 2 yaş üstü deri prick testi uygulandı. Kutanöz reaktivitedeki değişkenliklerden dolayı her cilt testi değerlendirmesine negatif ve pozitif kontroller eklendi. Negatif kontrol olarak % 0,9 serum fizyolojik, pozitif kontrol olarak 10 mg/ml histamin kullanıldı. DPT, ön kolun volar yüzeyine her test ekstresinden ve kontrol çözeltisinden 2 cm veya daha fazla uzak olacak şekilde yerleştirildi. Hipodermik iğne yardımıyla eğitim yukarı bakacak şekilde düşük bir açıyla epidermal yüzeye uygulandı. Çözeltilerin karışmasını önlemek için ayrı uçlar kullanıldı. Reaksiyon cevabı 10-20 dakika sonra milimetre kuralıyla ölçüldü. Kabarcığın en uzun çapı ve buna dik en uzun çapı toplanıp 2ye bölünerek kaydedildi.

3.4. Hasta Gruplarının Oluşturulması

3 ayrı çalışma grubu oluşturuldu.

Grup 1. Susam alerjik hastalar (provokasyon testinde susam allerjik olan susam spesifik IgE ve susam deri prick testi pozitif) 8 hasta.

Grup 2. Susam alerjik ve Haşhaş sensitize hastalar (provokasyon testinde susam alerjisi olup haşhaşı tüketebilen hastalar; susam ve haşhaş spesifik IgE ve susam ve haşhaş deri prick testi pozitif), 5 hasta

Grup 3. Susam ve Haşhaş alerjik hastalar (provokasyon testinde susam ve haşhaş tüketemeyen hastalar susam ve haşhaş her iki spesifik IgE ve deri prick testi pozitif). 6 hasta

Tablo 3.1. Hasta gruplarının belirlenmesinde kullanılan parametreler.

	SPESİFİK IgE SUSAM HAŞHAŞ		DERİ PRİCK TESTİ SUSAM HAŞHAŞ		BESİN PROVOKASYON TESTİ SUSAM HAŞHAŞ	
	+	-	+	-	+	x
GRUP 1	+	-	+	-	+	x
GRUP 2	+	+	+	+	+	x
GRUP 3	+	+	+	+	+	+

Hastalara gerekli işlemler Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Pediatrik Allerji Bilim Dalında gerçekleştirilmiştir.

3.5 Alerjen İzolasyonu

0,5 gram susam/haşhaş tartıldı. 30 ml buffer solüsyonunda besinin çözülmesi sağlandı. 2 gün oda ısısında 2 saat çalkalandı. Enjektör uyumlu filtre yardımıyla steril edildi. Gliserin eklendi. Protein miktar ölçümü yapıldı.

3.6. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Protein miktarları Bradford yöntemiyle ölçüldü. 1:4 oranında olacak şekilde (7ml boya + 28 ml su) boya hazırlandı. Protein standardı olarak 1 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml, BSA (Bovine Serum Albumin) çözeltileri kullanıldı. 1 ml boya ve standartlar, 20 µl susam veya 20 µl haşhaş ekstraktı karıştırıldı. 10 dakika karanlıkta inkübe edildi. 2şer tekrar olacak şekilde her bir kuyucuğa 300er µl eklendi. Spektrofotometrede 595 nm’de ölçüm yapıldı.

3.7. Coomassie Blue Boyama Yöntemi

Coomassie Brilliant Blue R250 0.25 gram, 10 ml glacial asetik asit ve 90 ml methanol karıştırılarak 100 ml boyama solüsyonu hazırlandı. Solüsyon tekrar kullanılabilir. Solüsyon tekrar kullanılabilir.

Boyama sonrası jeldeki boyanın uzaklaştırılması için 10 ml glacial asetik asit ve 90 ml methanol karıştırılarak 100 ml destaining solüsyon hazırlandı. (Staining solüsyondan farklı olarak Coomassie Brilliant Blue R250 içermemektedir.)

3.7.1. Jel Elektroforezi

4-12'lik Bis-Tris jele alerjenleri jele yüklemek için;

4 µl 4X Loading dye

1,6 µl Sample Reducing Agent

0,4 µl Distile su

10 µl Alerjen (susam alerjeni yada haşhaş alerjeni eklendi)

Toplam: 16 µl karışım hazırlandı.

Hazırlanan karışımlar 70°C 10 dakika denatüre edildi.

Denatüre edilen karışımlar %4-12 Bis-Tris jelin her kuyucuğuna 14 µl olacak şekilde yüklendi.

1X yürütme tamponu (25 ml 20X yürütme tamponu + 425 ml distile su) hazırlandı. Önce 60 V'da 15 dakika sonra 100 V'de 90 dakika boyunca yürütme işlemi gerçekleştirildi.

Jelin sırasıyla Marker-Susam-Haşhaş-Susam-Haşhaş kuyucuklarını içeren kısmı kesilerek çıkarıldı.

Jel boyama solüsyonunda 4 saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edildi.

Solüsyon uzaklaştırıldı. Jel 1-2 kere distile su ile yıkandı.

Destaining solüsyon eklendi ve 60 dakika boyunca inkübe edildi.

Elde edilen görüntü bir kayıt cihazıyla kaydedildi.

3.8. Western-Blot Yöntemi

3.8.1. Jel Elektroforezi

Alerjen ekstraktlarındaki proteinlerin ayrıştırılması için 4-12'lik Bis-Tris jeller kullanıldı. Alerjenler, yukarıda anlatıldığı gibi 4-12'lik Bis-Tris jellerde yürütüldü.

3.8.2. Proteinlerin Membrana Transferi

Transfer aşamasında 20X transfer tamponundan %10 metanol içeren 1X transfer tamponu hazırlandı. (40 ml 20X transfer tampon + 80 ml %100'lük metanol + 680 ml distile su = 800 ml karışım)

Jel büyüklüğüne göre kesilen 4 adet Watman kağıdı, 2 adet Transfer pad hazırlanan karışımla ayrı yerlerde ıslatıldı. PVDF membran kesilirken membrana temas edilmemesine dikkat edildi. PVDF membran transfer pad ve Watman kağıdından ayrı olarak membranın aktif hale gelmesi için önce 15-20 saniye %100'lük metanolde hemen sonrasında 1 dakika kadar hazırlanan karışımda bekletildi. Daha sonra transfer kasetine eksi kutuptan artı kutba doğru sırasıyla 1 adet transfer pad, 2 adet Watman kağıdı, jel, membran, 2 adet Watman kağıdı, 1 adet transfer pad aralarında boşluk kalmayacak şekilde yerleştirildi. Transfer cihazına yerleştirildi. Transfer sırasında jelin ve tamponun ısınmasını engellemek için cihazın arkasına buz dolu aparat konuldu. 2 saat boyunca 30 V'da transfer işlemi gerçekleştirildi.

3.8.3. Bloklama

Bloklama basamağında 10X TBS (24,23 gr Tris.HCl + 80,06 gr NaCl = 10X Tris Buffered Saline Stok Çözelti Ph 7.6) stok çözeltisinden 250 ml 1X TBS-T tamponu (25 ml 10X TBS stok çözeltisi + 225 ml distile su = 250 ml, %0,1 oranında Tween20) hazırlandı. Daha sonra 20 ml %5'lik BSA içeren TBS-T tamponu (20 ml

1X TBS-T tamponu, 1 gram BSA) hazırlandı. Proteinlerin transfer olduğu membran %5 BSA içeren TBS-T tamponu ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bloklandı.

3.8.4. Antikor- Antijen Bağlanması (Antikor İnkübasyonu)

Seçilen hasta serumları 1/10 oranında olacak şekilde PBS ile sulandırıldı. (200 ml hasta serumu + 1800 ml PBS = 2000 ml) PVDF membran üzerindeki her bir kuyucuk bir hastaya ait şeridi ifade edecek şekilde tek tek kesildi. PBS ile sulandırılmış hasta serumları kuyucukların üzerine eklenerek gece boyu +4 °C'de çalkalanarak inkübe edildi. Bu aşamada hasta serumunda jelle yüklenen allerjene özgü antikor üretilmişse antijen ve antikor birleşmesi gerçekleşmiş olacaktır.

Ertesi gün 4 defa 1X TBS-T ile 5 er dakika çalkalayıcıda yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra membranların üzerine %1 BSA içeren 1X TBS-T tamponuna zayıf bant varsa 1/1000 değilse 1/2000 oranında olacak şekilde HRP (Horseradish peroxidase) konjuge anti-IgE sekonder antikorunu ilave edildi ve 2 saat oda ısısında çalkalayıcıda inkübe edildi.

Süre sonunda tekrar 4 defa 1X TBS-T ile 5 er dakika çalkalayıcıda yıkama işlemi gerçekleştirildi.

3.8.5. Görüntüleme

Görüntüleme için ECL Plus Western Blotting Substrate içindeki ECL Plus Solüsyonu A ve ECL Plus Solüsyonu B hacimce 40:1 oranında karıştırıldı. Bu solüsyon üzerini kaplayacak şekilde membrana ilave edildi ve karanlık ortamda 5 dakika bekletildi. Sekonder antikora bağlı bulunan horseradish peroksidaz enziminin substratı indirgemesiyle oluşan ışımaya CCD (Charge-coupled device) kamera ile görüntülendi.

3.8.6. Analiz

Yürütme basamağında kullanılan Prestained Protein Markerın yardımıyla elde edilen her bir bantın yeri saptandı ve karşılaştırmalar yapıldı.

3.9. Çapraz Reaksiyonun İnhibisyon Yöntemi ile Gösterilmesi (İnhibisyon Deneyleri)

Kliniğimize susam alerjisi ile başvuran hastalarımızın bir kısmında aynı zamanda haşhaş alerjisi de olduğunu belirledik. Bu susam ve/veya haşhaş alerjisi olan çocuklarda çapraz reaksiyonları gösterebilmek için inhibisyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Farklı besinlere ait alerjenler arasındaki homolojiden kaynaklanan çapraz reaksiyonlarda hastada bir besine karşı oluşmuş olan antikor bir başka besine ait homoloji gösteren alerjenle bağlanarak alerjik reaksiyon oluşturabilmektedir. İnhibisyon deneylerinde çapraz reaksiyonu belirlemek için serum bir gece önce aralarında çapraz reaksiyon düşünülen alerjenler ile inkübe edilir. Eğer hastada A alerjenine karşı antikor var ise ve B alerjeni ile çapraz reaksiyon düşünülüyorsa serumun B alerjeni ile inkübe edilmesi antikorların B allerjeni ile birleşerek çökmesine neden olacaktır. Bu serum A alerjeni belirlemek için yapılan Western analizinde kullanıldığında içerdiği antikor miktarı azaldığı için antijenle olan bağlanmasında azalma ile sonuçlanacaktır. Susamla Haşhaş arasındaki çapraz reaksiyonu belirleyebilmek için aşağıdaki deney protokolü izlenmiştir.

İzole susam alerjisi hasta grubuna (Grup 1), çapraz reaksiyon gösterdiği düşünülen hasta grubuna (Grup 2), gerçek susam ve haşhaş alerjisi olan hasta grubuna (grup 3) inhibisyon deneyleri yapıldı.

-Deneye başlamadan 1 gece önce 200 µl hasta serumuna 10 µl alerjen eklendi. (1 hasta için; 200 µl hasta serumuna 10 µl susam allerjeni, 200 µl hasta serumuna 10 µl haşhaş allerjeni) 200'er µl hasta serumu da alerjen eklenmeden (işlem görmemiş şekilde) ayrıldı.

- Gece boyu +4 °C'de çalkalayıcıda inkübe edildi.
- Ertesi gün 4800 g'de 20 dakika santrifüj edildi.
- Santifüj sonrası serumun supernatantı alındı ve 1/10 PBS ile sulandırıldı.

4 µl 4X Loading dye

1,6 µl Sample Reducing Agent

0,4 µl Distile su

10 µl Alerjen (susam allerjeni, haşhaş allerjeni)

Toplam: 16 µl'lik karışım hazırlandı.

Yukarıdaki şekilde hazırlanan alerjen örnekleri 70°C'de 10 dakika denatüre edildi.

%4-12 Bis-Tris jele 1 kuyu Prestained Protein Marker, 2 kuyu susam alerjeni, 2 kuyu haşhaş alerjeni olacak şekilde yüklendi ve önce 60 V'da 15 dakika sonra 100 V'da yaklaşık bir buçuk saat yürütme işlemi yapıldı.

-Yürütme basamağının ardından bölüm 3.8.2'de anlatıldığı gibi alerjenler jelden membrana transfer edildi.

-Bloklama için %5 BSA içeren 1X TBS-T tamponu hazırlandı. Membran bloklama solüsyonu ile 1 saat 240 rpm'de oda ısısında inkübe edildi.

-Prestained protein ladder, susam ve haşhaş alerjeni içeren kuyucuklar kesildi. Haşhaş alerjeni içeren bir kuyu muamele görmemiş hasta serumu, bir kuyu susam alerjeni ile muamele edilmiş hasta serumu ile ve susam alerjeni yürütülmüş olan bir kuyu muamele görmemiş hasta serumu, diğer kuyu haşhaş alerjeni ile muamele edilmiş hasta serumu olacak şekilde serumlar membranların üzerine aktarıldı.

-Gece boyu +4°C'de çalkalayıcıda 240 rpm'de inkübe edildi.

-Ertesi gün yukarıda belirtildiği şekilde membran yıkandıktan sonra üzerine HRP (Horseradish peroxidase) konjuge anti-IgE sekonder antikoru ilave edildi ve 2 saat oda ısısında çalkalayıcıda inkübe edildi.

-Süre sonunda tekrar 4 defa 1X TBS-T ile 5'er dakika çalkalayıcıda yıkama işlemi gerçekleştirildi.

-Yukarıda bölüm 3.8.5'te anlatıldığı şekilde görüntüleme yapıldı.

13 numaralı hastaya belirtilen yöntemle İnhibisyon deneyi yapıldı. Daha sonra gruplardaki hastaların serumlarından havuzlar oluşturularak inhibisyon deneylerine devam edildi.

Grup 1. 25'er µl X 4 (4 ayrı koşul için) = 100'er µl serum

Grup 2. 40'ar µl X 4 (4 ayrı koşul için) = 160'ar µl serum

Grup 3. 33'er µl X 4 (4 ayrı koşul için) = 132'şer µl serum

Oluşan bu havuzlara inhibisyon deneyi uygulanarak çapraz reaksiyonun varlığı araştırıldı.

4. BULGULAR

4.1. Hastalarla İlgili Veriler

Hastalara ait ad-soyad, tanı, yaş, cinsiyet, total IgE, spesifik IgE, deri prick testi verileri Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Hastalara ait klinik veriler.

	Sıra	Adı Soyadı	Susam BPT	Haşhaş BPT	Yaş	Cinsiyet	Total IgE (UI/mL)	Susam Spesifik IgE (kU/L)	Susam DPT mm	Tahin DPT (mm)	Haşhaş Spesifik IgE (kU/L)	Haşhaş DPT (mm)
GRUP 1	1	A.B.	Pozitif	Negatif	2yıl6ay	K	766	150	7x5	7x4	Negatif	Negatif
	2	K.Ö.	Pozitif	Negatif	6yıl7ay	K	1014	51,4	20x16	13x10	Negatif	Negatif
	3	B.E.	Pozitif	Negatif	4yıl8ay	E	176	5,08	5x4	8x7	Negatif	Negatif
	4	A.B.K.	Pozitif	Negatif	2yıl9ay	E	127	0,56	7x5	5x5	Negatif	Negatif
	5	Ö.A.C.	Pozitif	Negatif	3yıl	E	514	15,6	10x8	10x5	Negatif	Negatif
	6	N.D.	Pozitif	Negatif	2yıl6ay	K	35,2	2,8	10x8	15x7	Negatif	Negatif
	7	E.E.K.	Pozitif	Negatif	2yıl9ay	E	1457	3,94	12x10	12x8	Negatif	Negatif
	8	E.E.A.	Pozitif	Negatif	3yıl6ay	K	1093	56,9	5x3	10x8	Negatif	Negatif
GRUP 2	9	M.İ.	Pozitif	Negatif	5yıl2ay	E	52,3	0,33	6x5	5x4	0,79	Negatif
	10	Y.E.Y.	Pozitif	Negatif	6yıl10ay	E	870	21	10x8	20x8	0,52	5x5
	11	A.G.	Pozitif	Negatif	16yıl	E	698	3,18	10x10	8x5	2,84	Negatif
	12	B.G.	Pozitif	Negatif	3yıl7ay	E	105	13,1	25x15	30x16	1,12	5x4
	13	H.E.Z.	Pozitif	Negatif	2yıl9ay	E	2515	132	9x9	11x11	14	6x6
GRUP 3	14	E.E.S.	Pozitif	Pozitif	2yıl11ay	E	119	1,51	6x6	14x10	0,68	14x10
	15	F.K.	Pozitif	Pozitif	4yıl8ay	K	409	7,57	10x9	20x13	2,73	15x12
	16	Y.E.B.	Pozitif	Pozitif	17yıl8ay	E	4925	58,6	16x8	18x12	33,22	15x13
	17	C.Ö.	Pozitif	Pozitif	16yıl	K	152	4,09	4x4	7x5	4,94	10x10
	18	F.Ş.	Pozitif	Pozitif	4yıl	E	185	4,3	7x7	9x8	1,38	5x4
	19	A.D.	Pozitif	Pozitif	4yıl	K	71,1	4,62	6x5	10x6	7,53	14x13

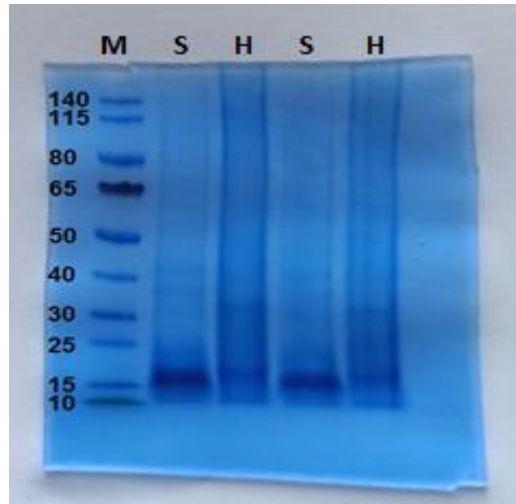
Analizler IBM SPSS Statistics 21 version paket programı ile yapıldı. Çalışma kriterlerine göre çalışmaya toplam 19 hasta alındı. Hastaların %63'i erkek, %37'i kadın hastalardan oluşmaktadır. Hastaların medyan yaşı 4 idi. Medyan değerleri Total IgE için 804,4 UI/mL, susam spesifik IgE için 5,08 kU/L, haşhaş spesifik IgE için 0,68 kU/L olarak hesaplanmıştır. Hastaların OFC sonuçları susam için %100, haşhaş için ise %32 pozitif saptanmıştır. Deri prick testi medyan değerleri ise susamın 9, tahinin 9, haşhaşın 2,25 olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.2. Hasta sayılarının gruplara göre dağılımı.

GRUP 1	8 Hasta
GRUP 2	5 Hasta
GRUP 3	6 Hasta

4.2. Coomassie Blue Boyama Yöntemiyle Susam ve Haşhaş Ekstraktlarından Elde Edilen Alerjenlerin Bant Paternleri

Öncelikle susam ve haşhaş ekstraktlarının protein içeriklerini göstermek için Coomassie Blue boyandı. Coomassie Blue Staining Yöntemiyle susam ve haşhaş ekstraktlarındaki proteinler boyanarak görünür hale getirildi. (Şekil 4.1) Yöntemde susam ve haşhaş ekstraktları, deneyin kontrolünün sağlanması açısından ikişer tekrar (Marker-Susam-Haşhaş-Susam-Haşhaş) olacak şekilde boyanmıştır.



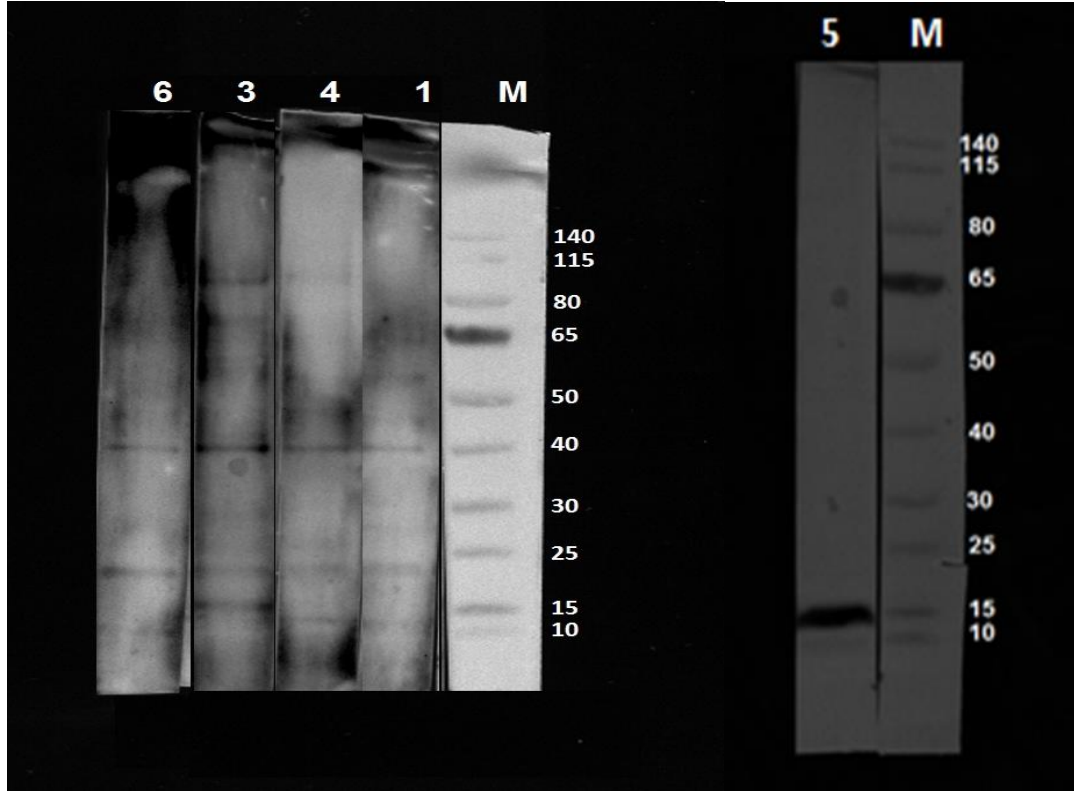
Şekil 4.1. Susam ve Haşhaş ekstraktlarının Coomassie Blue Staining Yöntemiyle analizi (Marker - Susam ekstraktı - Haşhaş ekstraktı - Susam ekstraktı - Haşhaş ekstraktı).

4.3. Hastalara Ait Western Blott Görüntüleri

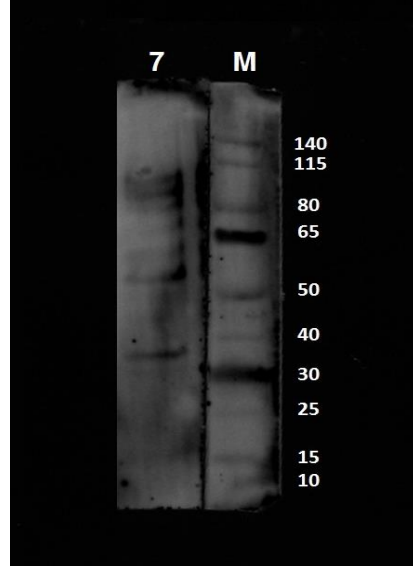
4.3.1. Grup 1

Susam alerjik hastalar (susam duyarlılığı yanında provokasyon testi ile susam alerjisi gösterilen hastalar) Western Blot yöntemiyle hastaların 4'ünde (3, 4, 7, 8 numaralı hastalar) 80-115 kDa aralığında; hastaların 3'ünde (2, 3, 8 numaralı

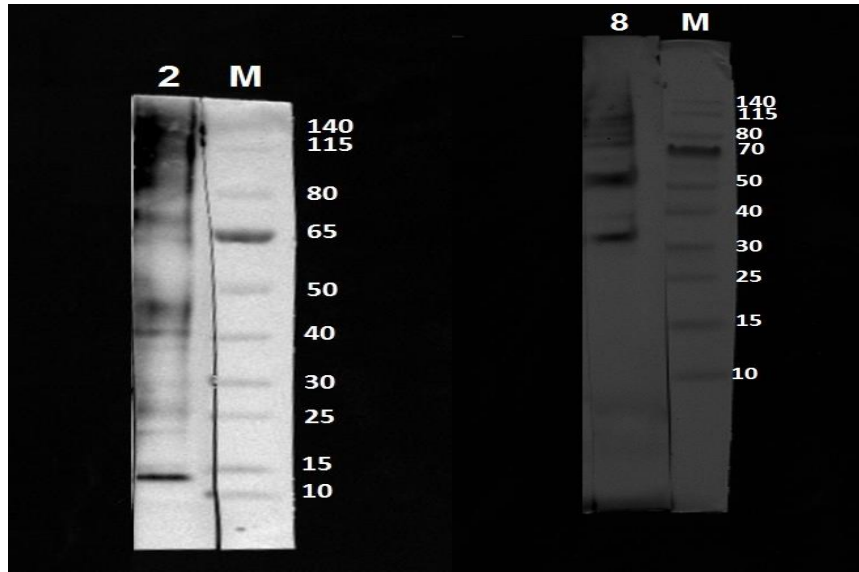
hastalar) 65-80 kDa aralığında; 1 hastada (2 numaralı hasta) yaklaşık 65 kDa; 4 hastada (1, 3, 7, 8 numaralı hastalar) yaklaşık 57 kDa; 5 hastada (1, 2, 3, 4, 6 numaralı hastalar) yaklaşık 40 kDa; 2 hastada (7 ve 8 numaralı hastalar) 35 kDa; 1 hastada (2 numaralı hasta) 25-30 kDa aralığında; 4 hastada (1, 3, 4, 6 numaralı hastalar) 22 kDa; 1 hastada (3 numaralı hasta) yaklaşık 17 kDa; 2 hastada (2 ve 5 numaralı hastalar) yaklaşık 15 kDa; 1 hastada (2 numaralı hasta) yaklaşık 45 kDa moleküler ağırlığında susama ait olduğu düşünülen bantlar tespit edilmiştir. (Şekil 4.2) (Şekil 4.3) (Şekil 4.4) Bu grup hastalarının haşhaş alerjisi bulunmadığından haşhaşa ait bant paternine rastlanmamıştır. (Şekil 4.5) (Şekil 4.6)



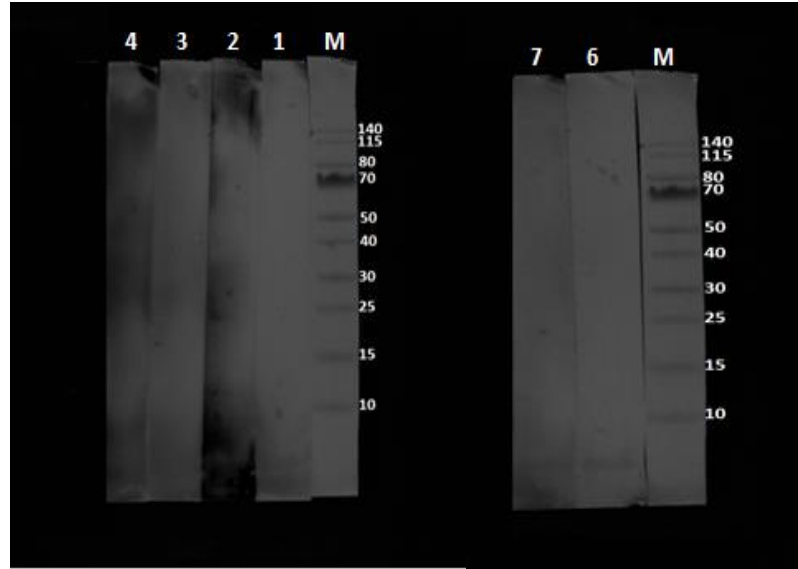
Şekil 4.2. Grup 1'in 6, 3, 4, 1 ve 5 numaralı hastalarında Western Blot yöntemiyle susam ile bağlanma gösteren bantlarının gösterilmesi (M : marker) 6 numaralı hastanın yaklaşık 22 kDa ve 40 kDa; 3 numaralı hastanın yaklaşık 17 kDa, 22 kDa ve 40 kDa, 57 kDa, 65-80 kDa ve 80-115 kDa aralığında; 4 numaralı hastanın yaklaşık 22 kDa ve 40 kDa 45 kDa, 80-115 kDa aralığında; 1 numaralı hastanın yaklaşık 22 kDa, 40 kDa ve 57 kDa; 5 numaralı hastanın yaklaşık 15 kDa moleküler ağırlığındaki bantları görülüyor.



Şekil 4.3. Grup 1'in 7 numaralı hastasında Western Blot yöntemiyle susam ile bağlanma gösteren bantların gösterilmesi. (M: Marker) 7 numaralı hastanın yaklaşık 35 kDa, 57 kDa ve 80-115 kDa aralığındaki bantları görülüyor.



Şekil 4.4. Grup 1'in 2 ve 8 numaralı hastalarında Western Blot yöntemiyle susam ile bağlanma gösteren bantların gösterilmesi (M: Marker) 2 numaralı hastanın yaklaşık 15 kDa, 25-30 kDa, yaklaşık 40 kDa, 45 kDa, 65 kDa, 65-80 kDa aralığındaki; 8 numaralı hastanın yaklaşık 35 kDa, 57 kDa, 70-80 kDa ve 80-115 kDa aralığındaki bantları görülüyor.



Şekil 4.5. İzole susam alerjisi olan Grup 1 hastalarının (4, 3, 2, 1, 7, 6 numaralı hastalar) haşhaşa alerjisinin olmadığına Western Blot ile gösterilmesi.

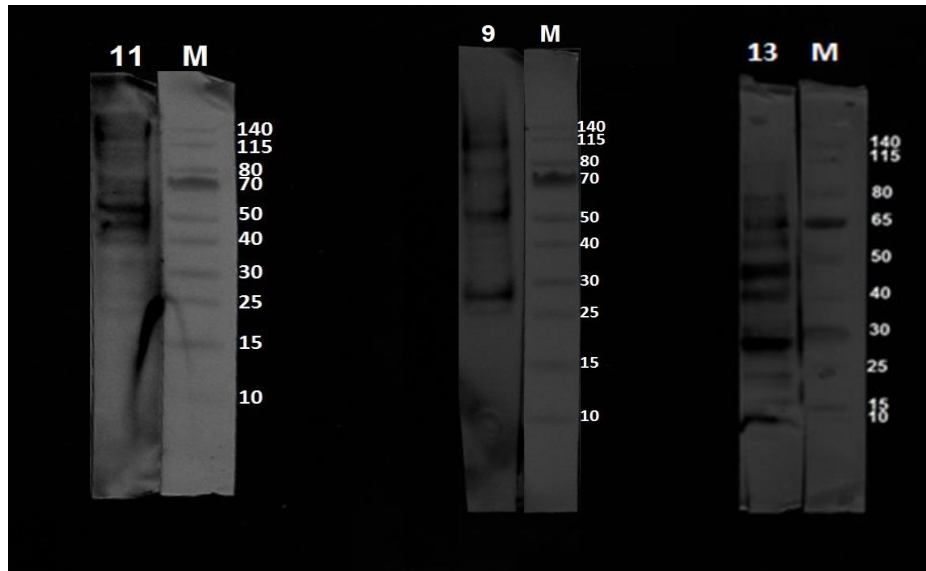


Şekil 4.6. İzole susam alerjisi olan Grup 1 hastalarının (5 ve 8 numaralı hastalar) haşhaşa alerjisinin olmadığına Western Blot ile gösterilmesi.

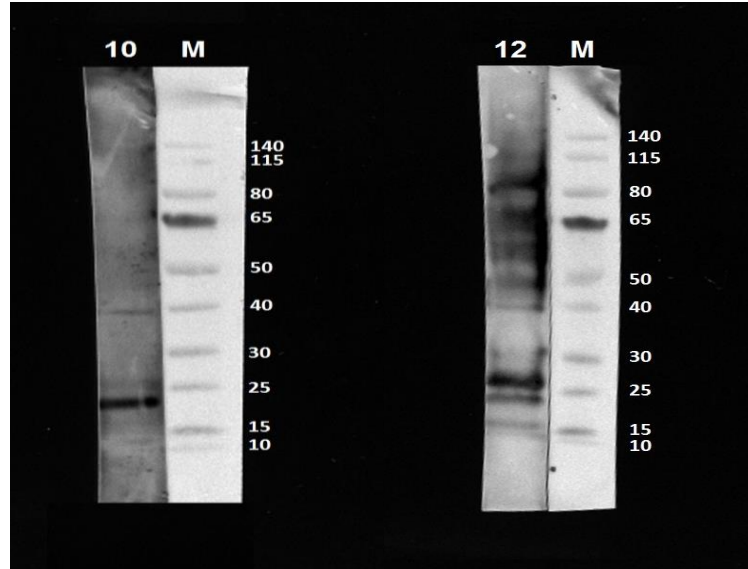
4.3.2. Grup 2

Susam alerjik ve Haşhaş sensitize hastalar (provokasyon testinde susam alerjisi olup haşhaşı tüketebilen hastalar susam ve haşhaş spesifik IgE ve susam ve haşhaş deri prick testi pozitif) : Western Blot yöntemiyle hastaların 2'sinde (9 ve 12 numaralı hastalar) 80-115 kDa aralığında; 3'ünde (9, 12 ve 13 numaralı hastalar) 65-80 kDa aralığında; 1 hastada (13 numaralı hasta) 65 kDa; 2 hastada (12 ve 13 numaralı hastalar) yaklaşık 57 kDa; 2 hastada (9, 11, 12 numaralı hastalar) yaklaşık

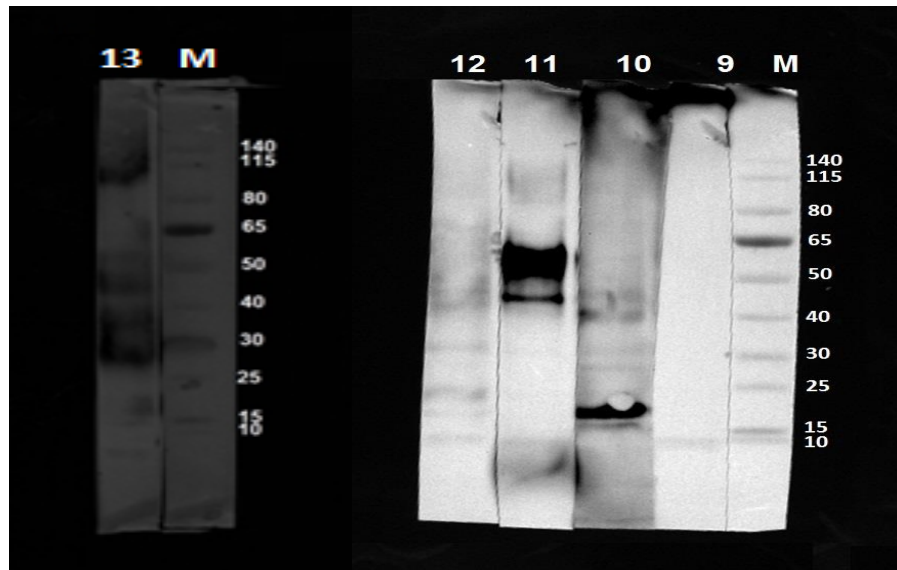
52 kDa; 2 hastada (11 ve 13 numaralı hastalar) yaklaşık 45 kDa; 4 hastada (10, 12, 11, 13 numaralı hastalar) yaklaşık 40 kDa; 3 hastada (9, 12 ve 13 numaralı hastalar) 28 kDa; 3 hastada (10, 12 ve 13 numaralı hastalar) 22 kDa; 2 hastada (12 ve 13 numaralı hastalar) yaklaşık 17 kDa moleküler ağırlığında susama ait olduğu düşünülen bantlar tespit edilmiştir. (Şekil 4.7) (Şekil 4.8) Bu grupta bulunan 9, 10 ve 12 numaralı hastaların susam bant paternleri standart deney uygulandığında oldukça zayıf görüntülenebildiğinden, hastaların özellikle susam bant paternlerini gösterebilmek için normale göre daha fazla miktarda serum kullanılmıştır. Western Blot yöntemiyle Grup 2 hastalarının 1'inde (13 numaralı hasta) 80-115 kDa aralığında; 1 hastada (11 numaralı hasta) 50-65 kDa aralığında; hastaların 4'ünde (10, 11, 12, 13 numaralı hastalar) yaklaşık 45 kDa; 1 hastada (10 numaralı hasta) yaklaşık 40 kDa; 1 hastada (13 numaralı hasta) yaklaşık 35 kDa; 2 hastada (10 ve 12 numaralı hastalar) yaklaşık 30 kDa; 2 hastada (10 ve 13 numaralı hastalar) yaklaşık 28 kDa; 1 hastada (10 numaralı hasta) yaklaşık 20 kDa; 1 hastada (10 numaralı hasta) yaklaşık 17 kDa; 1 hastada (9 numaralı hasta) yaklaşık 9 kDa; 1 hastada (12 numaralı hasta) yaklaşık 22 kDa moleküler ağırlığında haşhaşa ait olduğu düşünülen bantlar tespit edilmiştir. (Şekil 4.9)



Şekil 4.7. Grup 2'nin 11, 9 ve 13 numaralı hastalarında Western Blot yöntemiyle susam ile bağlanma gösteren bantların gösterilmesi. 11 numaralı hastanın yaklaşık 40 kDa, 45 kDa ve 52 kDa, 9 numaralı hastanın yaklaşık 28 kDa, 52 kDa, 70-80 kDa ve 80-115 kDa aralığındaki; 13 numaralı hastanın yaklaşık 9 kDa, 17 kDa, 22 kDa ve 28 kDa, 40 kDa, 45 kDa, 57 kDa, 65 kDa, 65-80 kDa aralığındaki bantları görülüyor.



Şekil 4.8. Grup 2'nin 10 ve 12 numaralı hastalarında Western Blot yöntemiyle susam ile bağlanma gösteren bantların gösterilmesi. 10 numaralı hastanın yaklaşık 22 kDa, 25 kDa, 40 kDa, 12 numaralı hastanın yaklaşık 17 kDa, 22 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 52 kDa, 57 kDa, 65-80 kDa ve 80-115 kDa aralığındaki bantları görülüyor.

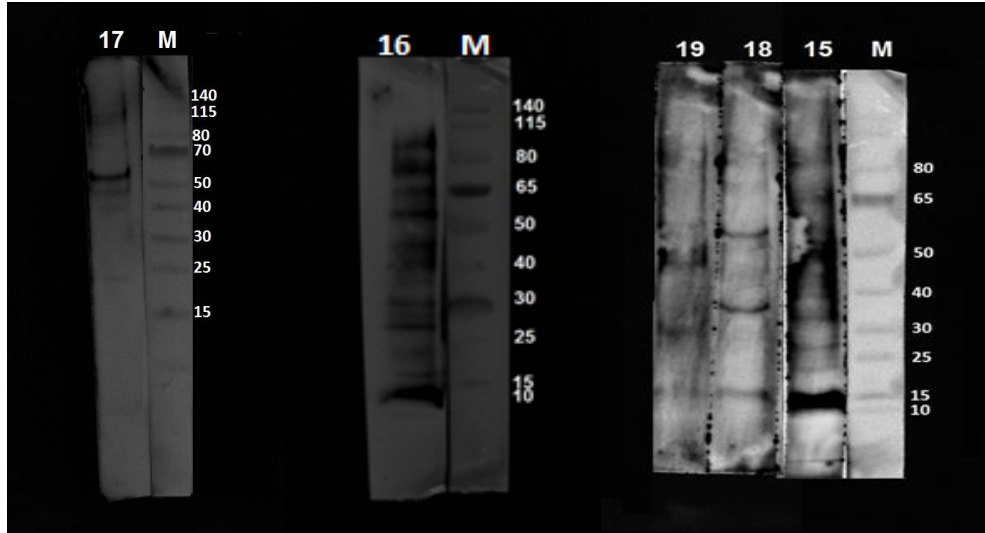


Şekil 4.9. Grup 2'nin 9, 10, 11, 12 ve 13 numaralı hastalarında Western Blot yöntemiyle haşhaş ile bağlanma gösteren bantlarının gösterilmesi. 12 numaralı hastanın yaklaşık 22 kDa ve 30 kDa, 45 kDa, 11 numaralı hastanın yaklaşık 45 kDa ve 50-65 kDa aralığındaki; 10 numaralı hastanın yaklaşık 17 kDa, 20 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 40 kDa ve 45 kDa; 9 numaralı hastanın yaklaşık 9 kDa; 13 numaralı hastanın yaklaşık 28 kDa, 35 kDa, 45 kDa, 80-115 kDa aralığındaki bantları görülüyor.

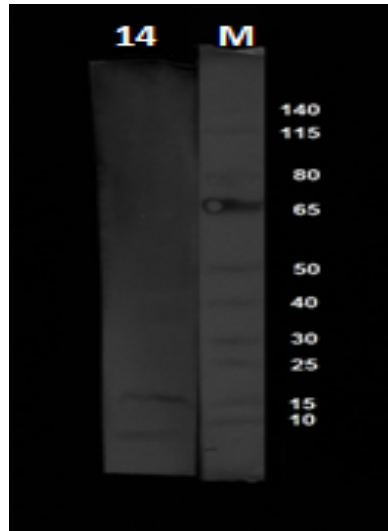
4.3.3. Grup 3

Susam ve Haşhaş alerjik hastalar (deri ve spesifik IgE ile susam ve haşhaş duyarlılığı olup provokasyon testinde hem susam hem haşhaş alerjisi bulunan hastalar) Western Blot yöntemiyle 2 hastanın (16 ve 17 numaralı hastalar) 80-115 kDa aralığında; 1 hastanın (16 numaralı hasta) 65-80 kDa aralığında; 2 hastanın (15 ve 16 numaralı hastalar) yaklaşık 65 kDa; 3 hastanın (16, 17 ve 18 numaralı hastalar) yaklaşık 57 kDa; 2 hastanın (15 ve 17 numaralı hastalar) yaklaşık 50 kDa; 3 hastanın (16, 17 ve 19 numaralı hastalar) yaklaşık 45 kDa; 2 hastanın (16 ve 17 numaralı hastalar) yaklaşık 40 kDa; 2 hastanın (15 ve 18 numaralı hastalar) yaklaşık 35 kDa; 2 hastanın (16 ve 19 numaralı hastalar) yaklaşık 30 kDa; 2 hastanın (15 ve 16 numaralı hastalar) 28 kDa; 3 hastanın (15, 16, 17 numaralı hastalar) yaklaşık 22 kDa; 2 hastanın (14 ve 16 numaralı hastalar) yaklaşık 17 kDa; 3 hastanın (15, 18 ve 19 numaralı hastalar) yaklaşık 15 kDa; 1 hastanın (16 numaralı hasta) yaklaşık 9 kDa susama ait olduğu düşünülen bantlar tespit edilmiştir. (Şekil 4.11) (Şekil 4.12)

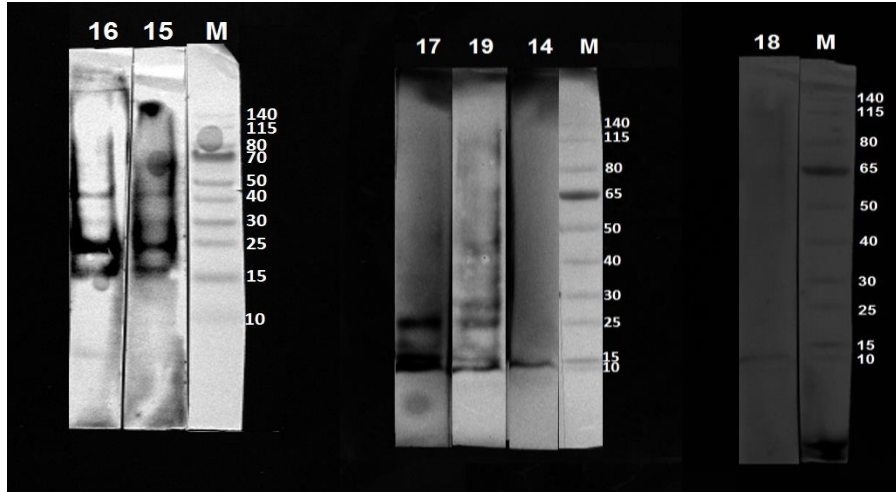
Western Blot yöntemiyle 3. Grupta 3 hastada (15, 16 ve 19 numaralı hastalar) yaklaşık 45 kDa; 1 hastada (19 numaralı hasta) yaklaşık 28 kDa; 4 hastada (15, 16, 17, 19 numaralı hastalar) yaklaşık 25 kDa; 4 hastada (15, 16, 17 ve 19 numaralı hastalar) yaklaşık 17 kDa; 3 hastada (14, 17 ve 19 numaralı hastalar) yaklaşık 14 kDa; 1 hastada (18 numaralı hasta) yaklaşık 10 kDa moleküler ağırlığında haşhaşa ait olduğu düşünülen bantlar tespit edilmiştir. (Şekil 4.13)



Şekil 4.10. Grup 3'ün 17, 19, 18, 15 ve 16 numaralı hastalarının Western Blot yöntemiyle susama bağlanma gösteren bantlarının gösterilmesi. 17 numaralı hastanın yaklaşık 22 kDa, 40 kDa, 45 kDa, 57 kDa, 80-115 kDa aralığındaki; 19 numaralı hastanın yaklaşık 15 kDa, 30 kDa ve 45 kDa; 18 numaralı hastanın yaklaşık 15 kDa, 35 kDa, 57 kDa, 15 numaralı hastanın yaklaşık 15 kDa, 22 kDa, 28 kDa, 35 kDa, 50 kDa, 65 kDa; 16 numaralı hastanın 9 kDa, 17 kDa, 22 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 45 kDa, 57 kDa, 65 kDa, 65-80 kDa ve 80-115 kDa aralığındaki bantları görülüyor.



Şekil 4.11. Grup 3'ün 14 numaralı hastasının susam bantlarının gösterilmesi. 14 numaralı hastanın yaklaşık 17 kDa moleküler ağırlığındaki bantı görülüyor.

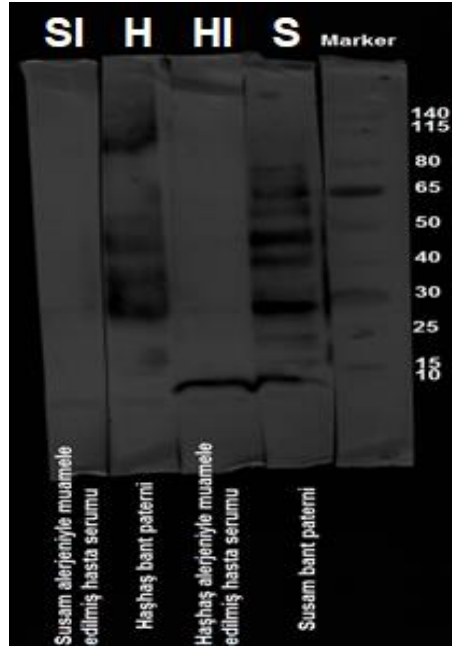


Şekil 4.12. Grup 3'ün 16, 15, 17, 19, 14 numaralı hastalarının Western Blot yöntemiyle haşhaşa bağlanma gösteren bantlarının gösterilmesi. 15 ve 16 numaralı hastaların yaklaşık 17 kDa , 25 kDa, 45 kDa; 17 numaralı hastanın yaklaşık 14 kDa, 17 kDa ve 25 kDa; 19 numaralı hastaların yaklaşık 14 kDa, 17 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 45 kDa; 14 numaralı hastanın yaklaşık 14 kDa; 18 numaralı hastanın yaklaşık 9 kDa molekül ağırlığındaki bantları görülüyor.

4.4. İnhibisyon Deneyleri

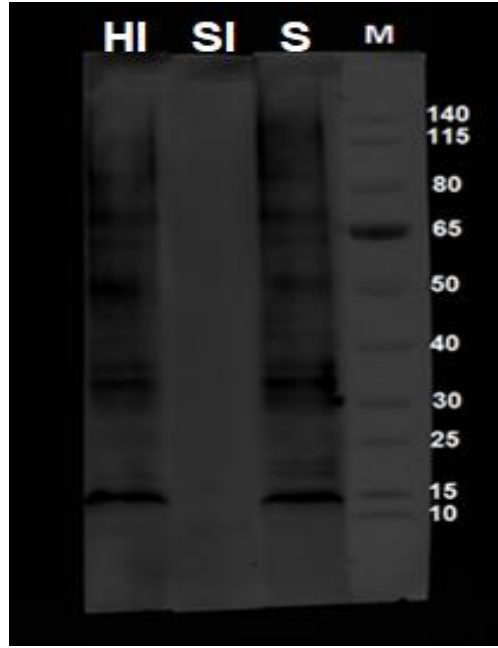
4.4.1. İnhibisyon Deneyinin Gösterilmesi

İnhibisyon deneyi için bir hasta (13 numaralı hasta) seçilerek deney düzeni oluşturuldu. Her gruba aynı düzen dahilinde inhibisyon deneyleri yapıldı. İlk kuyucuğa marker, ikinci kuyucuğa susam alerjeni yüklenmiş membrana; işlem görmemiş serum örneği, üçüncü kuyucuğa susam alerjeni yüklenmiş membrana; haşhaş ile muamele edilmiş serum, dördüncü kuyucuğa haşhaş alerjeni yüklenmiş membrana işlem görmemiş serum örneği, beşinci kuyucuğa haşhaş alerjeni yüklenmiş membrana susam ile muamele edilmiş serum örneği eklenerek inhibisyon deneyi kuruldu. İşlem görmemiş serum örneğindeki susam veya haşhaş bantları baz alınarak susam veya haşhaş ile muamele gören serum örneği karşılaştırılmış olup değişiklikler kaydedilmiştir. (Şekil 4.14) Western Blot yöntemiyle elde edilen 2. kuyucuktaki susam ve 4. kuyucuktaki haşhaş bantlarının muamele edilmiş serum örneğine göre yoğunluğunda azalma varsa inhibisyon görülmüştür şeklinde yorumlanmıştır.



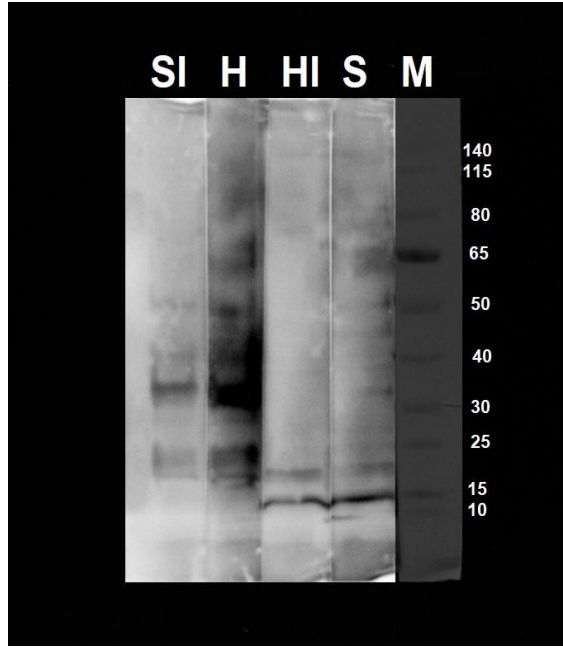
Şekil 4.13. 13 numaralı hastaya ait susam) ve haşhaş besini arasındaki çapraz reaksiyonun inhibisyon görüntüsü. (Marker (M) - Susam bantları (S)-Haşhaş antijeni ile muamele edilmiş serum (HI) -Haşhaş bantları (H) - Susam antijeni ile muamele edilmiş serum) (SI) 13 numaralı hastanın Western Blot yöntemiyle tespit edilen yaklaşık 9 kDa,17 kDa, 22 kDa ve 28 kDa, 40 kDa, 45 kDa, 57 kDa, 65 kDa, 65-80 kDa aralığındaki susam bantlarının hasta serumu haşhaş ile muamele edildiğinde 9 kDa moleküler ağırlığındaki susam bantı hariç ve 25-30 kDa ve 30-40 kDa aralığındaki, 45 kDa, 80-115 kDa aralığındaki haşhaş bantlarının hasta serumu susam ile muamele edildiğinde inhibe olduğu görülüyor.

Grup 1'deki 8 hastanın serumu birleştirilip havuz oluşturuldu. İnhibisyon deneyi bu havuza uygulandı. Western Blot yöntemiyle elde edilen susam bantlarının, susam alerjisi ile muamele edildiğinde kaybolduğu; haşhaş alerjisi ile muamele edildiğinde ise bantların yoğunluğunun değişmediği tespit edilmiştir. (Şekil 4.15) Deney neticesinde Grup 1 hastalarının serumu haşhaş antijeniyle muamele edildiğinde beklenildiği gibi susam bantlarının inhibe olmadığı gösterilmiştir.



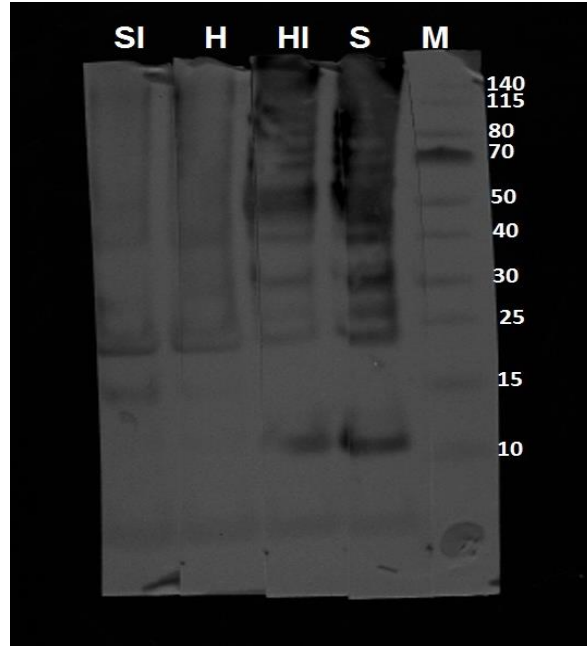
Şekil 4.14. Grup 1'deki hastaların serumlarından eşit hacimde alınarak karıştırılmasıyla oluşturulan havuzun inhibisyon görüntüsü. (Marker (M) -Susam bantları (S) - Susam antijeni ile muamele edilmiş havuz serumu (SI) - Haşhaş antijeni ile muamele edilmiş havuz serumu (HI)) Western Blot yöntemiyle elde edilen yaklaşık 15 kDa, 22 kDa, 35 kDa ve 40-50 kDa aralığındaki, 52 kDa, 50-65 kDa ve 65-80 kDa aralığındaki susam bantlarının, serum havuzu susam antijeni ile muamele edildiğinde tamamen inhibe olduğu, serum havuzu haşhaş antijeni ile muamele edildiğinde ise inhibe olmadığı görülüyor.

Grup 2'deki 5 hastanın serumları birleştirilerek havuz oluşturuldu. İnhibisyon deneyi oluşan bu havuza uygulandı. Western Blot yöntemiyle tespit edilen bazı susam bantlarının, serum haşhaş alerjeni ile muamele edildiğinde ve haşhaş bantlarının serum susam alerjeni ile muamele edildiğinde yoğunluğunun azaldığı belirlenmiştir. (Şekil 4.16)



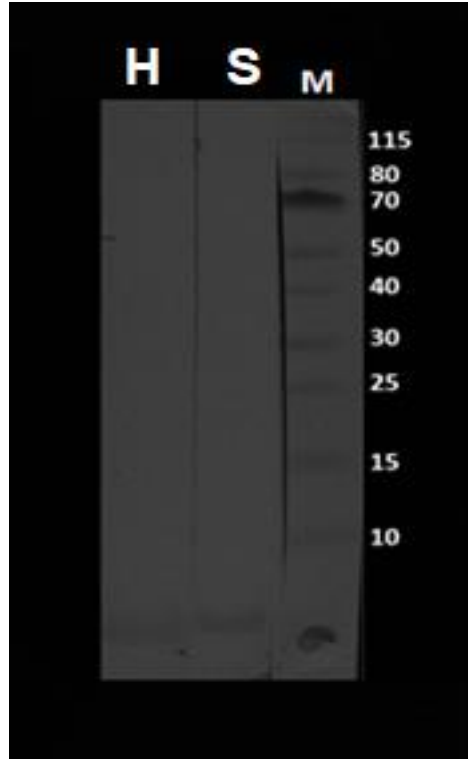
Şekil 4.15. Grup 2'deki hastaların serumlarından eşit hacimde alınarak karıştırılmasıyla oluşturulan havuzun inhibisyon görüntüsü. (Marker (M) - Susam bantları (S) - Haşhaş antijeni ile muamele edilmiş serum (HI) - Haşhaş bantları (H) - Susam antijeni ile muamele edilmiş serum (SI)) Western Blot yöntemiyle tespit edilen yaklaşık 35 kDa, 45 kDa, 52 kDa moleküler ağırlığındaki susam bantlarının inhibe olduğu ve yaklaşık 15 kDa ve 22 kDa moleküler ağırlığındaki suam bantlarının inhibe olmadığı görülüyor. Yaklaşık 20 kDa, 40 kDa, 50 kDa, 30-40 kDa aralığındaki haşhaş bantlarının kısmen, 50-65 kDa aralığındaki haşhaş bandın ise tamamen inhibe olduğu görülüyor.

Grup 3'te bulunan 6 hastanın her birinin serumundan eşit miktarda alınarak bir havuz oluşturuldu. Diğer gruplarda olduğu gibi oluşturan havuza inhibisyon deneyi uygulandı. Western Blot yöntemiyle tespit edilen susam bantlarının serum haşhaş alerjeni ile muamele edildiğinde kısmen inhibe olduğu; haşhaş bantlarının ise serum susam alerjeni ile muamele edildiğinde inhibe olmadığı bant yoğunluğunun durumundan tespit edilmiştir. (Şekil 4.18)



Şekil 4.16. Grup 3'deki hastaların serumlarından eşit hacimde alınarak karıştırılmasıyla oluşturulan havuzun inhibisyon görüntüsü. (Marker (M) - Susam bantları (S) – Haşhaş antijeni ile muamele edilmiş serum (HI) - Haşhaş bantları (H) - Susam antijeni ile muamele edilmiş serum (SI)) Western Blot yöntemiyle tespit edilen 10-15 kDa ve 22 kDa, 28 kDa, yaklaşık 30 kDa, 40 kDa, 45 kDa moleküler ağırlıktaki susam bantlarının kısmen inhibe olduğu, 15-25 kDa aralığındaki ve 40 kDa moleküler ağırlığındaki haşhaş bandının ise inhibe olmadığı görülüyor.

Deneylerin doğru çalıştığını görmek için alerjisi olmayan sağlıklı bir bireye Western Blot yöntemini uygulayarak susam ve/veya haşhaş alerjisinden sorumlu olan bantların bulunmadığı gösterildi. (Şekil 4.19)



Şekil 4.17. Sağlıklı bir kontrole ait Susam ve Haşhaş bant paternlerinin Western Blot yöntemiyle teşhisi. (Marker (M) – Susam bant paterni (S) – Haşhaş bant paterni (H)) Sağlıklı kontrol olarak seçilen bir bireyde susam ve haşhaş alerjisine neden olan bantların herhangi birinin bulunmadığı görülüyor.

5. TARTIŞMA

Çalışmamız sonucunda, susam duyarlılığı yanında provokasyon testi ile susam alerjisi gösterilen hastalardan oluşan Grup 1'deki 6 hastada daha önceden literatürde tanımlanmış yaklaşık 15 kDa, 17 kDa, 45 kDa ve 57 kDa; daha önceden literatürde tanımlanmamış 80-115 kDa, 65-80 kDa, 65 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 22 kDa, 25-30 kDa aralığına denk gelen susama ait olduğunu düşündüğümüz proteinlerin varlığını saptadık. (Şekil 4.2) (Şekil 4.3) (Şekil 4.4) Grup 1'de haşhaşa karşı deri prick testi ve haşhaş spesifik IgE pozitifliği bulunmadığından ve provokasyon testinde haşhaşı tüketebildiklerinden Western Blot analizinde 8 hastanın hiçbirinde, haşhaş alerjenlerine ait IgE reaktif herhangi bir bant paternine rastlanmamıştır. (Şekil 4.5) (Şekil 4.6) Yalnız susam alerjisi hastalarından oluşan bu gruba, hasta serumlarından eşit miktarlarda alınarak bir oluşturulan bir serum havuzu örneğinin önceden susam alerjisiyle ve haşhaş alerjisiyle ayrı ayrı inkübe edilmesi neticesinde inhibisyon deneyi yapılmıştır. (Şekil 4.14) Beklenildiği üzere serum havuzunun önceden susam alerjen ekstraktı ile inkübe edilmesi IgE reaktif susam alerjenik bantlarının tamamen inhibe olmasına neden olmuştur. Haşhaş alerjisiyle muamele edilen serum örneğinin bant paternlerinin yoğunluğunda bir değişiklik olmadığı için beklenildiği üzere inhibisyon olmadığı gösterilmiştir.

Susam alerjik ve Haşhaş sensitize hastalardan oluşan Grup 2'deki 5 hastada daha önceden literatürde tanımlanmış yaklaşık 9 kDa, 17 kDa, 45 kDa, 52 kDa ve 57 kDa; daha önceden literatürde tanımlanmamış 80-115 kDa, 65-80 kDa aralığında, yaklaşık 22 kDa, 25 kDa, 28 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 65 kDa moleküler ağırlığında susama ait olduğu düşünülen bantlar tespit edilmiştir. (Şekil 4.7) (Şekil 4.8) Grup 2 hastalarının daha önceden literatürde tanımlanmış yaklaşık 17 kDa, 20 kDa, 30 kDa, 40 kDa, 45 kDa; daha önceden literatürde tanımlanmamış 50-65 kDa, 35 kDa, 28 kDa, 22 kDa ve 9 kDa moleküler ağırlığında haşhaşa ait olduğu düşünülen bantları belirlenmiştir. 9 numaralı hastada yaklaşık 9 kDa moleküler ağırlığında bir bant gösterilmiş ancak literatürde haşhaşa ait bu büyüklükte bir bant bulunmadığından haşhaşın daha önce tanımlanmış küçük moleküler ağırlıklı (3 kDa, 4 kDa, 5 kDa) proteinlerinden birini bulundurabileceği düşünülmüştür. (Şekil 4.9) Western Blot'ın jel yürütmesi basamağı farklı tamponlarla yapılabilmektedir. MOPS Buffer, jelin ilk

sirasına yüklenen markerın büyük molekül ağırlıklı (yukarı) aralığını belirgin açarken, MES Buffer markerın küçük molekül ağırlıklı (aşağı) aralığını belirgin açmaktadır. Çalışmanın başlarında MOPS Buffer kullanılmış ancak küçük proteinleri daha iyi gösterebilme düşüncesiyle MES Buffera geçilmiştir. Aynı hastanın MES ve MOPS Bufferla yapılmış Western Blot görüntüleri arasında bu anlamda fark olabildiği anlaşılmıştır. Grubun inhibisyon deneyine göre susam alerjeninin yaklaşık 20 kDa, 40 kDa, 30-40 kDa ve 50-65 kDa aralığında gösterilen haşhaş bantlarını inhibe ettiği, haşhaş alerjeninin de 35 kDa, 45 kDa ve 52 kDa ağırlığındaki gösterilen susam bantlarını inhibe ettiği saptanmıştır. Aynı deney sonucunda 15 kDa ve 22 kDa moleküler ağırlığındaki susam bantlarının ise inhibe olmadığı belirlenmiştir. (Şekil 4.15) Diğer taraftan, bir hastanın haşhaş bandından biri (11 numaralı hastaya ait 50-65 kDa aralığındaki haşhaş bandı) grup inhibisyon deneyinde beklenildiği şekilde görülmediği fark edilmiştir. Bu nedenle gruptaki tüm hastalara ayrı ayrı inhibisyon deneyi yapılması uygun görülmüş ancak serum örneklerinin yetersiz olması nedeniyle tek tek inhibisyon yapılamamıştır.

Grup 3'teki 6 hastada daha önceden literatürde tanımlanmış yaklaşık 9 kDa, 15 kDa, 17 kDa, 45 kDa ve 57 kDa; daha önceden literatürde tanımlanmamış 80-115 kDa ve 65-80 kDa aralığında, 65 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 35 kDa, 30 kDa, 28 kDa ve 22 kDa aralığında susama ait olduğu düşünülen bantlar belirlenmiştir. (Şekil 4.10) (Şekil 4.11) Yine bu grupta haşhaşa ait olduğu düşünülen daha önce literatürde tanımlanmış yaklaşık 14 kDa, 17 kDa, 25 kDa, 45 kDa moleküler ağırlığında ve daha önceden literatürde tanımlanmamış yaklaşık 9 kDa ve 28 kDa moleküler ağırlığında bantlar tespit edilmiştir. (Şekil 4.12) Serum örneklerinin önceden haşhaş ve susam alerjisiyle ayrı ayrı inkübe edilerek susam ve haşhaş arasındaki çapraz reaksiyonu belirlemek için yapılan inhibisyon deneyleri neticesinde 10-15 kDa, 22 kDa, 28 kDa aralığındaki, 30 kDa, 40 kDa, 45 kDa moleküler ağırlığındaki susam bantlarının kısmen inhibe olduğu; 15-25 kDa aralığındaki ve 40 kDa moleküler ağırlığındaki haşhaş bantlarının ise inhibe olmadığı belirlenmiştir. (Şekil 4.16) Bu grup için haşhaş alerjeninin susam antikorlarını kısmen inhibe ettiği, susam alerjeninin ise haşhaş antikorunu inhibe etmediği yorumu yapılmıştır.

Haşhaş alerjenlerinin, literatürde protein ailesi belirtilmediğinden hastaların sonuçları kDa değeriyle yazılabilmektedir.

Deneilerin kontrolü olarak sağlıklı olduğu düşünülen (susam, haşhaş spesifik IgE ve deri testi pozitifliği bulunmayan) bir hastaya Western Blot yöntemi uygulanmış neticesinde herhangi bir bant paternine rastlanmamıştır. (Şekil 4.17)

Grup 1 hastalarında tespit edilen daha önce literatürde tanımlanmış 15 kDa ve 17 kDa moleküler ağırlığındaki bantların büyüklük itibarı ile Oleosin grubu alerjenlerden Ses i 4 ve Ses i 5 olduğu düşünüldü. Ses i 4 bu gruptaki hastaların %12,5' inde (1/8 hasta) görülürken; Ses i 5 %25'inde (2/8 hasta) görülmüştür. 45 kDa moleküler ağırlığında, büyüklük itibarı ile Vicilin benzeri Globulin protein ailesinden Ses i 3 olduğu düşünülen bant bu gruptaki hastaların %25'inde (2/8 hasta) belirlenmiştir. Bu grupta rastlanan ve literatürde tanımlanmış diğer alerjenik protein bandı olan 11S Globulin protein ailesinden Ses i 7 (57 kDa) ise hastaların %50'sinde (4/8 hasta) tespit edilmiştir. Grup 1'de belirlemiş olduğumuz ancak literatürde tanımlanmamış yaklaşık 22 kDa moleküler ağırlığındaki bant hastaların %50'sinde (4/8 hasta), yaklaşık 40 kDa moleküler ağırlığındaki bant hastaların %62,5'inde (5/8 hasta), 65-80 kDa aralığındaki bant hastaların %37,5'inde (3/8 hasta), 80-115 kDa aralığındaki bant hastaların %50'sinde (4/8 hasta), yaklaşık 35 kDa moleküler ağırlığındaki bant hastaların %25'inde (2/8 hasta), 25-30 kDa aralığındaki bant hastaların %12,5'inde (1/8 hasta), 65 kDa moleküler ağırlığındaki bant hastaların %12,5'inde (1/8 hasta) gözlenmiştir.

Grup 2 hastalarında tespit edilen daha önce literatürde tanımlanmış büyüklük itibarı ile 9 kDa moleküler ağırlığındaki bantı 2S Albumin protein ailesinden Ses i 1; 17 kDa moleküler ağırlığındaki bantın Oleosin protein ailesinden Ses i 4; 45 kDa moleküler ağırlığındaki bantın Vicilin benzeri Globulin protein ailesinden Ses i 3; 52 kDa ve 57 kDa moleküler ağırlığındaki bantın 11S Globulin protein ailesinden Ses i 6 ve Ses i 7 olduğu düşünülmektedir. Ses i 1 bu gruptaki hastaların %20'sinde (1/5 hasta), Ses i 4 hastaların %40'ında (2/5 hasta), Ses i 3 hastaların %40'ında (2/5 hasta), Ses i 6 hastaların %60'ında (3/5 hasta), Ses i 7 hastaların %40'ında (2/5 hasta) gösterilmiştir. Bu grupta belirlemiş olduğumuz ancak literatürde yer almayan

susama ait olduğu düşünölen yaklaşık 22 kDa ve 28 kDa moleköler ağırlığındaki bantlar hastaların %60'ında (3/5 hasta), yaklaşık 25 kDa, 30 kDa ve 65 kDa moleköler ağırlığındaki bantlar hastaların %20'sinde (1/5 hasta), yaklaşık 40 kDa moleköler ağırlığındaki bant hastaların %80'inde (4/5 hasta), 65-80 kDa aralığındaki bant hastaların %60'ında (3/5 hasta), 80-115 kDa aralığındaki bant hastaların %40'ında (2/5 hasta) gösterilmiştir. Grup 2'nin haşhaşa ait olduğu düşünölen daha önce literatürde tanımlanmış yaklaşık 17 kDa, 20 kDa ve 40 kDa moleköler ağırlığındaki bantları hastaların %20'sinde, yaklaşık 30 kDa moleköler ağırlığındaki bant hastaların %40'ında (2/5 hasta), yaklaşık 45 kDa moleköler ağırlığındaki bant hastaların %80'inde gösterilirken; daha önce tanımlanmamış haşhaşa ait olduğu düşünölen yaklaşık 9 kDa, 22 kDa, 35 kDa, 50-65 kDa ve 80-115 kDa aralığındaki bantlar hastaların %20'sinde (1/5 hasta), yaklaşık 28 kDa moleköler ağırlığındaki bant hastaların %40'ında (2/5 hasta) gösterilmiştir.

Susam ve haşhaş arasındaki çapraz reaksiyonu belirlemek için Western Blot ve inhibisyon deneyleri, 3. grupta bulunan 6 hastaya uygulandı. Grup 3 hastalarında tespit edilen daha önce tanımlanmış olan büyüklük itibarı ile 9 kDa moleköler ağırlığındaki bantın 2S Albumin grubu alerjenlerden Ses i 1, 15 kDa ve 17 kDa moleköler ağırlığındaki bantların Oleosin grubu alerjenlerden Ses i 5 ve Ses i 4, 45 kDa moleköler ağırlığındaki bantın 7S Vicilin benzeri Globulin grubu alerjenlerden Ses i 3, 57 kDa moleköler ağırlığındaki bantın 11S Globulin grubu alerjenlerden Ses i 7 olduğu düşünölmektedir. Ses i 1 bu gruptaki hastaların %16,6'sında (1/6 hasta), Ses i 5 hastaların %50'sinde (3/6 hasta), Ses i 4 hastaların %33,3'ünde, Ses i 3 ve Ses i 7 ise hastaların %50'sinde (3/6 hasta) görölmüştür. Bu grupta belirlemiş olduğumuz ancak literatürde tanımlanmayan susama ait olduğu düşünölen yaklaşık 28 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 65 kDa ve 80-115 kDa aralığındaki bantlar hastaların %33,3'ünde (2/6 hasta), yaklaşık 50 kDa ve 65-80 kDa aralığındaki bant hastaların %16,6'sında (1/6 hasta), yaklaşık 22 kDa moleköler ağırlığındaki bant hastaların %50'sinde (3/6 hasta) tespit edilmiştir. 3. Grubun haşhaşa ait olduğu düşünölen daha önce literatürde tanımlanmış 14 kDa ve 45 kDa moleköler ağırlığındaki bantları hastaların %50'sinde (3/6 hasta), 17 kDa ve 25 kDa moleköler ağırlığındaki bantları hastaların %33,3'ünde gösterilirken; daha önce tanımlanmamış

9 kDa ve 28 kDa moleküler ağırlığındaki bantları hastaların %16,6'sında (1/6 hasta) gösterilmiştir.

Yukarıda bant paternleri tartışılan 20 hastanın susam bantlarına bakıldığında literatürde tanımlanmış bantların yanısıra, henüz tanımlanmamış farklı büyüklükte bantlar da gösterilmiştir. Çalışma hastalarımızın, susama ait olduğu düşünülen bu farklı büyüklükteki proteinlere karşı antikor oluşturduğunu tahmin etmekteyiz. Bu bantların gelecekte susamın komponentleri arasında yer alacağı kanısındayız.

Alerjenler üzerine uluslararası bir terminoloji komitesi, susamdaki 3 proteini, (Ses i 1, Ses i 2, Ses i 3) alerjen olarak belirlemesine rağmen mevcut çalışmalar susam tohumunda çok daha fazla IgE bağlayıcı protein varlığını göstermektedir. Ses i 2 başlıca çözümlü protein olarak bilinmektedir ve toplam proteinin yaklaşık %25'ini oluşturmaktadır (47). Toplam proteinin yaklaşık %25 i olduğu bilinen Ses i 2 proteinini hiçbir hastamızda saptayamadık. Düşük kDa moleküler ağırlığa sahip proteinlerin jelde tutulmasının zor olduğu bilinmektedir. Çalışmamız kapsamında yapılan provokasyon testi sırasında susam ile anafilaksi geçiren hastalarımızda dahi Ses i 1 ve Ses i 2 proteinlerini gösterememiş olmamız bu nedene bağlanmıştır. Tohum depolama proteinlerine ait olan 2S Albuminleri, özellikle metiyonin ve sistein açısından zengin proteinlerdir. Bu Albuminlerin genleri, metiyonin içeriğini arttırmak için soya fasülyesi ve acı bakla gibi baklagillere aktarılmış sonucunda tohum depolama proteinleri güçlü alerjenler olarak tanımlanmıştır. Alerjenik proteinlerin, aminoasit sekansı bilinen alerjenleriyle karşılaştırılması proteinin varsayılan alerjenliği hakkında ipucu sağlayabilmektedir. Bilinen alerjenlerin sekans analizi önemli olup homoloji (benzerlik), çapraz reaktiviteye neden olabilmektedir. Susam proteinleri içeren gıdalara maruziyet sonucu oluşan spesifik IgE'yi saptamaya yönelik yapılan bir araştırmada 28 denekten yalnızca 6'sında 20-25 kDa ve 30-35 kDa aralığında bant gözlenmiş olup yapılan analizler bu proteinlerin susamın küçük alerjenleri olduğunu doğrulamıştır (67). Yetişkinlerde provokasyon testi ile doğrulanan susam alerjisini tahmin etmede SPT spesifik IgE ve diğer klinik parametrelerin değerlendirilmesinin yapıldığı bir çalışmada negatif spesifik IgE ve SPT düzeyleri olmasına rağmen bildirilmiş anafilaksilerin olması endişe verici olarak görülmüştür. Susam testlerinin zayıf duyarlılığı, test maddelerindeki ilgili

alerjenlerin bulunmamasından kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Leduc ve arkadaşları Ses i 4 ve Ses i 5'i major alerjen olarak tanımladılar ve Oleosinlere duyarlılığın daha şiddetli sistemik reaksiyonlara neden olduğunu belirttiler. SPT'lerin düşük performansı, ekstraktlarda Oleosinlerin azlığına bağlı olarak değişmiştir şeklinde açıklamada bulunmuşlardır. Susam kavrulduğunda proteinlerinin alerjenitesi değiştirebileceğinden tahinle SPT yapılmış ancak farklı sonuç elde edilemediği belirtilmiştir (48). Bir çalışmada 2 farklı markaya ait susam ekstraktı SPS-PAGE yöntemiyle analiz edilmiştir. Bühlmann ve Allergopharma marka susam tohumu ekstraktı arasında niceliksel olarak Bühlmann markada 12 protein fraksiyonu, Allergopharma marka susam tohumu ekstraktında ise yalnızca 5 protein fraksiyonu tanımlanabilmiştir. 2 farklı ekstrakt arasındaki bant yoğunluğundaki kalitatif fark, protein ekstraksiyonu ve saflaştırmadaki farklılıklardan veya test edilen alerjen ekstraktının farklı biyolojik aktivitesinden kaynaklanabilmektedir denilmiştir (68). Hastalardaki IgE reaktif allerjenik bantların western blot yöntemiyle araştırıldığı diğer çalışmalara kıyasla bu tez çalışmasında literatürde yer almayan bantlar belirlenmiştir. Bunun nedenlerinden birinin de kullanılan alerjen ekstraksiyon yöntemimizin etkin bir metod olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Kanny ve arkadaşları susam testlerinin zayıf hassasiyetinin Oleosinleri ortadan kaldıran bir işlemde kaynaklandığını tahmin etmektedirler (69). Spesifik IgE düzeyi ölçülerek susam alerjisi teşhisi, ekstraktlara veya majör alerjenlere dayanmaktadır. Ancak bu diğer gıdalara göre daha yüksek bir oranla negatif sonuçlara yol açar. Oleosinler, yağ vücut (body-oil) stabilize edici proteinler olup hidrofobik olmaları nedeniyle su bazlı özütlerde eksik olabilmektedir. Şiddetli reaksiyon geçirenler de dahil olmak üzere susam alerjisi olan hastaların %30'una kadarı ticari mevcut tanısal kitlerle teşhis edilememektedir. Oleosinlerin, duyarlı hale getirilmiş susam alerjisi hastalarının %17'sinde açıkça tanınabildiğini ancak susam ekstraktı ve Ses i 1 ile karşılaştırıldığında özellikle saptanabilir IgE duyarlılığı olmayan hastalarda ek tanısal değeri olmadığı gösterilmiştir (70). Western analizi neticesinde taradığımız 20 hastanın 15'inde Ses i 4 veya Ses i 5 (Oleosin protein ailesinden) proteinlerini saptadığımız için kullanılan ekstraktın içeriğinde Oleosin bulunduğu yorumunu yapabilmekteyiz. Şekil 3.5'e göre hazırlanan alerjen ekstraksiyonun protein miktarı ölçüldüğünde total miktarın yüksek olduğu belirlense de içeriğinde hangi çeşit

proteinlerin olduğu ve hangi proteinden ne kadar bulunduğu bilinmemektedir. Yapılan Coomassie Blue boyama yöntemiyle (Şekil 4.1) ekstraktlardaki protein içeriği gösterilmek istenmiştir. Susam ve haşhaşa ait küçük proteinler (Sesi 1, Sesi 2) jel boyama yöntemiyle ne yazık ki gösterilememiştir. Susam alerjisinin majör alerjenin küçük moleküler ağırlıkta, haşhaş alerjisinin majör alerjeninin büyük moleküler ağırlıkta olduğu bilinmektedir. Bu ayırım haşhaş içeriğindeki küçük proteinlerin gösterilememiş olması haşhaş alerjik hastalar açısından daha az sorun teşkil edebilecekken, susam içeriğindeki küçük proteinlerin gösterilememiş olması alerjinin teşhisinde problem yaratabilecektir. Sesi 1'in ve Sesi 2'nin susam alerjisinin teşhisinde çapraz reaksiyonu ve alerjiden sorumlu asıl besini belirlemede önemli rol oynadığı bilinmektedir. Fermente edilmiş ve fermente edilmemiş susama SDS-PAGE yöntemi uygulanmış fermentasyondan sonra susam alerjenlerinin küçük peptitlere indirgendini göstermişlerdir. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda genetik modifikasyon ve ısı işlem gibi yöntemlerle alerjenlerin kontrolü bildirilmiştir. Ancak Sesi 1'in yapısal olarak çok kararlı bir yapıda olduğu ve ısı işlemlerle bozulmadığı bilinmektedir. Susam fermentasyonu antioksidan ve biyoaktif bileşikler arttırmakla kalmayıp alerjenliği de etkili bir şekilde azaltmaktadır (71). Ağır alerjik hastalarda tüketilebilecek yeterli susam miktarının saptanması için poliklonal antikorlara duyarlı ve spesifik bir ELİSA oluşturulabileceğiyle ilgili çalışmalar yapan bir araştırmada siyah ve beyaz susam ekstraktında bulunan tüm ana protein bantlarının iyi reaksiyon gösterdiği belirtilmiştir. Yalnız 20-60 kDa aralığında bulunan siyah susam ekstraktındaki proteinlerin daha az reaktif olduğu gözlenmiştir (51). Belirtilen bu küçük fark nedeniyle susam ekstraktı hazırlanırken kahverengi susam tercih edilmiştir. ABD'de susam alerjisi olan 20 hasta ile yapılan bir çalışmada IgE'nin susam tohumu proteinlerine 7-78 kDa aralığında bağlandığını saptadılar. Örnekleme 12 Fransız hastasından oluşan bir çalışmada 14-25 kDa aralığındaki proteinlerin önemli IgE bağlayıcı proteinler olduğu gözlemlenmiştir. Susam alerjisi olan 32 kişilik bir Fransız popülasyonunda 15-17 kDa Oleosin olarak bilinen iki önemli susam alerjeni tanımladılar. 2S Albümin ve Oleosinlerin Western Blotta yüksek reaktivite gösteren bantlar olarak belirlendiğini ve bu nedenle Sesi 1, ve Sesi 4'ün reaktiviteye neden olan allerjenler olduğunu düşündüklerini belirtmişlerdir (51). Çalışmadan elde edilen verilerle Oleosinlerin, 7S Vicilin benzeri

Gobulinin ve 11S Globulinin haşhaş alerjisiyle inhibe olduğu tespit edilmiştir. Beyer ve arkadaşlarının bir çalışmada susam alerjisi hastalarının çoğunun 7S ve 11S Globulinlere belirgin IgE bağlanması sergilediğini, Ses i 2'yi ise yalnızca %30 oranında bağlandığını kanıtladılar (72,73). 10 İtalyan susam hastasında Pastorello ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise hasta serumları 2S Albumine karşı pozitiflik gösterdiler (74). Asero ve arkadaşlarının 2014 yılında 10 susam alerjisi hastalarla yaptığı bir çalışmada tüm hastaların yaklaşık 20 kDa moleküler ağırlığında bir susam alerjenine karşı IgE reaktivitesi gösterdiğini bildirdiler. Ek olarak 7'sinin 32 kDa moleküler ağırlığında oldukça yüksek IgE reaktivitesi gösterdiğini, 7'sinin 28 kDa moleküler ağırlığında bir alerjene reaksiyon gösterdiğini ancak 6'sında reaksiyonun nispeten daha zayıf olduğunu bildirdiler. 8 hastanın 48 kDa moleküler ağırlığında ve 5 hastanın da 67 kDa moleküler ağırlığında IgE reaktivitesi olduğunu açıkladılar. 2 serumun yaklaşık 43 kDa'da reaksiyon gösterdiği belirlenmiştir. Yalnızca 2 hastanın 2S Albuminlere karşılık gelen bölgeyi tanıdığı açıklanmıştır (75). İtalyan hastalarda belirlenen 32 kDa, 48 kDa, 43 kDa, 20 kDa, 28 kDa, 67 kDa molekül ağırlığındaki susam bantlarının, çalışmamız kapsamına alınan bazı hastalarımızda gösterilen bantlarla (yaklaşık 22 kDa, 28 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 45 kDa ve 65 kDa moleküler ağırlığındaki bant) benzer bantlar olabileceğini tahmin etmekteyiz. Bu çalışmada yer alan 19 susam provakasyon testi pozitif olan hastalarımızın % 52,6'sında (10/19 hasta) Asero ve ark çalışmasındaki 20 kDa bandına yakın olan yaklaşık 22 kDa büyüklüğündeki bant, % 36,8'inde (7/19 hasta) yaklaşık 28 kDa büyüklüğündeki bant, %21'inde (4/19 hasta) Asero ve ark çalışmasındaki 32 kDa yakın olan yaklaşık 35 kDa büyüklüğündeki bant, İtalyan hastalardaki 43 veya 48 kDa bantların yakın olan 40kDa bant hastalarımızın % 57,8'inde (11/19 hasta) ve 45kDa bant hastalarımızın % 26,3'ünde (5/19 hasta) tespit edilmiştir. IgE immünblotları üzerindeki bantlara karşılık gelen proteinlerin tanımlanması, tohumlarda birkaç tohum depolama protein varyantı bulunduğu ve çeşitli alerjenler ve bunların fragmanları immünblotta benzer pozisyonlarda görülebileceğinden karmaşık olabilmektedir (76). Susam alerjisinin teşhisinde reaksiyon olasılığının tahmin edildiği 90 çocuk hastadan oluşan 2019'da yayınlanmış bir çalışmada Ses i 1 spesifik IgE düzeyi ölçümü, pozitif OFC'yi tahmin etmede SPT'den daha etkili olduğu bulunmuştur. Çalışmada SPT için ticari olarak satılan

yalnızca tek çeşit ürün kullanılmasını (başka bir ticari susam ekstraktı ile denenememesini), Ses i 1-spesifik IgE'nin mevcut klinik kullanımının az olmasını çalışmanın kısıtlılıkları arasında göstermişlerdir (77).

Yalnızca birkaç çalışma haşhaş tohumu alerjenleri yer almaktadır. Haşhaş tohumuna duyarlı hastalardan alınan 11 serumdan 10'u majör alerjen olarak kabul edilen 45 kDa'daki proteine bağlanma gösterdi. Haşhaş tükettikten birkaç dakika sonra anafilaksi geçiren bir hastada 46 kDa moleküler ağırlığa sahip başka bir alerjen daha sonraki bir çalışmada gösterilmiştir (8). Çalışmaya dahil edilen ve haşhaş alerjisine sahip olan 12 hastanın 5'inde (10, 11,12,13,15, 16 ve 19 numaralı hastalar) haşhaşın majör allerjeni olan 45 kDa moleküler ağırlıktaki allerjen proteinine bağlanma tespit edilmiştir. Haşhaş tohumuna karşı reaksiyon yalnızca ağızdan olmamaktadır, inhalasyon yoluyla da olabildiği bilinmektedir (78). Haşhaş tohumu içeren yiyeceklerin tüketilmesinden sonra advers reaksiyon gösteren 11 hastanın serumuna yapılan IgE immünblotlama ile; 11 hastanın 10'u 45 kDa proteine, 4'ü 34 kDa proteine, 5'i 17 kDa proteine, 5'i 14 kDa proteine, 3'ü 5 kDa proteine ayrıca 20, 25, 30, 40 kDa proteine IgE bağlanmaları saptanmıştır (9). Şekil 4.16'da Western Blot yöntemiyle 34 kDa moleküler ağırlığa karşılık gelen bir bant paterni gösterilmiş üstelik bu bantın inhibisyon deneyiyle susam alerjeni tarafından inhibe olduğu gözlemlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Susam ve/veya haşhaş alerjisi olan 20 hastaya yapılan Western Blot ve inhibisyon deneyleri neticesinde yalnız susam alerjisi olan 1. Grubun hastalarında haşhaş SPT ve spesifik IgE pozitifliği görülmemesinden dolayı susam bant paternlerinde inhibisyon gözlenmemiştir. Provokasyon testi sonucuna göre susam alerjisi olup haşhaş toleran grupta (Grup 2) susama ait olduğu düşünülen yaklaşık 35 kDa, 45 kDa, 52 kDa moleküler ağırlıklı bantların haşhaş alerjenleri tarafından, 20 kDa, 30-40 kDa ve 50-65 kDa aralığındaki haşhaş bantlarının susam alerjenleri tarafından inhibe edildiği anlaşılmıştır. Yaklaşık 15 kDa ve 22 kDa moleküler ağırlığındaki susam bantlarının ise inhibe olmadığı tespit edilmiştir. Hem susam hem haşhaş alerjisi hastalarından oluşan 3. grupta ise haşhaş antijenlerinin hastalardaki susam antikorlarına bağlanması neticesinde 10-15 kDa aralığındaki, 22 kDa ve 28 kDa, 30 kDa, 40 kDa ve 45 kDa moleküler ağırlığındaki bant paterninin yoğunluğundaki kısmi azalmadan dolayı inhibisyon vardır şeklinde yorumlanırken, susam antijenlerinin ise haşhaş antikorlarına bağlanmadığı bant paternlerinin yoğunluğunda bir değişiklik olmamasından anlaşılmış olup inhibisyon görülmemiştir şeklinde yorumlanmıştır.

Çapraz reaksiyonun tespit edilmesi, gıda alerjisinin teşhisi açısından bir kilometre taşı temsil etmektedir. Buna rağmen hem klinikte hem de araştırmalarda hala boşluklar bulunmaktadır. Özetle; güçlü alerjenlerin belirlenip karakterize edilmesi ve bunların etki mekanizmasının anlaşılması önemlidir çünkü bu alerjenler işlemlerden sonra alerjenliğini devam ettirebilir ve küçük miktarları bile anafilaksiye neden olabilmektedir. Alerjenlerin enzimatik ve ısı işlemlere karşı direncinin ve epitoplara bilinmesi, alerjiyle mücadele için fayda sağlamaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Eiringhaus K, Renz H, Matricardi P, Skevaki C. Component-Resolved Diagnosis in Allergic Rhinitis and Asthma. *J Appl Lab Med*. 2019 Mar;3(5):883-898. doi: 10.1373/jalm.2018.026526. Epub 2018 Nov 12. Review. PubMed PMID: 31639763.
2. Gerth van Wijk R, de Jong NW. Perspectives in allergy. *Neth J Med*. 2016 Nov;74(9):373-375. PubMed PMID: 27905304.
3. Arshad SH. Food allergen avoidance in primary prevention of food allergy. *Allergy*. 2001;56 Suppl 67:113-6. Review. PubMed PMID: 11298025.
4. Wood RA. The natural history of food allergy. *Pediatrics*. 2003 Jun;111(6 Pt3):1631-7. Review. PubMed PMID: 12777603.
5. Kanny G. [Food allergy]. *Allerg Immunol (Paris)*. 2001 Nov;33(9):351-6. Review. French. PubMed PMID: 11797470.
6. Bindslev-Jensen C. Food allergy. *BMJ*. 1998 Apr 25;316(7140):1299-302. Review. PubMed PMID: 9554903; PubMed Central PMCID: PMC1113034.
7. Adatia A, Clarke AE, Yanishevsky Y, Ben-Shoshan M. Sesame allergy: current perspectives. *J Asthma Allergy*. 2017 Apr 27;10:141-151. doi: 10.2147/JAA.S113612.eCollection 2017. Review. PubMed PMID: 28490893; PubMed Central PMCID: PMC5414576.
8. Patel A, Bahna SL. Hypersensitivities to sesame and other common edible seeds. *Allergy*. 2016 Oct;71(10):1405-13. doi: 10.1111/all.12962. Epub 2016 Jul 15. Review. PubMed PMID: 27332789.
9. Jensen-Jarolim E, Gerstmayer G, Kraft D, Scheiner O, Ebner H, Ebner C. Serological characterization of allergens in poppy seeds. *Clin Exp Allergy*. 1999 Aug;29(8):1075-9. PubMed PMID: 10457111.
10. Krist S, Stuebiger G, Unterweger H, Bandion F, Buchbauer G. Analysis of volatile compounds and triglycerides of seed oils extracted from different poppy varieties (*Papaver somniferum* L.). *J Agric Food Chem*. 2005 Oct 19;53(21):8310-6. PubMed PMID: 16218681.
11. <http://www.food-allergens.de/password/PDF-downloads/complete-data/poppy-seed-3-2.pdf>.2001 Erişim Tarihi: 15.12.2020.
12. Kazatsky AM, Wood RA. Classification of Food Allergens and Cross-Reactivity. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2016 Mar;16(3):22. doi: 10.1007/s11882-016-0601-1. Review. PubMed PMID: 26874850.
13. Faber MA, Van Gasse AL, Decuyper II, Sabato V, Hagendorens MM, Mertens C, Bridts CH, De Clerck LS, Ebo DG. Cross-Reactive Aeroallergens: Which Need to Cross Our Mind in Food Allergy Diagnosis? *J Allergy Clin Immunol Pract*. 2018 Nov - Dec;6(6):1813-1823. doi: 10.1016/j.jaip.2018.08.010. Epub 2018 Aug 29. Review. PubMed PMID: 30172018

14. Gallagher S, Winston SE, Fuller SA, Hurrell JG. Immunoblotting and immunodetection. *Curr Protoc Immunol*. 2008 Nov;Chapter 8:Unit 8.10. doi: 10.1002/0471142735.im0810s83. PubMed PMID: 19016449.
15. Pillai-Kastoori L, Schutz-Geschwender AR, Harford JA. A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Anal Biochem*. 2020 Mar 15;593:113608. doi: 10.1016/j.ab.2020.113608. Epub 2020 Jan 31. Review. PubMed PMID: 32007473.
16. Mishra M, Tiwari S, Gomes AV. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Rev Proteomics*. 2017 Nov;14(11):1037-1053. doi: 10.1080/14789450.2017.1388167. Epub 2017 Oct 13. Review. PubMed PMID: 28974114; PubMed Central PMCID: PMC6810642.
17. Cui Y. Optimization of blocking conditions for fluorescent Western blot. *Anal Biochem*. 2020 Mar 15;593:113598. doi: 10.1016/j.ab.2020.113598. Epub 2020 Feb 1. PubMed PMID: 32014414.
18. Sampson HA. Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 717-728.
19. Bergmann KC. [Clemens Freiherr von Pirquet, developer of the concept of allergy]. *MMW Fortschr Med*. 2006 Jul 20;148(29-30):24-5, 27. German. PubMed PMID: 16910402.
20. Igea JM. The history of the idea of allergy. *Allergy*. 2013 Aug;68(8):966-73. Epub 2013 Jul 29. Review. PubMed PMID: 23889361.
21. Campbell DE, Mehr S. Fifty years of allergy: 1965-2015. *J Paediatr Child Health*. 2015 Jan;51(1):91-3. PubMed PMID: 25586850.
22. Madore AM, Laprise C. Immunological and genetic aspects of asthma and allergy. *J Asthma Allergy*. 2010 Aug 20;3:107-21. doi: 10.2147/JAA.S8970. PubMed PMID: 21437045; PubMed Central PMCID: PMC3047903.
23. Civelek E, Cakir B, Boz AB, et al. Extent and burden of allergic diseases in elementary schoolchildren: a national multicenter study. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(4):280-288.
24. Justiz Vaillant AA, Zito PM. Immediate Hypersensitivity Reactions. 2020 Jan 9. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513315/>PubMed PMID: 30020687.
25. Schober W. Behrendt H. Online publiziert: 2008. Einfluss von Umweltfaktoren auf die Allergieentstehung. *HNO* 2008 · 56:752–758
26. Kahveci M, Koken G, Şahiner ÜM, Soyer Ö, Şekerel BE. Immunoglobulin E-Mediated Food Allergies Differ in East Mediterranean Children Aged 0-2 Years. *Int Arch Allergy Immunol*. 2020 Feb 25:1-10. doi: 10.1159/000505996. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 32097952.
27. Turnbull JL, Adams HN, Gorard DA. Review article: the diagnosis and management of food allergy and food intolerances. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015 Jan;41(1):3-25. Epub 2014 Oct 14. Review. PubMed PMID: 25316115.

28. Savage J, Johns CB. Food allergy: epidemiology and natural history. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2015 Feb;35(1):45-59. Epub 2014 Nov 21. Review. PubMed PMID: 25459576; PubMed Central PMCID: PMC4254585.
29. Lee S. IgE-mediated food allergies in children: prevalence, triggers, and management. *Korean J Pediatr*. 2017 Apr;60(4):99-105. Epub 2017 Apr 25. Review. PubMed PMID: 28461822; PubMed Central PMCID: PMC5410620.
30. Johnston LK, Chien KB, Bryce PJ. The immunology of food allergy. *J Immunol*. 2014 Mar 15;192(6):2529-34. doi: 10.4049/jimmunol.1303026. Review. PubMed PMID: 24610821; PubMed Central PMCID: PMC3988470.
31. Noah, T.L., Becker, S., 2000. Chemokines in nasal secretions of normal adults experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Clin Immunol.*, 97: 43-49.
32. Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., et al., 1998. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*, 282: 2258-2261.
33. Siraginan, R.P., 1998. "Biochemical events in basophil or mast cell activation and mediator release", In: Middleton E Jr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NF Jr, Yunginger JW, Busse WW (eds), *Allergy Principles and Practice* (5th ed). Vol I. St. Louis: Mosby-Year Book: 204-227.
34. Frieri, M., 2005. "Inflammatory issues in allergic rhinitis and asthma", *Allergy Asthma Proc.*, 26: 163-169.
35. Caffarelli C, Priftis K, Mastrorilli C, Garcia-Marcos L. Editorial: The Parallel March of Asthma and Allergy in Childhood: A Multi-Perspective Approach. *Front Pediatr*. 2018 May 9;6:135. eCollection 2018. PubMed PMID: 29868525; PubMed Central PMCID: PMC5954088.
36. Mansoor DK, Sharma HP. Clinical presentations of food allergy. *Pediatr Clin North Am*. 2011 Apr;58(2):315-26, ix. doi: 10.1016/j.pcl.2011.02.008. Review. PubMed PMID: 21453804.
37. Sela-Culang I, Kunik V, Ofran Y. The structural basis of antibody-antigen recognition. *Front Immunol*. 2013 Oct 8;4:302. doi: 10.3389/fimmu.2013.00302. Review. PubMed PMID: 24115948; PubMed Central PMCID: PMC3792396.
38. Ho MH, Wong WH, Chang C. Clinical spectrum of food allergies: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2014 Jun;46(3):225-40. Review. PubMed PMID: 23229594.
39. Werfel T, Asero R, Ballmer-Weber BK, Beyer K, Enrique E, Knulst AC, Mari A, Muraro A, Ollert M, Poulsen LK, Vieths S, Worm M, Hoffmann-Sommergruber K. Position paper of the EAACI: food allergy due to immunological cross-reactions with common inhalant allergens. *Allergy*. 2015 Sep;70(9):1079-90. Epub 2015 Jul 7. Review. PubMed PMID: 26095197.
40. Frank, S.A. 2002. "Specificity and Cross-reactivity", *Immunology and Evolution of Infectious Disease*, Princeton(NJ): Princeton University Press.
41. Faber MA, Van Gasse AL, Decuyper II, Sabato V, Hagedorens MM, Mertens C, Bridts CH, De Clerck LS, Ebo DG. Cross-Reactive Aeroallergens: Which

- Need to Cross Our Mind in Food Allergy Diagnosis? *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018 Nov - Dec;6(6):1813-1823. doi: 10.1016/j.jaip.2018.08.010. Epub 2018 Aug 29. Review. PubMed PMID: 30172018.
42. Fuji Y, Uchida A, Fukahori K, Chino M, Ohtsuki T, Matsufuji H. Chemical characterization and biological activity in young sesame leaves (*Sesamum indicum* L.) and changes in iridoid and polyphenol content at different growth stages. *PLoS One.* 2018 Mar 27;13(3):e0194449. eCollection 2018. PubMed PMID: 29584748; PubMed Central PMCID: PMC5870955.
 43. Kapoor S, Parmar SS, Yadav M, Chaudhary D, Sainger M, Jaiwal R, Jaiwal PK. Sesame (*Sesamum indicum* L.). *Methods Mol Biol.* 2015;1224:37-45. PubMed PMID: 25416247.
 44. Nosheen A, Bano A, Naz R, Yasmin H, Hussain I, Ullah F, Keyani R, Hassan MN, Tahir AT. Nutritional value of *Sesamum indicum* L. was improved by *Azospirillum* and *Azotobacter* under low input of NP fertilizers. *BMC Plant Biol.* 2019 Nov 4;19(1):466. doi: 10.1186/s12870-019-2077-3. PubMed PMID: 31684880; PubMed Central PMCID: PMC6829804.
 45. <http://www.food-allergens.de/password/PDF-downloads/complete-data/sesame-seed-3-2.pdf>. 2001 Erişim Tarihi 18.12.2020.
 46. Deme P, Narasimhulu CA, Parthasarathy S. Identification and evaluation of anti-inflammatory properties of aqueous components extracted from sesame (*Sesamum indicum*) oil. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2018 Jun 15;1087-1088:61-69. Epub 2018 Apr 18. PubMed PMID: 29709873; PubMed Central PMCID: PMC5985832.
 47. Gangur V, Kelly C, Navuluri L. Sesame allergy: a growing food allergy of global proportions? *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2005 Jul;95(1):4-11; quiz 11-3, 44. doi: 10.1016/S1081-1206(10)61181-7. PMID: 16095135.
 48. Li PH, Gunawardana N, Thomas I, Ue KL, Siew L, Watts TJ, Bintcliffe K, Haque R, Rutkowski K, Skypala I, Till SJ. Sesame allergy in adults: Investigation and outcomes of oral food challenges. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2017 Sep;119(3):285-287. Epub 2017 Jul 23. PubMed PMID: 28743426.
 49. Appel MY, Nachshon L, Elizur A, Levy MB, Katz Y, Goldberg MR. Evaluation of the basophil activation test and skin prick testing for the diagnosis of sesame food allergy. *Clin Exp Allergy.* 2018 May 14. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29758103.
 50. Tuano KT, Dillard KH, Guffey D, Davis CM. Development of sesame tolerance and cosensitization of sesame allergy with peanut and tree nut allergy in children. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2016 Dec;117(6):708-710. Epub 2016 Oct 27. PubMed PMID: 28073703.
 51. Stef J, Koppelman, Gülsen Söylemez, Lynn Niemann, Ferdie E. Gaskin, Joseph L. Baumert, Steve L. Taylor. Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Sesame Seed in Foods. *Biomed Res Int.* 2015 Dec. PMCID: PMC4689898 PMID: 26783532

52. Tae-Dong Jung, † Sun-Il Choi, † Seung-Hyun Choi, Bong-Yeon Cho, Wan-Sup Sim, Han- Xionggao, Sang Jong Lee, Seon Ju Park, Dan-Bi Kim, Young-Cheul Kim, Jin-Ha Lee, Ok-Hwan Lee. Changes in the Anti-Allergic Activities of Sesame by Bioconversion. *Nutrients*. 2018 Feb. PMID: PMC4689898 PMID: 26783532
53. Srivastava A, Agrawal L, Raj R, Jaidi M, Raj SK, Gupta S, Dixit R, Singh PC, Tripathi T, Sidhu OP, Singh BN, Shukla S, Chauhan PS, Kumar S. Ageratum enation virus Infection Induces Programmed Cell Death and Alters Metabolite Biosynthesis in *Papaver somniferum*. *Front Plant Sci*. 2017 Jul 6;8:1172. eCollection 2017. PubMed PMID: 28729873; PubMed Central PMCID: PMC5498505.
54. Voglmayr H, Montes-Borrego M, Landa BB. Disentangling *Peronospora* on *Papaver*: phylogenetics, taxonomy, nomenclature and host range of downy mildew of opium poppy (*Papaver somniferum*) and related species. *PLoS One*. 2014 May 7;9(5):e96838. eCollection 2014. PubMed PMID: 24806292; PubMed Central PMCID: PMC4013089.
55. Keskin O, Sekerel BE. Poppy seed allergy: a case report and review of the literature. *Allergy Asthma Proc*. 2006 Jul-Aug;27(4):396-8. Review. PubMed PMID: 16948357.
56. <http://www.food-allergens.de/password/PDF-downloads/complete-data/poppy-seed-3-2.pdf>. 2001 Erişim Tarihi: 20.12.2020.
57. Oppel T, Thomas P, Wollenberg A. Cross-sensitization between poppy seed and buckwheat in a food-allergic patient with poppy seed anaphylaxis. *Int Arch Allergy Immunol*. 2006;140(2):170-3. Epub 2006 Apr 5. PubMed PMID: 16601355.
58. Sicherer SH. Clinical implications of cross-reactive food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 881–890.
59. Stutius LM, Sheehan WJ, Rangsithienchai P, et al. Characterizing the relationship between sesame, coconut, and nut allergy in children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010;21:1114–8.
60. Stiefel, G., et al., *BSACI guideline for the diagnosis and management of peanut and tree nut allergy*. *Clin Exp Allergy*, 2017. 47(6): p. 719-739.
61. Vazquez-Ortiz, M., et al., *Lip Dose Challenges in Food Allergy: Current Practice and Diagnostic Utility in the United Kingdom*. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 2019. 7(8): p. 2770-2774 e3.
62. Mishra M, Tiwari S, Gomes AV. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Rev Proteomics*. 2017 Nov;14(11):1037-1053. doi: 10.1080/14789450.2017.1388167. Epub 2017 Oct 13. Review. PubMed PMID: 28974114; PubMed Central PMCID: PMC6810642.
63. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76, 4350-4354, 1979.

64. Kim B. Western Blot Techniques. *Methods Mol Biol.* 2017;1606:133-139. doi: 10.1007/978-1-4939-6990-6_9. PubMed PMID: 28501998.
65. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012 Sep;4(9):429-34. doi: 10.4103/1947-2714.100998. PubMed PMID: 23050259; PubMed Central PMCID: PMC3456489.
66. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting: an introduction. *Methods Mol Biol.* 2015;1312:17-30. doi: 10.1007/978-1-4939-2694-7_5. PMID: 26043986; PMCID: PMC7304528.
67. Wolff N, Cogan U, Admon A, Dalal I, Katz Y, Hodos N, Karin N, Yannai S. Allergy to sesame in humans is associated primarily with IgE antibody to a 14 kDa 2S albumin precursor. *Food Chem Toxicol.* 2003 Aug;41(8):1165-74. doi: 10.1016/s0278-6915(03)00107-8. PMID: 12842185.
68. Teodorowicz M, Terlouw RJ, Jansen A, Savelkoul HF, Ruinemans-Koerts J. Immunological Characterization of Dutch Sesame Seed-Allergic Patients. *Int Arch Allergy Immunol.* 2016;169(1):13-22. doi: 10.1159/000443641. Epub 2016 Mar 9. PMID: 26954556.
69. Epov L, Garkaby J, Almog M, Ben-Or O, Schichter-Konfino V, Toker O, Bamberger E, Kessel A. Using skin prick test to sesame paste in the diagnosis of sesame seed allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2020 Apr;8(4):1456-1458. doi: 10.1016/j.jaip.2019.10.038. Epub 2019 Nov 12. PMID: 31730914.
70. Ehlers AM, Rossnagel M, Brix B, Blankestijn MA, Le TM, Suer W, Otten HG, Knulst AC. Sesame oleosins are minor allergens. *Clin Transl Allergy.* 2019 Jun 28;9:32. doi: 10.1186/s13601-019-0271-x. PMID: 31297180; PMCID: PMC6599271.
71. Jung TD, Choi SI, Choi SH, et al. Changes in the Anti-Allergic Activities of Sesame by Bioconversion. *Nutrients.* 2018;10(2):210. Published 2018 Feb 14. doi:10.3390/nu10020210
72. Beyer K, Bardina L, Grishina G, Sampson HA. Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage proteins as common food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 110:154–9
73. Beyer K, Grishina G, Bardina L, Sampson HA. Identification of 2 new sesame seed allergens: Ses i 6 and Ses i 7. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:1554–6
74. Pastorello EA, Varin E, Farioli L et al. The major allergen of sesame seeds (*Sesamum indicum*) is a 2S albumin. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001; 756:85–93.
75. Asero R, Cecchi L, Cervone M et al. Detection of 20 kDa and 32 kDa IgE-binding proteins as the major allergens in Italian sesame seed allergic patients. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2014; 46:22–5.
76. Maruyama N, Nakagawa T, Ito K, Cabanos C, Borres MP, Movérare R, Tanaka A, Sato S, Ebisawa M. Measurement of specific IgE antibodies to Ses i 1 improves the diagnosis of sesame allergy. *Clin Exp Allergy.* 2016 Jan;46(1):163-71. doi: 10.1111/cea.12626. PMID: 26310924.

77. Yanagida N, Ejiri Y, Takeishi D, Sato S, Maruyama N, Takahashi K, Nagakura KI, Ogura K, Asaumi T, Ebisawa M. Ses i 1-specific IgE and sesame oral food challenge results. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2019 Jul-Aug;7(6):2084-2086.e4. doi: 10.1016/j.jaip.2019.02.022. Epub 2019 Mar 2. PMID: 30836231.
78. Lucassen R, Fooke M, Kleine-Tebbe J, Mahler M. Development and evaluation of a rapid assay for the diagnosis of immunoglobulin E-mediated type I allergies. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2008;18(3):223-4. PMID: 18564636.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 1370
Konu : ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 24 TEMMUZ 2018 SALI
Toplantı No : 2018/19
Proje No : GO 18/707 (Değerlendirme Tarihi: 13.07.2018)
Karar No : GO 18/707-23

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. E. Bülent ŞEKEREL'in sorumlu araştırmacı olduğu, Doç. Dr. Ümit Murat ŞAHİNER, Doç. Dr. Esra BİRBEN, Doç. Dr. Özge Uysal SOYER, Doç. Dr. Ayşe Betül BÜYÜKTİRYAKI ile birlikte çalışacakları ve Damla YILDIZ'ın yüksek lisans tezi olan, GO 18/707 kayıt numaralı "Sesamum Indicum L.(Susam) x Papaver Somniferum L.(Haşhaş) Arasındaki Çapraz Reaksiyonların Western Blott Yöntemi İle Gösterilmesi" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 01 Eylül 2018-01 Haziran 2019 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Nurten AKARSU	(Başkan)	İZİNLİ 10 Doç. Dr. Güzde GİRGİN	(Üye)
2. Prof. Dr. Sevdâ F. MÜFTÜOĞLU	(Üye)	11 Doç. Dr. Fatma Visal OKUR	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Yıldırım SANKAR	(Üye)	12. Doç. Dr. Can Ebru KURT	(Üye)
İZİNLİ 4. Prof. Dr. Necdet SAĞLAM	(Üye)	İZİNLİ 13. Doç. Dr. H. Hüsrev TURNAGÖL	(Üye)
5. Prof. Dr. Hatice Doğan BUZUGLU	(Üye)	14. Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ	(Üye)
6. Prof. Dr. R. Köksal ÖZGÜL	(Üye)	İZİNLİ 15. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	(Üye)
7. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Üye)	16. Öğr. Gör. Dr. Meltem ŞENGELEN	(Üye)
İZİNLİ 8. Prof. Dr. Mintaze Kerem GÜNEL	(Üye)	17. Av. Meltem ONURLU	(Üye)
9. Prof. Dr. Oya Nuran EMİROĞLU	(Üye)		

EK-2: Tez Çalışması Orjinallik Raporu



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Bülent Enis Şekerel
Ödev başlığı: Quick Submit
Gönderi Başlığı: Sesamum indicum L. (Susam) x Pap..
Dosya adı: Damla_YILDIZ_1.docx
Dosya boyutu: 2.94M
Sayfa sayısı: 76
Kelime sayısı: 14,839
Karakter sayısı: 96,571
Gönderim Tarihi: 08-Şub-2021 11:10AM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1504364920



Sesamum indicum L. (Susam) x Papaver somniferum L.
(Haşhaş) ARASINDAKİ ÇAPRAZ REAKSİYONLARIN WESTERN
BLOTT YÖNTEMİYLE GÖSTERİLMESİ

ORIJINALLIK RAPORU

% 7	% 5	% 3	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
2	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	% 1
3	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	% 1
4	B. Fahlbusch. "Purification and partial characterization of the major allergen, Cav p 1, from guinea pig Cavia porcellus", Allergy, 5/2002 Yayın	<% 1
5	patentscope.wipo.int İnternet Kaynağı	<% 1
6	link.springer.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	Christopher Chang, Patrick S. C. Leung,	<% 1