



T. C.  
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE AMANİTA PHALLOİDES TOKSİNİ ALFA AMANİTİNİN DERİDEN  
EMİLİMİ**

Mustafa Gani SÜRMEŒ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul KAYA

Düzce 2012

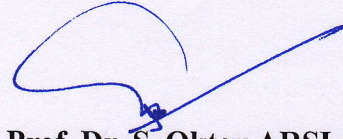


## KABUL VE ONAY

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Farelerde Amanita Phalloides Toksini Alfa Amanitinin Deriden Emilimi” adlı çalışma aşağıdaki jüri tarafından yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 12./11./2012

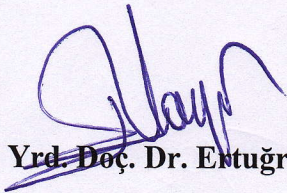
### TEZ SINAV JÜRİSİ



**Prof. Dr. S. Oktay ARSLAN**

**Düzce Üniversitesi**

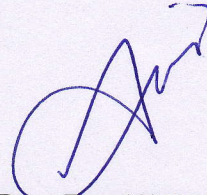
**Başkan**



**Yrd. Doç. Dr. Entuğrul KAYA**

**Düzce Üniversitesi**

**Üye**

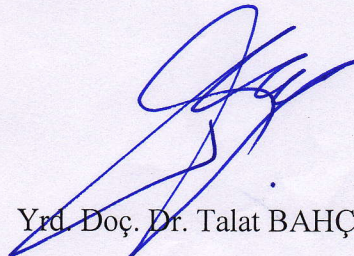


**Yrd. Doç. Dr. Ali PARLAR**

**Düzce Üniversitesi**

**Üye**

Yukarıdaki tez, yönetim kurulunun 12./12./2012 tarih ve 54. sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



**Yrd. Doç. Dr. Talat BAHÇEBAŞI**

**Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü**



## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

12/11/2012

Mustafa Gani SÜRMEŒ

## **TEŐEKKÖR**

Yüksek lisans eğitimin süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Oktay ARSLAN'a ve tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul KAYA'a ayrıca çalışmalarında yardımcı olan Dr. Sait BAYRAM ve bütün arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı tarafından 2011.04.HD.042 numaralı proje ile desteklenmiştir.



# İÇİNDEKİLER:

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
RESİM LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. <i>Amanita phalloides</i> .....	5
2.1.1. Taksonomi.....	5
2.1.2. Tanımlama.....	6
2.1.3. Dağılım ve habitat.....	8
2.1.4. Toksisite.....	9
2.1.4.1. Zehirlenmeye karşı alınabilecek önlemler.....	9
2.1.5. Yenilebilir mantar türleriyle olan benzerliği.....	10
2.1.6. Zehirlenmeye neden olan toksinler.....	11
2.1.7. <i>Amanita phalloides</i> zehirlenmesinde görülen semptomlar.....	13
2.1.8. <i>Amanita phalloides</i> zehirlenmesinde tedavi yöntemleri.....	14
2.2. <i>Amanita phalloides</i> Toksinleri.....	16
2.2.1. Amatoksinler.....	17
2.2.1.1. Alfa amanitin.....	18
2.2.1.2. Alfa amanitin içeren mantar türleri.....	21

2.2.2. Fallotoksinler.....	22
2.2.3. Virotoksinler.....	22
2.2.4. Alfa amanitin analiz yöntemleri.....	22
2.2.5. Saflaştırma yöntemleri.....	24
2.3. Alfa Amanitinin Terapötik Potansiyeli.....	24
2.4. Alfa Amanitinin Membranlardan Geçışı.....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1. Gereç.....	27
3.1.1. Etik kurul izin belgesi.....	27
3.1.2. Standart ve kitler.....	27
3.1.3. <i>Amanita phalloides</i> mantarlarının toplanması.....	27
3.1.4. Hayvan materyali.....	27
3.1.5. Laboratuvar koşulları.....	29
3.1.5.1. Cihazlar ve teknik malzemeler.....	29
3.1.5.2. Kimyasallar.....	30
3.2. Yöntem.....	30
3.2.1. Alfa amanitin saflaştırması.....	30
3.2.1.1. Mantar özütü (ekstre) elde etme yöntemi.....	30
3.2.1.2. Preparatif HPLC tekniği.....	31
3.2.1.3. Analitik HPLC.....	33
3.2.1.3.1. HPLC ortamı.....	33
3.2.1.4. Saflık.....	34
3.2.1.5. Toksinin doğrulaması.....	34
3.2.1.6. Miktar analizi.....	35
3.2.2. Deney protokolü.....	35
3.2.3. Serumda ve dokularda alfa amanitin analizi.....	36

3.2.4. Patolojik inceleme yöntemi.....	37
3.2.5. İstatistiksel analiz.....	37
4. BULGULAR.....	39
4.1. Alfa Amanitin Analiz Sonuçları.....	39
4.1.1. Kalibrasyon kromatogramları pik alanları.....	39
4.1.2. Kalibrasyon eğrileri.....	39
4.1.2. Serumda alfa amanitin ölçümü sonuçları.....	41
4.1.3. Karaciğerde alfa amanitin ölçümü sonuçları.....	42
4.1.4. Böbrekte alfa amanitin ölçümü sonuçları.....	42
4.2. Patolojik İnceleme Sonuçları.....	43
4.2.1. Karaciğer patolojik inceleme sonuçları.....	43
4.2.2. Böbrek patolojik inceleme sonuçları.....	46
4.2.3. Deri patolojik inceleme sonuçları.....	47
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	48
KAYNAKLAR.....	53
ÖZGEÇMİŞ.....	62



## KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

dl:	Desilitre (bir litrenin onda biri, 100 cm <sup>3</sup> )
DNA:	Deoksiribonükleik asit
DÜ-HAYDEK:	Düzce Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu
GİS:	Gastrointestinal sistem
HE:	Hematoksilen eozin (histolojik inceleme için kullanılan bir boya)
HPLC:	Yüksek basınçlı (performanslı) sıvı kromatografisi
ip:	İntraperitoneal
KOH:	Potasyum hidroksit
LC-MS:	Yüksek performans sıvı kromatografisi-kütle spektrometre
LD <sub>50</sub> :	Popülasyonun yarısını öldüren doz
LOD:	Tespit limiti
LOQ:	Miktar tayini sınırı
mg:	Miligram
microRNA:	Ökaryotik hücrelerde bulunan kısa boyutlu RNA
ml:	Mililitre (bir litrenin binde biri)
ng:	Bir gramın bir milyarda biri
p:	Olasılık
R <sup>2</sup> :	Determinasyon katsayısı: İstatistik biliminde belirli bir fonksiyonun bir dizi deneysel veriye ne derece uygunluk gösterdiğini belirlemek için kullanılan bir değerdir.
RNA:	Ribonükleik asit
rpm:	Dakikadaki devir sayısı
SH:	Standart hata

snRNA:	Küçük nükleer ribonükleik asit
SSS:	Santral sinir sistemi
TLC:	İnce tabaka kromatografisi
$\mu$ l:	Mikrolitre (bir litrenin bir milyonda biri)
$\mu$ m:	Mikrometre (bir metrenin bir milyonda biri)

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: <i>Amanita phalloides</i> .....	6
Şekil 2: Alfa amanitinin bisiklik moleküler yapısı.....	19
Şekil 3: Fermentasyon işlemlerinde kullanılan <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mayasından elde edilen RNA polimeraz II ile alfa amanitinin (kırmızı) bağlanması.....	20
Şekil 4: 1. preparatif saflaştırmanın kromatogramı: Kesikli oklar fraksiyonlama başlangıç ve bitiş alanlarını göstermektedir.....	32
Şekil 5: 2. preparatif saflaştırmanın kromatogramı: Kesikli oklar fraksiyonlama başlangıç ve bitiş alanlarını göstermektedir.....	33
Şekil 6: Saflaştırılarak elde edilen alfa amanitin kromatogramı .....	34
Şekil 7: Alfa amanitin pikinin saflık analizi.....	34
Şekil 8: Alfa amanitin standart (a) ve fraksiyon (b) ultraviyole spektrumu .....	35
Şekil 9: Alfa amanitin HPLC’de analizinden elde edilen kromatogramlar (A: boş serum, B: serum üstüne sonradan eklenmiş alfa amanitin).....	38
Şekil 10: Serumda (A), karaciğer dokusunda (B) ve böbrek dokusunda (C) alfa amanitin analizi kalibrasyon grafiği.....	40



## RESİM LİSTESİ

Resim 1: <i>Amanita phalloides</i> spor izi ve spor mikroskopisi.....	7
Resim 2: <i>Amanita phalloides</i> için uyarı levhası.....	10
Resim 3: Birbirine çok benzeyen <i>Volvariella volvacea</i> (a) ve <i>Amanita phalloides</i> (b) resimleri.....	11
Resim 4: <i>Amanita virosa</i> (a) ve <i>Amanita bisporigera</i> (b).....	21
Resim 5: <i>Galerina marginata</i> (a) ve <i>Amanita phalloides alba</i> (b).....	21
Resim 6: <i>Amanita phalloides</i> 'in makroskopik ve mikroskopik resimleri.....	28
Resim 7: Sokslet ekstraksiyon sistemi.....	31
Resim 8: Çalışmada kullanılan HPLC cihazı ve ek aparatları.....	32
Resim 9: Sırt bölgesi tıraş edilmiş fare.....	36
Resim 10: Kontrol 1 saat (A) ve perkutan 1 saat (B) grubundan alınan karaciğer dokusunun histolojik görünümü.....	44
Resim 11: ip 6 saat (A) ve ip 24 saat (B) grubundan alınan karaciğer dokusunun histolojik görünümü.....	45
Resim 12: Kontrol 6 saat (A) ve ip 6 saat (B) grubundan alınan böbrek dokusunun histolojik görünümü.....	46
Resim 13: Kontrol 24 saat (A) ve perkutan 24 saat (B) gruplarından alınan deri örneklerinin histolojik görünümü.....	47

## **TABLO LİSTESİ**

Tablo 1: Olgularda görülen klinik bulguların dağılımı.....	14
Tablo 2: Deneyde kullanılan gruplar ve yapılan işlemler.....	28
Tablo 3: Alfa amanitinin serumdaki ters faz HPLC yöntemi ile analizlerini takiben elde edilen kromatogram pik alanları.....	41
Tablo 4: Serum ve dokularda ölçülen alfa amanitin seviyeleri .....	43

## ÖZET

### FARELERDE AMANİTA PHALLOİDES TOKSİNİ ALFA AMANİTİNİN DERİDEN EMİLİMİ

Mustafa Gani SÜRMEK

Yüksek Lisans Tezi, Farmakoloji Anabilim Dalı  
Tez danışmanı Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul KAYA

Bir zehirli mantar olan *Amanita phalloides* türünde 2 toksin grubu tanımlanmıştır. Bunlar amanitin ve falloidin grubu toksinlerdir. Amanitin grubu toksinler ökaryot hücrelerde bulunan RNA polimeraz II enzimini bloke ederek etki gösterir. Alfa amanitin birçok ökaryot hücre tipinde letal olduğundan, antiparaziter ve antifungal ilaç olarak terapötik değeri olabilir. Alfa amanitinin ökaryotik ektoparazitlere karşı harici olarak kullanımı mümkün olabilir. Alfa amanitinin söz konusu terapötik etkinliğinde kritik nokta, perkutan uygulamada konağa toksisitesinin olmamasıdır. Bu çalışmada alfa amanitinin perkutan yolla deriye uygulanması durumunda, emiliminin ve toksisitesinin varlığı araştırılmıştır. Bu amaçla farelere perkutan olarak 1 mg/kg alfa amanitin uygulanmış, aynı dozda intraperitoneal uygulamadaki toksisite ile karşılaştırılmıştır. Deri, karaciğer ve böbrek toksisitesi patolojik inceleme yoluyla; kan, karaciğer ve böbreklerdeki toksin miktarı ise HPLC analizleri yoluyla incelenmiştir. Kontrol grubunda deride ve organlarda toksisiteye ve toksine rastlanmamıştır. İlginç olarak perkutan toksin uygulanan grupta da deride ve organlarda toksisiteye ve toksin varlığına rastlanmamıştır. İntraperitoneal uygulamada 24 saat sonunda karaciğerde apoptotik konsülman cisimcikleri ve piknotik hücreler görülmüş ve böylece toksisite varlığı gösterilmiştir. Aynı uygulama yönteminde, karaciğer, böbrek ve kanda maksimum alfa amanitin düzeyleri sırasıyla 3.3(6 saat), 0.2(6 saat), 1.2(1 saat) µg/mL olarak ölçülmüştür. Sonuç olarak; alfa amanitinin perkutan uygulama ile kullanımı durumunda, deride ve organlarda toksisitesinin olmadığı ve deriden emilmediği gösterilmiştir. Alfa amanitinin terapötik olarak perkutan yolla kullanılması mümkün olabilir.

**Anahtar sözcükler:** *Amanita phalloides*, Alfa amanitin, Deri toksisitesi, HPLC.



## ABSTRACT

### TRANSDERMAL ABSORPTION OF ALPHA AMANITIN TOXIN FROM AMANITA PHALLOIDES IN MICE

Mustafa Gani SÜRMEŒ

Master of Science Thesis, Department of Medical Pharmacology

Supervisor, Assistant Professor Ertuğrul KAYA

*Amanita phalloides* species is known to contain two main groups of toxins. Those are amanitin and falloidin. AmnitiŒ group becomes effective with blocking RNA polymerase enzyme II found in eukaryotic cells. Since Alpha amanitin has a lethal effect on the majority of eukaryotic cells, it can be valuable as antiparasitic drug or antifungal drug. It can be used externally against ectoparasites. The critical point is that toxin must not be toxic for host via percutaneous application in terms of the mentioned therapeutic effectiveness of alpha amanitin. In this study, the likely absorption and toxicity has been researched for application percutaneous of alpha amanitin. 1 mg/kg alfa amanitin has been administered percutaneously in mice and the results of percutaneous application has been compared with intraperitoneal application of 1 mg/kg alfa amanitin on account of toxicity. The toxicities of skin, liver and kidney have been researched by pathological examination. As for the amount of toxin, it has been studied by HPLC analysis. The toxicity and the toxin haven't been found in the skin and organs of mice in the control group. Interestingly enough, the toxicity and the toxin a could not be found in percutaneous application group. After 24 hours councilman bodies and pyknotic cells were observed on intraperitoneal application and so toksisty existence was proved. In liver, kidney and blood maximum levels of alpha-amanitin were measured by same application method as 3.3(6 hours), 0.2(6 hours), 1.2(1 hours) µg/mL in turn. Eventually, it has been demonstrated that the toxin is not absorbed from mouse skin and the toxin doesn't have any toxic effect via the percutaneous alpha amanitin application. Thence alpha amanitin may be used as therapeutic via a percutaneous application.

Key words: *Amanita phalloides*, Alpha amanitin, Skin toxicity, HPLC.

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsan sağlığı açısından zehirlenmelerin tarihi önemi bulunmaktadır. Öyle ki bazı zehirlerden zamanla ilaç yapılması da mümkün olmuştur. Bunlara krar ve kalp glikozitleri örnek verilebilir. Toksinlerden ilaç yapımında en kritik nokta ise, organizmanın toksinden zarar görmesinin engellenmesidir<sup>1</sup>.

İnsanlık için önemli zehirlenmelerden biri de mantarlarla görülenlerdir. Őapkalı mantarlardan yaklaşık olarak 100 dolayında türün çeşitli canlılarda toksik olduğu bilinmektedir. Bunlardan yaklaşık olarak 8-10 türün öldürücü derecede zehirlenmelere neden olduğu bilinmektedir. Tüm dünyada görülen ölümcül mantar zehirlenmelerinin %95'ten fazlasının sorumlusu olan mantar, *Amanita phalloides* türüdür. Bu mantar hem çok yaygın olarak yetişmekte hem de yetiştiği dönemde bol miktarda üremektedir<sup>2</sup>.

*Amanita phalloides* mantarı içinde 2 grup toksin tanımlanmıştır. Bunlar amanitin grubu (amatoksinler) ve phalloidin grubu (fallotoksinler) toksinler olarak bilinmektedir. Amanitin grubu toksinlerden mantar içinde en fazla bulunanı ve hakkında en fazla araştırma yapılanı alfa amanitindir. Amanitin grubu toksinler RNA polimeraz II enziminin spesifik inhibitörüdür. Bu enzim protein sentezinin ilk basamağı olan mRNA sentezini sağladığından, inhibisyonu durumunda hücredeki protein sentezi durmakta ve hücre bir süre sonra ölmektedir. Bu etkiyi tüm protein sentezi yapan ökaryot hücrelerde oluşturması beklenmesine rağmen, karaciğer farmakokinetik etki ile toksinin çoğunu aldığından esas sistemik toksik etki bu organda açığa çıkmaktadır. Ayrıca toksinin atılımı böbreklerden olduğu için bu organda da toksik etkiler görülmektedir<sup>3</sup>.

*Amanita phalloides* toksinleri ökaryot hücelere toksiktir<sup>4</sup>. Daha önce çalışma yapılmamış olmakla birlikte, amanitin grubu toksinlerin ökaryot hücelere sahip olan parazitlerde de toksik olması beklenir. Bu toksinlerin anti ektoparaziter ilaç olarak kullanılma potansiyeli bulunmaktadır.

Son zamanlarda mantarların, antimikrobilyallere karşı gelişen direnç ve tarım ürünlerinde verim kaybına neden olan parazitler gibi çeşitli sorunları çözmede umut verici yeni protein kaynakları olduğu daha iyi gözlenmektedir<sup>5</sup>. Ayrıca gün geçtikçe yapılan birçok çalışmada alfa amanitin ve benzeri birçok mantar toksininin dirençli patojen mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal ilaç geliştirmede umut verici bir kaynak olduğu görülmektedir<sup>6</sup>.

Ancak deri üzerine yapılan uygulamalarda kilit nokta toksinin konağa toksik etkisinin olmamasıdır. Bu amaçla da öncelikle alfa amanitinin deriden emiliminin ve deride toksisitesinin olup olmadığının araştırılması gerekmektedir. Deriden emiliminin olması durumunda konağa da toksisitesi bekleneceğinden, terapötik ilaç olarak kullanımı mümkün olmayacaktır.

Bu çalışmadaki amaç, deri üzerine perkutan uygulanan alfa amanitinin deriye toksik etkisinin varlığını ve transdermal geçişle sistemik dolaşıma geçip geçmediğini araştırmaktır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Amanita phalloides*

*Amanita phalloides* ülkemizde “köy göçüren, evcik yıkan”, tüm dünyada ise “death cap” gibi isimlerle bilinmektedir. *Amanita phalloides*, Phalloidea üst familyasının tipik bir türüdür. Bu tür şimdiye kadar tespit edilen *Amanita* türleri arasında en ölümcül zehirleri içerir. Bu grubun içinde yine en iyi bilinen birkaç mantar ise “yok ediciler” olarak bilinen *Amanita virosa* ve *Amanita bisporigera* ve bunun yanı sıra “fool's mushroom” olarak ünlenmiş *Amanita verna*'dır<sup>7</sup>.

#### 2.1.1. Taksonomi

*Amanita phalloides* ilk olarak Fransız botanikçi Sébastien Vaillant tarafından 1727 yılı içerisinde tanımlanmıştır. Sébastien Vaillant bu mantarı çeşitli evrelerindeki şekillerine bakarak kısa ve öz bir ifadeyle "*Fungus phalloides, annulatus, sordide virescens, et patulus*" kelimelerini kullanarak isimlendirmiştir<sup>8</sup>.

Nadiren görülen tamamıyla beyaz olan bir mantar da önceleri Max Britzelmayr tarafından *Amanita phalloides* mantarının bir alt türü olarak tanımlanmıştır. Çünkü bu mantar sıklıkla normal renkteki *Amanita phalloides* türlerinin arasında gözleniyordu. Son olarak 2004'te bu mantar *Amanita verna var. tarda* olarak tanımlandı<sup>9</sup>. *Amanita verna*'nın şapka kısmı KOH çözeltisiyle sarıya dönerken, *Amanita phalloides* asla sararmaz<sup>10</sup>. *Amanita phalloides* mantarının bilimsel sınıflandırması aşağıdaki şekildedir: *Binominal adı: Amanita phalloides (Sébastien Vaillant & Johann Heinrich Friedrich Link)*

Alem: Fungi  
Bölüm: Basidiomycota  
Sınıf: Homobasidiomycetes  
Takım: Agaricales  
Familya: Amanitaceae  
Cins: *Amanita*  
Tür: *Amanita phalloides*



Şekil 1: *Amanita phalloides*

### 2.1.2. Tanımlama

*Amanita phalloides* büyük, heybetli, etli bir toprak üstü gövdeye (basidiocarp) sahiptir. Şapkası (pileus) genellikle 5-15 cm çapları arasındadır. Şapka başlangıçta yuvarlak ve hemisferik şekildeyken mantar olgunlaştıkça şapka düzleşir<sup>11</sup>.

Şapkanın rengi soluk, sarımsak veya zeytin yeşili olabilir. Sıklıkla kenarlara doğru daha soluktur ve yağmur sonrası daha da soluklaşır. Şapka yüzeyi yapışkan, ıslak ve kolay soyulur özelliğindedir ve bu özellik bazı yenilebilir mantarlarla ortak olduğu için tehlikeye neden olabilir<sup>12</sup>.

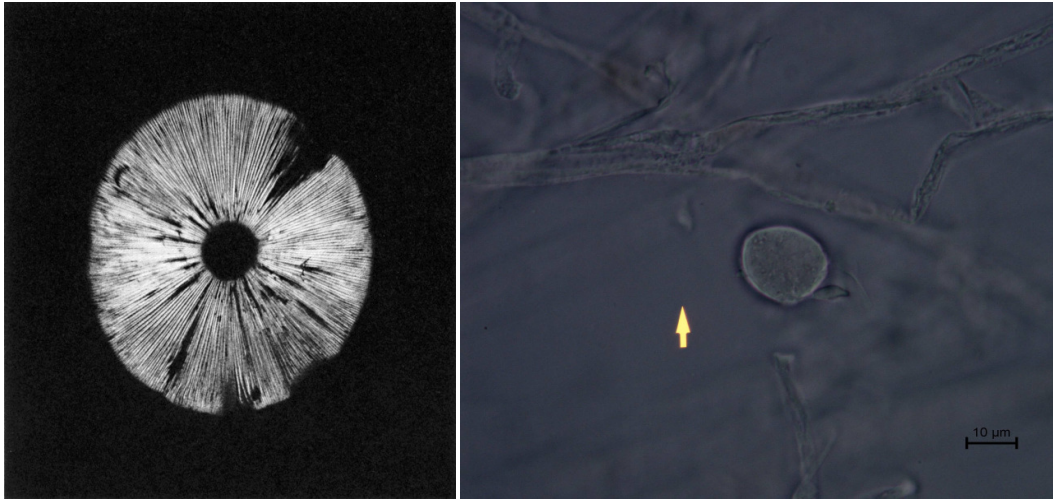
Kısmi peçenin geri kalanı etek benzeri bir görüntü verir. Sarkık şekilde duran halka genellikle şapkadan 1-1.5 cm aşağıda bulunur. Sık beyaz lamelleri serbest şekildedir. Sap kısmının rengi beyaz ile grimsi-zeytin yeşili renklerin dağılımından oluşur. Sap kısmı 8-15 cm uzunlukları arasında ve 1-2 cm kalınlığındadır. Sapın dip kısmı şişkin, kese benzeri volva ile sonlanır<sup>13</sup>.

Volva bazı mantarların kök veya dip kısmını oluşturan kupa şeklindeki kitledir ve *Amanita phalloides* ayırımında çok önemlidir. Volva orman zeminindeki çürümekte olan yapraklar tarafından örtülmüş olabileceği için bu ayırt edici ve tanısal özelliğin

gözlenebilmesi için orman yüzeyinde yapraklardan oluşan kitle çok iyi bir şekilde temizlenmelidir<sup>12</sup>.

Mantarın kokusu ilk başlarda hafif, bal gibi hoş bir koku iken zaman ilerledikçe marazi ve mide bulandırıcı nahoş bir koku üstün gelir<sup>15</sup>.

Türün genç üyeleri yüzeyden ilk çıktıkları zaman bütün etraflarını kapsayan bir peçeyle örtülüdürler ve görünüşleriyle beyaz bir yumurtayı andırırlar. Hemen sonrasında yumurtanın kabuğunu andıran bu yapı yırtılır ve mantar volvasını bir kalıntı gibi aşağıda bırakarak yukarıya doğru gelişir. Spor izi *Amanita* türlerinde yaygın olarak beyaz renktedir. Transparan sporların şekli küreden yumurta biçimine değişiklik gösterir ve iyotla lekeli mavi renk alan sporların boyutları 8 – 10 µm civarındadır<sup>15</sup>. Bir mantara ait spor izi yapısı mantarları tanımlamakta kullanılan birçok el kitabında önemli bir ayırt edici özellik olarak yer alır. Bu yapı bir bütün olarak izlendiğinde mantar sporlarının rengini gösterir<sup>16</sup>.



Resim 1: *Amanita phalloides* spor izi ve spor mikroskopisi

*Amanita phalloides*'in lamelleri ise spor kitlesinden farklı olarak sülfürik asitle soluk leylak veya pembe renkte boyanır. *Amanita phalloides*'in tanımına dair özellikleri özetlemek gerekirse; lamelleri himenyumunun üzerindedir. Şapka kısmı konvektir ve altında bulunan himenyumu serbesttir, gövdesinde bir halka ve dip kısmında volva bulunur, spor izi beyazdır, ekolojisi ağaç kökleriyle yani vasküler sistemli bitkilerle simbiyotik yaşama dayalıdır<sup>17</sup>.

### 2.1.3. Dağılım ve habitat

*Amanita phalloides* Avrupa'ya özgü bir mantardır ve bu alanda yaygın olarak bulunur<sup>18</sup>. Kuzeyde İskandinavya'nın güney kıyılarından batıda İrlanda'ya, doğuda Polonya ve Batı Rusya'ya kadar olan bölgelerde ve güneyde Balkanlar boyunca ayrıca İtalya'da, İspanya'da ve Portekiz'de, Kuzey Afrika'da Fas ve Cezayir'de *Amanita phalloides*'e rastlanmıştır<sup>19</sup>. Batı Asya'da Kuzey İran ormanlarında varlığı rapor edilmiştir<sup>20</sup>.

*Amanita phalloides*'in miçelyumları birçok ağaç türüyle simbiyotik olarak ilişkilidir. Avrupa'da bu ilişki genellikle sert ağaç guruplarıyla, nadiren de kozalaklı ağaçlarla birlikte kurulur. *Amanita phalloides* en sık meşe ağaçlarının altında ayrıca kayın, kestane, atkestanesi, huş, fındık, gürgenler, çam ve ala çamların altında görülür<sup>21</sup>. 19. yüzyılın sonlarında Kuzey Amerika'da Charles Horton Peck *Amanita phalloides*'i rapor etmiştir. Buna rağmen Doğu Amerika'da 1918'de Cornell Üniversite'sinden G. F. Atkinson tarafından benzer türler farklı bir şekilde tanımlanmıştır<sup>22</sup>. Amerika'daki *Amanita phalloides* varlığının Avrupa'nın doğu ve batı kıyılarındaki kestane ağaçlarının etrafındaki popülasyonlarıyla ilişkili olduğu varsayımına 1970'lerde ulaşılmıştır<sup>23</sup>. Kuzey Amerika'nın batı kıyılarında bulunan *Amanita phalloides* popülasyonunun kaynağıyla ilgili 2009 yılında yapılan bir çalışma güçlü kanıtlar sağlamıştır<sup>24</sup>.

*Amanita phalloides* yeni ülkelere Güney Yarımküre'den sert ağaç ve çamların keresteleriyle ulaştırılmıştır. Mantarın Avustralya ve Güney Amerika'ya ulaştırılmasında meşelerin vektör görevi üstlendiği sanılıyor. *Amanita phalloides* Avustralya'nın Melbourne ve Canberra şehirlerinde meşe ağaçları altında gözlenmiştir<sup>25</sup>. Ocak 2012'de Canberra civarında zehirlenen dört kişiden ikisi hayatını kaybetmiştir<sup>26</sup>. *Amanita phalloides* yine meşe ağaçlarıyla birlikte Uruguay, Güney Amerika'da görülmüştür<sup>27</sup>. Ayrıca tanımlanmış diğer ağaçlarla birlikte Arjantin ve Şili'de gözlenmiştir<sup>28</sup>. *Amanita phalloides* Tanzanya ve Güney Afrika'da çam ağaçlarıyla birlikte gözlenmiştir<sup>29</sup>. Yine bu bölgeler ve civarlarında meşe ve kavak ağaçlarının altında bulunmuştur<sup>30</sup>.

Türkiye'de yapılan birçok çalışmada da İstanbul ve çevresinde *Amanita phalloides*'in bol miktarda gözlendiği ortaya konulmuştur. Bununla birlikte ülkemizde İzmir, Uşak, Çorum, Bingöl, Elazığ ve Çukurova çevrelerinden toplanan mantarlarla ölümcül mantar zehirlenmeleri vakaları bildirilmiştir<sup>31</sup>. Bu mantarların tür teşhisi yapılmamış olmasına rağmen *Amanita phalloides* mantarının çoğunlukta olması beklenebilir. Ayrıca son

yıllarda yapılan yayınlarda Düzce-Adapazarı arası bölgede bol miktarda yetiştiği bildirilmektedir<sup>32-33</sup>.

#### **2.1.4. Toksikite**

*Amanita phalloides* “Death cap” lakabını hak edecek derecede zehirlidir ve dünya çapındaki mantar zehirlenmelerine bağlı ölümlerin çok büyük bir kısmından sorumludur<sup>34</sup>. *Amanita phalloides* toksinlerinin kimyasal yapısı on yıllar boyunca araştırılmıştır<sup>35</sup>. Bu araştırmalara göre mantardan yaklaşık olarak 30 gram veya yarım şapka kadarının yenilmesinin bir insanı öldürmeye yettiği bildirilmiştir<sup>36</sup>. Pozan, Polonya’da 1918 senesinde 31 çocuk okulları tarafından hazırlan mantar yemeğini yiyerek öldüler. Bu mantarların “Death cap” ismiyle bilinen *Amanita phalloides* olduğu anlaşılmıştır<sup>37</sup>.

Bazı otoriteler yemek için toplanan mantarlarla *Amanita phalloides* şüphesi oluşturabilecek mantarların aynı sepette toplanmasından veya şüpheli mantarlara dokunulmasından kaçınılması gerektiğini şiddetle tavsiye etmektedirler<sup>38</sup>. Dahası mantarın toksisitesi pişirme, dondurma veya kurutma gibi uygulamalarla da azalmamaktadır<sup>39</sup>.

##### **2.1.4.1. Zehirlenmeye karşı alınabilecek önlemler**

*Amanita phalloides*’e ait mantar zehirlenmeleri hakkındaki bilgilenme seviyesi gün geçtikçe artmaktadır. Hastanın hikâyesinde son bir gün içinde mantar yenmiş olması ve karakteristik klinik belirtilere sahip olmak gibi durumlar mantar zehirlenmesinden şüphelenilmesine neden olmaktadır.

*Amanita phalloides* zehirlenmesinin basit ve etkili bir tedavisi henüz yoktur. Bu yüzden halkın ve sağlık çalışanlarının konuyla ilgili farkındalıklarının artırılması zehirlenme vakalarının insidansının azalmasını ve zehirlenme olursa olayın daha iyi bir şekilde sonuçlanmasını sağlayabilir<sup>40</sup>.

Aşağıdaki resimde görülen levha Avustralya’nın kırsal kesimlerinde bulunmaktadır ve *Amanita phalloides* için ciddi bir uyarı yapılmakta, zehirlenme şüphesi olanların yardım alacakları yerler açıklanmaktadır. Türkiye’de bu mantarın yol açtığı ölümlerin çok daha

fazla olduğunu ve mantarın yaygınlığını hesaba katarsak örnek alınması gereken bir tutum olduğu düşünülebilir.



Resim 2: *Amanita phalloides* için uyarı levhası

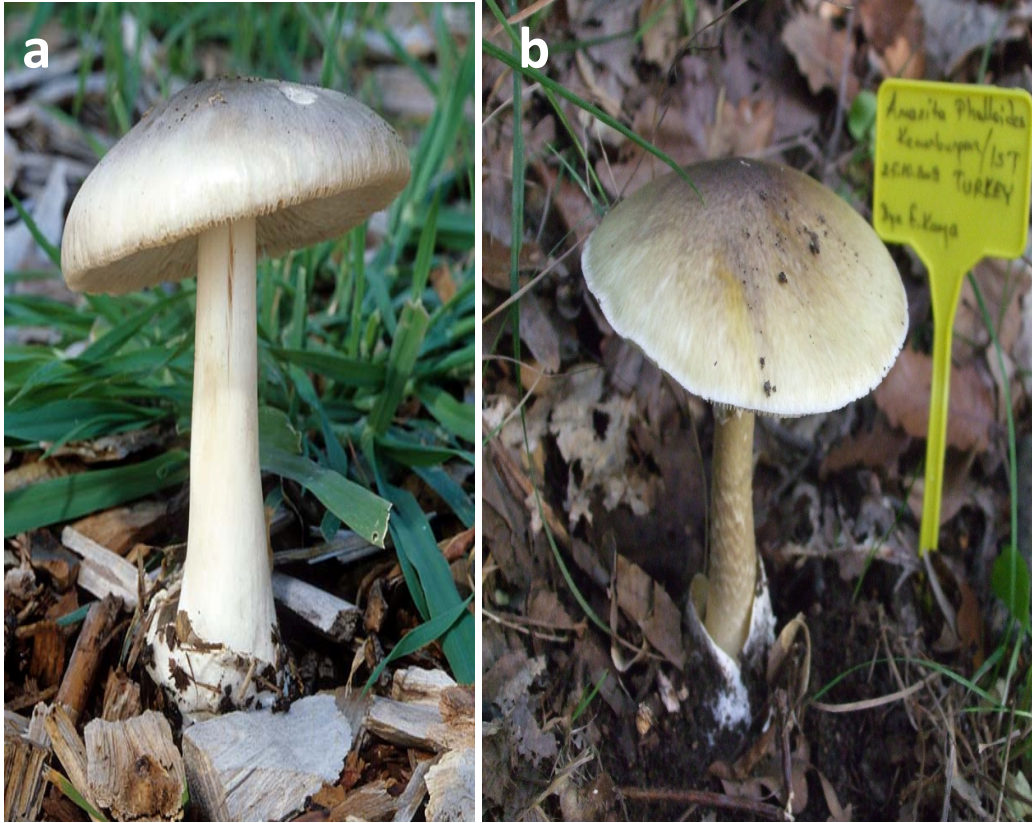
### 2.1.5. Yenilebilir mantar türleriyle olan benzerliği

Genelde zehirlenme olayları kasıtsızdır ve tanımlama hatalarından kaynaklanır. Son birkaç vaka *Volvariella volvacea*'nın *Amanita phalloides* ile olan benzerliğinin tanıda insanları yanılttığını göstermektedir (resim 3). Bu karışıklıktan dolayı gerçekleşen zehirlenmelerin mağdurları Avustralya'daki vakalarda Asya'nın doğu ve güney doğusundan gelen göçmenler ve Amerika Birleşik Devletleri'nde batı kıyılarında yaşayan insanlardır. Oregon'da gerçekleşen bir olayda Koreli bir ailenin dört ferdine karaciğer transplantasyonu yapılması gerekmiştir<sup>41</sup>.

Canberra bölgesinde 1988 ve 2011 yılları arasında zehirlenen 9 kişiden 3'ü Laos'tan, 2'si ise Çin'den gelmişlerdir<sup>42</sup>. Bu yanlış tanımlamalar Amerika Birleşik Devletleri'nde de zehirlenmelere neden olmaktadır. Tecrübeli olmayan kişiler, genç *Amanita phalloides* üyelerini "puffballs" diye adlandırılan *Lycoperdon umbrinum* ile karıştırabiliyorlar<sup>43</sup>. *Amanita* türlerinden ise *Amanita lanei* gibi mantarların olgunlaşmış olanları *Amanita phalloides* ile karıştırılabilir. Bu nedenle bazı otoriteler *Amanita* türlerinin yemek için toplanmasından kaçınılmasını tavsiye ediyor<sup>44</sup>.



*Amanita phalloides* beyaz renkteyken *Agaricus*'un yenilebilir türleriyle; özellikle de genç mantarın sporocarpının tam olarak açılmamış şapkası sahte beyaz lamellerini gizler. Halbuki bütün olgunlaşmış *Agaricus* mantarlarının koyu renkli lamelleri vardır<sup>45</sup>. Avrupa'da şapka kısmı yeşil olan diğer benzer türler mantar avcısı denilebilecek kişiler tarafından toplanmaktadır. Bu türlerden bazıları *Russula* cinsine ait yeşil kırılğan lamelli türler ve önceleri meşhur olan *Tricholoma flavovirens*'dir. Şimdilerde ise Fransa'da neden olduğu bir seri lokanta zehirlenmesinden dolayı tehlikeli olarak kabul edilmektedir. *Russula heterophylla*, *R. aeruginea*, ve *R. virescens*'te olduğu gibi kırılğan lameller onların kırılğan vücutlarından ayırt edilebilir. Ayrıca gövdede halka ve volvanın yokluğu da *Amanita phalloides*'ten ayırımını sağlayabilir<sup>46</sup>.



Resim 3: Birbirine çok benzeyen *Volvariella volvacea*(a) ve *Amanita phalloides*(b) resimleri

### 2.1.6. Zehirlenmeye neden olan toksinler

*Amanita phalloides* türü şu an itibariyle amatoksinler ve phallotoksinler adıyla bilinen iki grup toksin içermektedir. Bu grupların her ikisi de multisiklik peptitlerden oluşur ve

mantarın hemen her dokusunda bulunurlar. Diğer bir toksin ise phallolysin adıyla bilinir ve in vitro olarak kan hücrelerini yıktığı yani hemolitik olduğu gösterilmiştir. Ayrıca şu an için toksisiteyle ilgisiz olduğu düşünülen bir bileşik olan antamanid izole edilmiştir.

Amatoksinler birbirine benzer yapıdadırlar ve sekiz aminoasitten oluşurlar. Bu sekiz aminoasitten oluşan halkalar, Münih Üniversitesi üyeleri olan Heinrich O. Wieland ve Rudolf Hallermayer tarafından 1941 yılında izole edilmiştir<sup>47</sup>. Amatoksinlerin en önemli bileşigi olan alfa amanitin ve onunla birlikte beta amanitin zehirlenme vakalarından sorumlu tutulmaktadır<sup>48</sup>.

Amanitin grubu toksinlerin mekanizması kabaca mRNA, microRNA (miRNA), snRNA sentezlerinde hayati öneme sahip olan RNA polimeraz II'nin inhibisyonuna dayanır. mRNA olmadığı için temel proteinlerin sentezlenemez ve hücre metabolizması durmaya zorlanır ve sonunda hücre ölür<sup>49</sup>.

Karaciğer esas etkilenen organdır. Çünkü gastrointestinal sistemden emilen bütün maddeler kan yoluyla ilk olarak karaciğere gelirler. Karaciğer toksinin büyük kısmını hücre içine alır ve bu nedenle toksisiteden etkilenir. Sistemik dolaşıma toksin fazla geçmediği için diğer organlar fazla etkilenmez. Bunun yanında etkilenebilecek diğer organlar ise toksinin atılımı nedeniyle böbreklerdir. *Amanita phalloides* mantarının kendi RNA polimeraz enzimi amatoksinlere duyarsız yapıda olduğu için mantar kendi kendini zehirlenmekten korunmuş olur<sup>50</sup>.

Phallotoksinler de en az yedi benzer aminoasit halkasından oluşurlar. Falloidin 1937'de Heinrich Wieland'ın öğrencisi olan Feodor Lynen ve Münih Üniversitesi'nden Ulrich Wieland tarafından izole edilmiştir. Fallotoksinler de karaciğer için yüksek derecede toksiktir<sup>51</sup>. Fallotoksinlerin *Amanita phalloides*'in yenmesiyle oluşturduğu zehirlenmelere katkısı az olmuştur. Çünkü fallotoksinler barsak epitelinden emilemezler<sup>52</sup>. Dahası phalloidin sevilerek yenen bir mantar olan "Blusher" yerel ismiyle bilinen *Amanita rubescens*'te de bulunmaktadır ancak bu mantar zehirlenmelere neden olmamaktadır<sup>53</sup>.

Minör aktiviteye sahip diğer bir peptit grubu olan virotoksinlerdir. Virotoksinler altı aminoasitli tek halka yapılı heptapeptitlerden oluşmaktadır<sup>54</sup>. Virotoksinler de tıpkı phallotoksinler gibi yenilen mantardan barsak yoluyla geçerek her hangi bir akut toksisite gösteremezler<sup>55</sup>.



### 2.1.7. *Amanita phalloides* zehirlenmesinde görülen semptomlar

*Amanita phalloides* lezzetli bir yiyecek olarak bilinmektedir<sup>56</sup>. Bu durum geç ortaya çıkan zehirlenme bulgularıyla birleştğinde mantarı özellikle tehlikeli kılar ki bu gecikme süresince karaciğerde ciddi, bazen telafi edilemeyecek hasarlar oluşur. Başlangıçta zehirlenme belirtileri doğal olarak gastrointestinal sistemle alakalıdır ve kolik tarzda ağrı, sulu ishal, kusma ve belki bu son iki belirtiyeye bağlı olarak dehidrasyon ve ciddi vakalarda hipotansiyon, taşikardi, hipoglisemi ve asit – baz dengesizliği görülebilir<sup>57</sup>. Bu ilk belirtiler mantarın sindiriminden iki üç gün sonra kaybolur. Sonrasında karaciğer tutulumunu gösteren daha ciddi bozulmalar ortaya çıkar. Bu bulgular; sarılık, ishal, deliryum veya hezeyan benzeri belirtiler, kasılma nöbetleri ve koma gibi bulgulardır ve fulminan karaciğer yetmezliği ve ona eşlik eden hepatik ensefalopati nedeniyle oluşurlar. Hepatik ensefalopati normalde karaciğerde yıkılan metabolitlerin kanda birikmesiyle oluşur<sup>58</sup>.

Renal yetmezlik ya şiddetli hepatite ikincil olarak ya da direkt toksik renal hasarla oluşur<sup>59</sup>. Renal yetmezlik ve pıhtılaşma bozukluğu da karaciğere bağlı bulguların gözlendiği bu süreçte gözlenir. Kafa içi basıncın artması, kafa içi kanamalar, pankreatit, akut renal yetmezlik ve kardiyak arrest gibi komplikasyonlar yaşamı tehdit ederler<sup>60</sup>. Ölüm genellikle zehirlenmelerden 6 – 16 gün sonra gerçekleşir<sup>61</sup>.

Mantar zehirlenmelerinin, Avrupa ülkelerinde Amerika Birleşik Devletleri ve Amerika'da bulunan diğer kıta ülkelerinin toplamından daha yaygın olduğu bilinmektedir<sup>62</sup>. Yirminci yüzyılın ortalarına doğru gözlemlenen ölüm oranları %60 – 70 civarında bulunmaktadır. Daha sonraki yıllarda tıp alanındaki uygulamaların gelişmesiyle ölüm oranlarında büyük düşüş gözlemlenmiştir. Avrupa'da 1971'den 1980 yıllarına kadar olan *Amanita phalloides* zehirlenmelerinde ölüm oranları %22,4 civarındadır. Bu oranın oluşumunu %51,3 ile on yaşının altındaki çocuk ölüm oranları ve %16,5 ile on yaşının üstündeki insanların ölüm oranları sağlamıştır<sup>63</sup>. Son zamanlarda yapılan anket benzeri çalışmalarda görüldüğü üzere bu oranlar %10 – 15'e kadar gerilemiştir<sup>64</sup>.

Ülkemizde görülen *Amanita phalloides* zehirlenmesi bulgularını içeren bir gözlem ve çalışma Türk Yoğun Bakım Derneği Dergisinin 2009;7(1):12-16 sayısında yayınlanmıştır. Bu araştırmaya göre klinik bulgular Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: Olgularda görülen klinik bulguların dağılımı<sup>65</sup>

Klinik Bulgular	Sayı	Yüzde
Tek başına gastrointestinal sistem (GİS)	66	63.5
Bulantı-kusma	87	83.7
Karın ağrısı	10	9.6
Diyare	19	18.3
Santral sinir sistemi (SSS)	32	30.8
Konfüzyon, şuur kaybı	6	5.8
Baş dönmesi, baş ağrısı	24	23.1
Göz kararması	2	1.9
Halüsinasyon	2	1.9
SSS+GİS	23	22.1
Kardiyovasküler sistem	1	1.0
Taşikardi	1	1.0
Üriner sistem	1	1.0
Diğer (ateş, terleme)	2	1.9

### 2.1.8. *Amanita phalloides* zehirlenmesinde tedavi yöntemleri

*Amanita phalloides* zehirlenmesi zamanlamanın çok önemli olduğu, acil tıbbi müdahale isteyen ve ciddi ölüm tehlikesi içeren bir durumdur.

Tedavi

- Ön tıbbi bakım
- Destekleyici önlemler
- Özel tedaviler
- Karaciğer tedavisi şeklinde dört ana kategoriye ayrılır<sup>66</sup>.

Gastrik temizlik için ön bakım olarak aktif karbon ve gastrik lavaj uygulanır. Bununla birlikte sindirim ile ilk zehirlenme belirtilerinin ortaya çıkması arasındaki gecikme süresi hastaların tedavi için yapacakları başvuruyu da geciktirir veya sıradanlaştırır. Böylece ön müdahalenin etkinliği potansiyel olarak azalır<sup>67</sup>.

Dehidrasyona karşı destekleyici uygulamalar yürütülür. Dehidrasyon intoksikasyonun gastrointestinal fazı boyunca ve metabolik asidoz, hipoglisemi, elektrolit dengesizliği ve bozulmuş koagülasyonun gerçekleştiği durumlarda sıvı kaybına bağlı olarak ortaya çıkar<sup>68</sup>.H. Faulstich ve T.R. Zilker, Phalloides sendromunu belirtilerin şiddetine göre 4 dereceye ayırmaktadırlar<sup>69</sup>.

İlk aşamada hastada gastrointestinal belirtiler ortaya çıkar, ancak kan değerlerinde karaciğer ve böbrek hasarını gösteren herhangi bir bulgu gözlenmez.

İkinci aşamada hasta Phalloides sendromunun belirtilerini gösterir. Transaminaz enzimlerinde orta şiddette bir yükselme olur (500U/l'nin altında), pıhtılaşma bozukluğu gözlenmez.

Üçüncü aşamada hastada çok ciddi bir karaciğer hasarı gelişir. Transaminazlar belirgin olarak yükselir. Pıhtılaşma değerleri de etkilenir ve tromboplastin zamanı uzar. Bilirubin seviyesinde değişiklik gözlenmeyebilir. Buna karşın bazı hastalarda bilirubin seviyesi 5 mg/dl'nin üzerine çıkabilir.

Son evrede ise transaminazlar ve bilirubin seviyesi hızla yükselir. Pıhtılaşma faktörleri hızla düşer ve böbrek yetmezliği gözlenir.

İlk iki aşama içerisindeki zehirlenme seviyelerindeki hastaların yaşama şansı yüksektir ve semptomatik tedavi yeterli olabilir. Daha sonraki seviyelerde ise hastanın tam teşekküllü bir hastanede tedavi edilmesi gerekir. Son aşamada ise yoğun tedaviye rağmen hastanın yaşama şansı oldukça düşüktür. Zehirlenme üzerinden çok vakit geçmemişse çok hızlı bir şekilde hastanın kanında alfa amanitin aranması teşhise büyük ölçüde yardımcı olabilir. Ancak hastalar genellikle zehirli mantarın yenilmesinden 12 saat sonra veya daha da geç hastaneye gelirler, bu dönemde kanda amatoksinler çok ender tespit edildiği için tanı güvenilir olmaz. İdrarda ise 72 saat kadar amatoksinler bulunabilir. İdrarda amatoksin konsantrasyonu ile zehirlenmenin ağırlığı arasında korelasyon yoktur<sup>70-74</sup>.

Eğer klinik phalloides zehirlenmesine uyuyorsa, idrar tahlillerinin sonucunu beklemeden tedaviye başlamak gerekir. Hasta başvurduğunda karaciğer enzimleri hafifçe yükselmişse, bu phalloides zehirlenmesi lehinedir<sup>75</sup>. Hasta yediği mantardan örnek getirmiş ise basit, güvenilir ve acil serviste kolayca uygulanabilen Wieland testi ile amatoksin varlığı araştırılmalıdır.

Günümüzdeki modern yoğun bakım tedavisinden önce mortalite %50 iken bugün %10-20 arasındadır<sup>75</sup>. 10 yaşın altındaki çocuklarda mortalite daha yüksektir. Bu, vücut ağırlığının her kilogramı için emilen toksin dozunun daha fazla olmasına bağlıdır. Protrombin zamanı zehirlenmenin ağırlığını gösteren güvenilir bir laboratuvar bulgudur. Serum amanitin düzeyleri Phalloides zehirlenmesi tanısını kanıtlar. Ancak zehirlenmenin ağırlığı ve prognoz ile korelasyon göstermez<sup>76</sup>.

Phalloides zehirlenmesinin tedavisi başlıca 3 yönde yapılır:

Destek tedavi; su ve elektrolit kaybının tedavisidir. Hasta ilk 24 saat içinde 4-6 litre sıvı kaybeder, bunun intravenöz yolla karşılanması gereklidir.

Zehrin vücuttan uzaklaştırılması: Mantarı yedikten sonra 36 saat içinde yapılacak olan mide yıkanması henüz emilmemiş olan zehiri ve mantar artıklarını uzaklaştırmak için yararlıdır. Kandaki amatoksinleri uzaklaştırmak için hemodiyaliz, hemofiltrasyon, hemoperfüzyon ve plazmaferez önerilmektedir. Amatoksinler kolaylıkla glomerüllerden filtre olduklarından, sıvı verilmesinin filtrasyonu sağlamak açısından yararı vardır<sup>77</sup>.

Kemoterapi: Amatoksinlerin karaciğer hücreleri tarafından tutulmasını önlemek için tiotik asit, sitokrom C ve steroidler kullanılabilir. Ancak yapılan araştırmalar bu ilaçların ya etkisiz ya da etkisinin şüpheli olduğunu göstermiştir. Bugün bütün dünyada kabul edilen ve etkisi kanıtlanmış olan iki ilaç penisilin ve silibindir<sup>72-73</sup>. Penisilin amanitinin hepatositlere girmesini engeller ve toksinin plazma proteinlerinden ayrılmasını sağlayarak böbrek yoluyla atılımının artması sağlanır. Penisilin ayrıca barsak florasını sterilize ederek, zehirlenmenin son döneminde gözlenen ağır ansefalopatiden sorumlu bir nörotransmitter olan gama-aminobütirik asidi yapan barsak bakterilerini öldürür<sup>76</sup>. Penisilin çok yüksek dozlarda kullanılmalıdır, silibinin ise daha düşük dozlarda etkilidir ve yan etkisi yoktur.

Eğer zehirlenme klinik ve laboratuvar olarak kanıtlanmadıysa hasta 24 saat sonra taburcu edilebilir. Birinci ve ikinci derece zehirlenenler beşinci günde taburcu edilebilir. Üçüncü derecede zehirlenenler en az bir hafta yatırılmalıdır. Transaminazlar ve tromboplastin zamanı normale dönmelidir. Hasta yaşarsa genellikle sekel kalmaz. Ancak hastanın zehirlenme öncesinden mevcut karaciğer veya böbrek hastalığı varsa phalloides zehirlenmesi sonucu bu hastaların durumları ağırlaşabilir<sup>72</sup>.

## **2.2. *Amanita phalloides* Toksinleri**

*Amanita phalloides* toksinleriyle ilgili ilk çalışmalara 19. yüzyılda rastlanmaktadır ve mantarın toksinlerine dair ilk bilgilere 19. yüzyılın sonlarında 1891 yılında ulaşılmış, “Phallin” adı verilen hemolitik etkili olan bir bileşik izole edilmiştir<sup>73</sup>. Yirminci yüzyılın ilk yarısına kadar süren çalışmalarda; *Amanita phalloides* mantarına ait ilk zehirli bileşik olan “Amanitoxin” deney hayvanlarına uygulanarak toksisitesi tespit edilmiş<sup>74</sup>, sonrasında ise sırasıyla “Phalloidin”<sup>75</sup> ve “Amanitin” bulunmuştur<sup>76</sup>.

*Amanita phalloides* ve diğler *Amanita* türlerinin içerdığı zehirler, aralarında Nobel ödülüne layık görülmüş bilim adamlarının da bulunduğu pek çok araştırmacı tarafından Almanya, Amerika, Japonya ve İtalya gibi ülkelerde araştırılmış ve halen daha bazı bilim adamları tarafından araştırılmaktadır<sup>77</sup>.

*Amanita* cinsindeki belirli türlerde toksinlerin dağılımları ve yoğunluğu farklılıklar gösterebilir. Daha genç olan mantarlarda gelişmiş olanlara göre daha az yoğunlukta toksin bulunur. Fallotoksinler açısından bakıldığında; mantarı sap kısmında bulunan volva denilen halka şeklindeki yapı en zehirli parçadır. Zehir yoğunluğu aynı bölgedeki farklı türlerde de çok fazla farklılıklar gösterebilir<sup>78</sup>.

Amatoksinlerin etkisini ana hatlarıyla belirlemek gerekirse; amatoksinlerin en önemli etkisi RNA polimeraz inhibisyonudur. Amatoksinler özellikle RNA polimeraz II üzerinde güçlü inhibisyon yaparlar. Amatoksinler ile amatoksinlere maruz kalan kişinin hücrelerindeki RNA polimerazlar arasında çok güçlü ve karmaşık bir etkileşim meydana gelir. Sonuç olarak RNA polimerazlar ile amatoksinler arasındaki bağ kompetatif olmayan türde bir inhibisyona neden olur<sup>78</sup>. Kompetatif olmayan inhibisyonda inhibitör enzimin aktivitesini azaltır. Ayrıca enzime daha önceden substratın bağlı olması da inhibitörün yaptığı etkiyi engelleyemez. Böylece kompetatif olmayan inhibisyonda inhibitör yine aynı güçte inhibitör etkisini gösterir<sup>79</sup>. Memelilere ait olmayan polimerazların amanitinlere karşı zayıf denecek kadar az hassasiyet gösterdiği saptanmıştır. Amatoksinler memelilerde karaciğer nekrozuna neden olurlar. Ayrıca belirli ölçüde de böbreklerde hasar oluştururlar. Bu durumun ana nedeni, hücre çekirdeğine ait bileşenlerin parçalanma ve ayrılma sürecine girmeleriyle hücrel değişiklerin meydana gelmesidir<sup>80</sup>.

### **2.2.1. Amatoksinler**

Günümüzde ökaryotik RNA polimeraz enzimleri üç gruba ayrılmış, çok farklı büyüklüklerde olan, çeşitli yapı ve görevlere sahip proteinlerdir.

RNA polimeraz II enziminin amatoksinler ile kurduğu güçlü bağ çeşitli yöntemler ile saptanmaya çalışılmış, amatoksinlerin RNA polimeraz enzimlerine gösterdiği ilginin hangi durumlarda azalabileceği denenmiştir. Amatoksinlerin RNA polimeraz II enzimidaki bağlanma bölgesinin tanımlanması dana timusu üzerinde Tritiyum etiketli amatoksin kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mutasyonlu bir *Drosophila melanogaster*

embriyosunun amatoksin direnci gösteren RNA polimeraz II enziminin en büyük alt ünitesi mutagenез yoluyla değiştirilmiştir<sup>81</sup>.

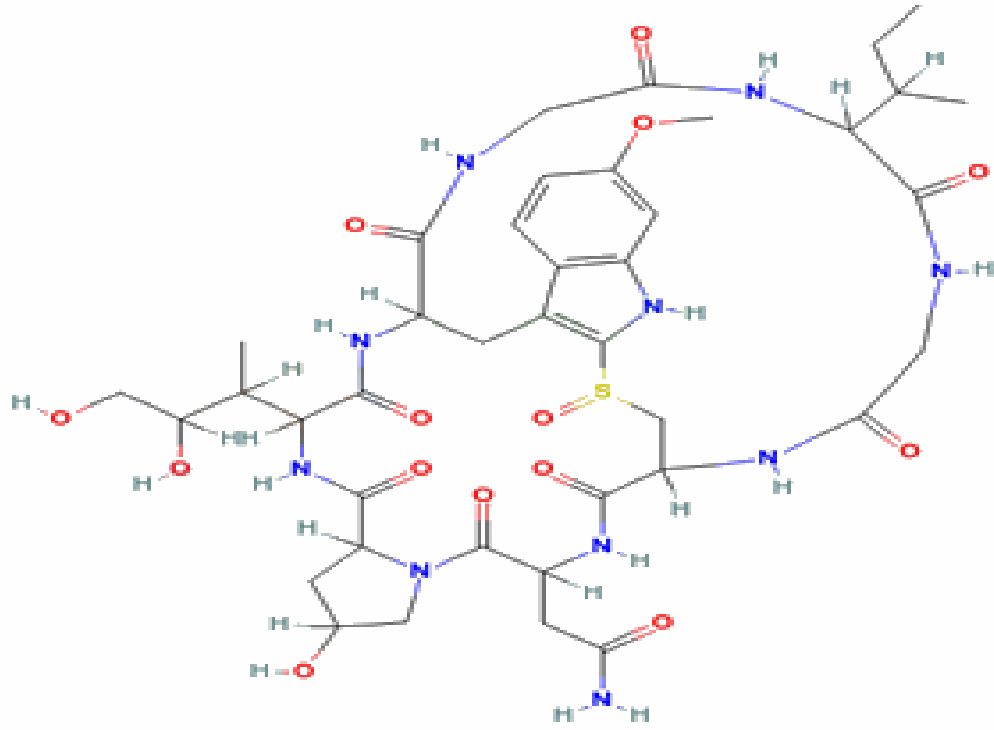
Amatoksinler ile bağlanma eğilimi gösteren proteinler, bu proteinlerin toksine olan yüksek bağlanma güçlerinin gözlemlenmesi ile saptanabilir. Amatoksin bağlayıcı özelliği bulunan bir protein dana timusunda tespit edilirken<sup>82</sup>, diğer bir amatoksin bağlayıcı protein buğday tohumundaki hücrelerde bulunmuştur. Amatoksinler kalıp DNA molekülü ile herhangi bir etkileşime girmeksizin RNA polimeraz II enzimiyle etkileşerek transkripsiyonu engellemektedirler. Ökaryotik hücre RNA polimeraz enzimlerinin amatoksinlere olan hassasiyetleri oldukça değişkendir. Bilinen üç ökaryotik RNA polimeraz enziminden amatoksinlere en fazla ilgi göstereni RNA polimeraz II enzimidir. Memelilerde olduğu kadar böcek ve balıklardaki RNA polimeraz II enzimleri de amatoksinlere karşı son derece hassastır. Genel olarak bakıldığında memelilere ait olmayan RNA polimerazlar daha az etkilenmektedirler. Mantarlarda bulunan RNA polimeraz II enzimleri ise memeli RNA polimeraz II enzimlerine göre amatoksinlere 50 kat daha az hassasiyet göstermektedirler<sup>83</sup>.

#### **2.2.1.1. Alfa amanitin**

Alfa amanitin halkalı yapıda 8 amino asit içeren bir peptittir. Alfa amanitin *Amanita phalloides* ile birlikte bazı *Amanita* cinsi mantarlarda bulunmaktadır. *Amanita virosa* ve *Amanita bisporigera* mantarlarında da alfa amanitine rastlanmıştır. Bunların dışında *Galerina marginata* ve *Conocybe filaris* mantarlarında da alfa amanitin bulunmuştur. Alfa amanitin amatoksinler içinde en ölümcül olanlardandır. Toksik etkisinin bu kadar güçlü olması nedeniyle *Amanita phalloides* mantarına Dünya'nın pek çok yerinde kötü bir şöhret kazandırmıştır. Çok farklı yerel isimlerle anılmaktadır.

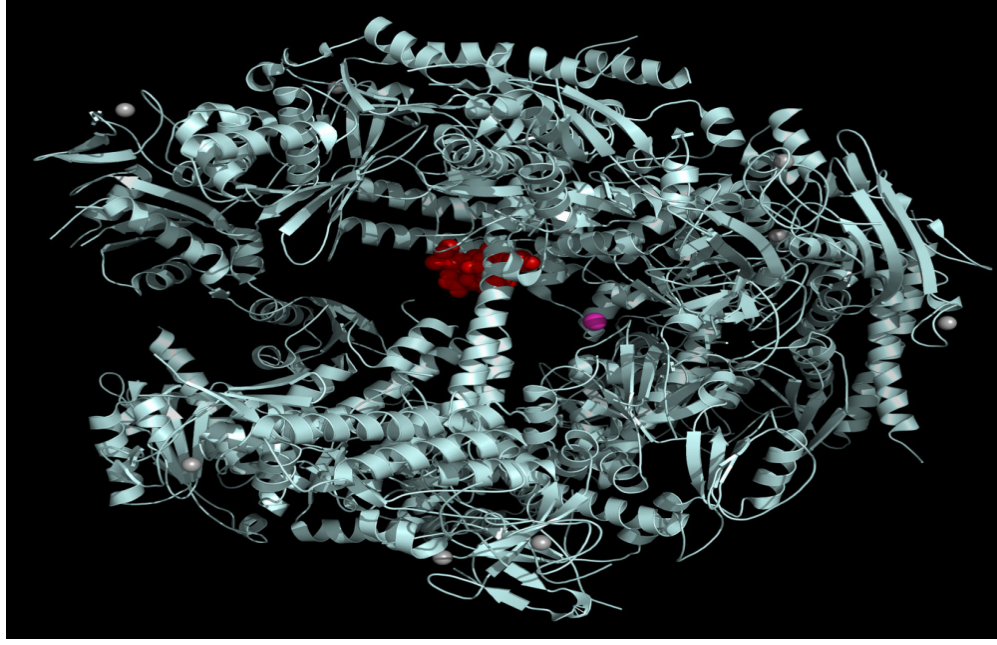
Amanitinin oral alımında popülasyonun yarısını öldüren doz(LD<sub>50</sub>) değeri yaklaşık olarak 0,1 mg/kg kadardır. Amino asit zincirindeki dallanmadan dolayı alfa amanitinin bir polipeptit olarak yapısı diğer polipeptitlerden farklıdır. Bilinen diğer fungal peptitlerin aksine amatoksinler ribozomda sentezlenir<sup>84</sup>.

Alfa amanitin ile zehirlenmenin ilk 24 saatinde RNA içeriğinin gittikçe azaldığı amanitinin biyokimyasal aktivitesi üzerine yapılan detaylı incelemelerde tespit edilmiştir. Amanitinin 10 ng/ml düzeyindeki miktarı RNA polimeraz aktivitesinin yarısından fazlasını inhibe etmiştir<sup>85</sup>.



Şekil 2: Alfa amanitinin bisiklik moleküler yapısı

Alfa amanitin ve beta amanitin kinetiklerinin araştırıldığı bir çalışmada *Amanita phalloides* zehirlenmesi geçiren 45 hasta incelenmiştir. Hastaların kan, idrar, gastrointestinal sıvı, dışkı ve çeşitli dokularından hazırlanan örnekleri, Yüksek basınçlı (performanslı) sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle amatoksin varlığının saptanması için incelenmiştir. Pozitif sonuçlu hastalardan yaklaşık 30. saatte, saptanabilir amatoksin içermeyen hastalardan ise yaklaşık 70. saatte ilk örnekler alınmıştır. Çeşitli vakalarda tespit edilen plazma amatoksin değerleri alfa amanitin için 8 ile 190 ng/ml arasında bulunmaktadır. Beta amanitin için de benzer değerler gözlemlenmiştir. Ayrıca yapılan idrar ve dışkı testlerinde farklı miktarlarda hem alfa amanitin hem de beta amanitin saptanmıştır. Amatoksinlerin hastalardaki kinetiklerine dair bir veri olarak; dört olgunun üçünde karaciğer ve böbreklerde 5. günden sonra bile alfa amanitin ve beta amanitin tespit edilmiştir. Amatoksinler kanda yaklaşık 36. saate kadar gözlenebilirken, idrarda 4. güne kadar toksin varlığı gözlenebilmiştir<sup>86</sup>.



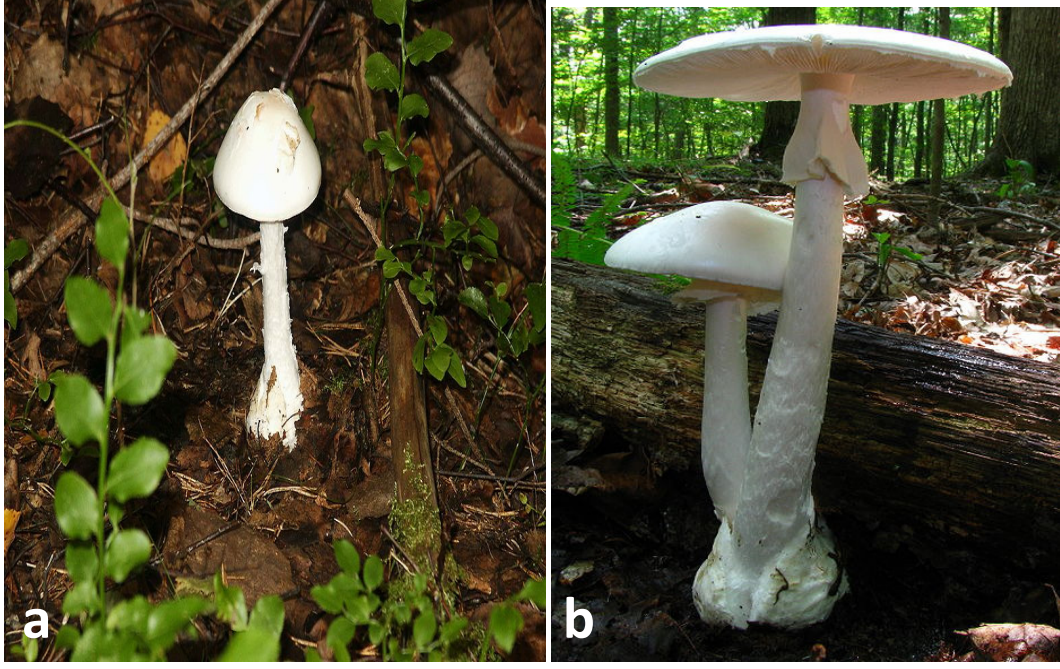
Şekil 3: Fermentasyon işlemlerinde kullanılan *Saccharomyces cerevisiae* mayasından elde edilen RNA polimeraz II ile alfa amanitin (kırmızı) bağlanması

Alfa amanitin ve beta amanitin kinetiklerinin araştırıldığı bir çalışmada *Amanita phalloides* zehirlenmesi geçiren 45 hasta incelenmiştir. Hastaların kan, idrar, gastrointestinal sıvı, dışkı ve çeşitli dokularından hazırlanan örnekleri, HPLC yöntemiyle amatoksin varlığının saptanması için incelenmiştir. Pozitif sonuçlu hastalardan yaklaşık 30. saatte, saptanabilir amatoksin içermeyen hastalardan ise yaklaşık 70. saatte ilk örnekler alınmıştır. Çeşitli vakalarda tespit edilen plazma amatoksin değerleri alfa amanitin için 8 ile 190 ng/ml arasında bulunmaktadır. Beta amanitin için de benzer değerler gözlemlenmiştir. Ayrıca yapılan idrar ve dışkı testleri HPLC tekniği kullanılarak incelendiğinde farklı miktarlarda hem alfa amanitin hem de beta amanitin saptanmıştır. Amatoksinlerin hastalardaki kinetiklerine dair bir veri olarak; dört olgunun üçünde karaciğer ve böbreklere ait örneklerde 5. günden sonra bile alfa amanitin ve beta amanitin tespit edilebilmiştir. Alfa amanitin ve beta amanitin kanda yaklaşık 36. saate kadar gözlenebilmektedir. İdrar örneklerinde ise amatoksinlerin görülme süresi çok daha uzundur. Bu çalışmada 45 hastanın 43 tanesinden alınan idrar örnekleri incelenmiş, alfa ve beta amanitin 4. güne kadar idrarda bulunduğu gözlemlenmiştir<sup>86</sup>.



### 2.2.1.2 Alfa amanitin içeren mantar türleri

Alfa amanitin ilk olarak *Amanita phalloides* mantarında tespit edilmiştir. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda *Amanita virosa*, *Amanita bisporigera*, *Galerina marginata* gibi bazı mantarlarda da alfa amanitin varlığı gösterilmiştir.



Resim 4: *Amanita virosa* (a) ve *Amanita bisporigera* (b)



Resim 5: *Galerina marginata* (a) ve *Amanita phalloides alba* (b)

### 2.2.2. Fallotoksinler

İkili halka yapısına sahip fallotoksinler 7 amino asitten oluşmaktadırlar. Isıya dayanıklı renksiz ve kristalize olma eğilimindedirler. Su ve metanolde çözünürler.

*Amanita phalloides* mantarının yanı sıra *Amanita verna* ve *Amanita virosa* da fallotoksinleri içermektedir<sup>87</sup>. Fallotoksinlerden biri olan falloidin toksisitesi 1938 yılından bu yana araştırılmaktadır. Günümüzde fallotoksinlerin F-aktin filamentlerine spesifik olarak bağlandığı böylece bir araya gelmiş filamentlerin oluşturduğu yapıyı güçlü bir şekilde stabilize ettiği bilinmektedir. İlk önceleri aktin yapılarının sadece çizgili kas sisteminin bir parçası olduğu bilinmekteydi. Aktin filamentleri çizgili kaslarda bulunan işlevsel birimlerin ince filament kısımlarını oluştururlar. Daha sonraları yapılan çalışmalarda aktin proteinlerinin hücre iskeletini oluşturan proteinlerin olduğu saptanmıştır. Fallotoksinler özellikle optimal olmayan koşullarda G-aktin polimerizasyonunu aktive ederken F-aktin filamentlerini de stabilize ederler<sup>88</sup>. Parenteral yolla verilen fallotoksinler karaciğere ulaştığında hepatositlerdeki taşıma sistemiyle hücre zarından geçerler ve hemen ardından çift katlı lipit tabakasının arkasında bulunan aktin ile etkileşime girerler<sup>89</sup>. Sitotoksik olan bu toksin grubu intestinal olarak vücuda geçemese de parenteral olarak verildiğinde etkilerini kısa sürede göstermekte, karaciğer nekrozu yapıp, saatler içerisinde ölüme neden olmaktadır<sup>87</sup>.

### 2.2.3. Virotoksinler

Amatoksinler ve fallotoksinlerden farklı olarak virotoksinler tek halkalı yapıya sahiptirler. *Amanita virosa* mantarı virotoksin içermektedir. Virotoksinler sitotoksik değildirler. Virotoksinler de fallotoksinler gibi parenteral yolla verildiklerinde karaciğer nekrozu yaparlar<sup>90</sup>.

### 2.2.4. Alfa amanitin analiz yöntemleri

Amatoksinlerin laboratuvar analizleriyle tespit edilmesi oldukça uzun bir zaman içerisinde çeşitli aşamaların kat edilmesi ile gerçekleşmiştir.

İnce tabaka kromatografisi (İTK veya TLC) kullanılarak yapılan tayinlerde kuru toz halindeki mantar veya taze mantar öğütülmüş olarak kullanılır. Sürekli metanol ilavelerinin yapıldığı bu yöntemde kaynatma ve kurutma işlemleriyle metanol uçurulup

özel bir jel tabakaya uygulanmak üzere bakiyeye tekrar metanol ilave edilir. Uygulama sonrasında jel tabaka hazırlanan çözücü içerisinde yükseltilir. Sonrasında belirteç püskürtme şeklinde tabakaya uygulanır. Tabaka kurutulur ve HCl buharı ile doyurulmuş tanka koyulur. Bu arada incelenen örnekte amatoksinler mor, fallotoksinler mavi, virotoksinler ise yeşil renge yakın veya renksiz olarak gözlenirler<sup>91</sup>.

Yaklaşık 30 yıl önce yayınlanan bir radyoimmünojenik yöntem sayesinde tek bir adımda sınıflandırma yapmak mümkün olmuştur<sup>92</sup>. Bu radyolojik yöntemde amatoksinin başarılı bir şekilde saptanabilmesi için inkübasyon sıvısındaki radyoaktivitenin hesaplanması gerekmektedir. Bu şekilde mililitrede 3 ng kadar amatoksin saptanabilmektedir.

Alfa amanitinin insan plazması örneklerinde saptanması için bir ters faz HPLC yöntemi uygulanmıştır<sup>93</sup>.

1992 yılında yayınlanan bir yöntemde ters faz HPLC metoduyla 8 adet amatoksin ve fallotoksinin tespit edilmesi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem ile hem nötral toksinler olan alfa amanitin, gama amanitin ve falloidin gibi toksinler hem de asidik olan beta amanitin ve fallasidin gibi toksinler tespit edilebilmiştir. Bu HPLC yönteminde her bir toksin için limit değerler ekstraksiyonun 1 mililitresinde 10 ng toksin miktarıdır<sup>94</sup>.

HPLC yöntemiyle *Amanita* toksinlerinin tayininde ince tabaka kromatografisinde elde edilen kuru bakiyeye belirli miktarda metanol eklenerek çözelti oluşturulur. Hazırlanan çözelti kolona enjekte edilerek, yüksek basınç ve çok yavaş bir akımda kolondan geçirilir. Kolon sonrasında belirli dalga boylarında tarama yapılır<sup>95</sup>.

Kanda veya idrarda HPLC ile alfa amanitin bakılabilir. HPLC yöntemiyle kan analizi, serum üzerindeki bir dizi işlemle sonra gerçekleştirilir<sup>96</sup>.

2007 yılında yayınlanan bir makalede serum ve karaciğer alfa amanitin analizi için hızlı bir yüksek performans sıvı kromatografisi-kütle spektrometre (LC-MS/MS/MS) tekniği açıklanmaktadır. Serumun çalışma için uygun hale getirilmesinde başlangıç olarak serumda bulunan proteinler asetonitril ile çöktürülmüş ve ardından metilen klorür kullanılarak asetonitril ortadan kaldırılmıştır. Karaciğer ise sulu asetonitril ile homojenize edilmiş ve hemen ardından metilen klorür kullanılarak asetonitril ortadan kaldırılmıştır<sup>97</sup>.

Bu teknikte temel olarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan moleküller kütle dedektörü ile analiz edilmektedir. Böylece

ilaçların ve metabolitlerinin iyon yüküne göre küçük konsantrasyonda bile ölçülmesini sağlayan miktar tayini yapmaktadır<sup>98</sup>.

### 2.2.5. Saflaştırma yöntemleri

Amatoksinler grubundan olan beta amanitin üzerinde yapılan bir saflaştırma çalışmasında kurutulmuş mantardan lipitleri uzaklaştırmak için kloroform kullanılmış, tuzsuzlaştırma yapılmış, asidik ve nötral pH'da adsorpsiyon kromatografisi ve iyon değiştirici kromatografi uygulanmıştır. İnce tabaka kromatografisi ile toksin homojenize edilmiş ve biyolojik aktivitesini yitirmemiştir<sup>99</sup>.

Mantarların antimikrobiyal etkisine dair yayınlanan bir makalede HPLC yöntemi kullanılarak alfa amanitin, beta amanitin ve falloidin toksinleri *Amanita pallidorosea* mantarının çeşitli kısımlarından belli miktarlarda elde edilmiştir<sup>100</sup>.

Alfa amanitin saflaştırılmasına dair bir çalışmada gradiyente göre eleme modunda mobil faz olarak amonyum asetat – asetonyril bileşenlerinin kullanıldığı ters faz yüksek performans sıvı kromatografisi ve UV spektrumu kullanılarak alfa amanitin saflaştırması yapılmıştır<sup>101</sup>.

*Amanita* cinsinin üyelerinden yerel adı "East Asian Death Cap" olan *Amanita subjunquillea* mantarından peptit toksinlerin ayrımı ve saflaştırılmasına dair bir çalışmada yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılmıştır<sup>102</sup>.

Güney Afrika'daki tanımlanmış ve yerli *Amanita* türlerinde amatoksin ve fallotoksin zehirlerinin araştırılmasına dair bir çalışmada analiz ve saflaştırma için HPLC yöntemi kullanılmıştır<sup>103</sup>.

### 2.3. Alfa Amanitinin Terapötik Potansiyeli

Birçok kanser türünde insan epitelyal hücre adezyon moleküllerinin üretimiyle ilgili genler normalin çok üstünde okunurlar. Yapılan bir çalışmada alfa amanitin ile konjuge edilmiş anti epitelyal hücre adezyon molekülü antikoru pankreatik karsinomaya karşı denenmiş ve ilk çalışmalarda umut verici bazı sonuçlar gözlemlenmiştir<sup>104</sup>.

Mantarların antimikrobiyal etkisine dair yayınlanan bir makalede *Amanita* cinsi mantarların peptit toksinlerin antifungal etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada HPLC

yöntemi kullanılarak alfa amanitin, beta amanitin ve falloidin toksinleri *Amanita pallidorasea* mantarının çeşitli kısımlarından belli miktarlarda elde edilmiştir. Elde edilen her bir toksinin *Blastomyces albicans* üzerinde oluşturduğu antifungal etkiler karşılaştırılmıştır<sup>100</sup>.

Patolojik özellik gösteren ve hastalar üzerinde belirli koşullarda patolojik özellik kazanan bazı bakteriler; insanlar onlardan kurtulmak için yeni çareler, yeni ilaçlar ürettikçe sürekli ve çok çeşitli direnç mekanizmaları geliştirerek karşılık verirler. Bu yüzden tıpkı antiviral ve antifungal maddelerde olduğu gibi antibakteriyel özellik gösteren yeni maddelerin keşfi ve ilaç olarak sürekli geliştirilmeleri geçmişte olduğu kadar günümüzde de çok önem arz etmektedir. Mantarların antibakteriyel aktivitelerin araştırıldığı bir çalışmada mikrodilüsyon yöntemiyle test edilen yüksek yapılı ve iç parazit olarak yaşayan mantar ekstrelerinden bazılarının önemli antibakteriyel aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir. *Amanita* cinsi mantarlardan hazırlanan örneklerin *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* bakterileri üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir<sup>105</sup>.

#### **2.4. Alfa Amanitinin Membranlardan Geçişi**

Alfa amanitinin karaciğerdeki taşıma sistemlerinden ve hepatosit membranlarından geçişinin araştırıldığı bir çalışmada fare karaciğeri tarafından alınan alfa amanitin toksini, izole edilen hepatositlerde ışığa duyarlı imleme yoluyla araştırılmıştır. Alfa amanitinin yayında diğer bazı amatoksinlerin de hepatositlere alındığı gözlenmiştir. Hepatositlerin amatoksinleri alışında sinüzoidal safra tuzu taşıma sisteminin aracılık ettiği belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler hepatik taşıma sisteminin çok çeşitli amfipatik moleküller için çoklu özgünlüğü olan bir sistem olduğunu desteklemektedir<sup>106</sup>.

Birçok toksini kimyasal güvenlik ve çeşitli yapısal özellikleri bakımından değerlendiren ve toksinlerle ilgili çok detaylı verilerin yer aldığı bir kurumun internet sitesine göre amatoksin zehirlenmeleri daima toksinin veya toksin içeren mantarların yutulmasıyla gerçekleşmektedir. Alfa amanitin yutulduğunda gastrointestinal yoldan emilerek etkisini göstermektedir. Deri yoluyla, solunum yoluyla, göze temasla, parenteral yolla veya başka her hangi bir yolla toksinin vücuda girişi veya zehirlenmelere neden olduğu bildirilmemiştir<sup>107</sup>.

Alfa amanitinin deriden emilimini araştırdığımız bu çalışmada toksinin deri yoluyla vücuda geçememesi yakın bir gelecekte yeni bir dış parazit ilacı olarak alfa amanitinden yararlanmamızı sağlayabilir. Alfa amanitin, özellikle her geçen gün daha fazla direnç mekanizması geliştiren patolojik mantarların yüzeysel enfeksiyon yapan türlerine karşı etkili bir ajan veya bir ilaç kombinasyonunda önemli bir bileşen olabilir. Ayrıca alfa amanitin, hayvanlarda dış parazit enfeksiyonlarına neden olan kene gibi zararlılara karşı kullanılarak ekonomik anlamda da güçlü bir katkı sağlayabilir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Etik kurul izin belgesi

Bu çalışmaya ilişkin, Düzce Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'ndan (DÜ-HADYEK) 2011/006 nolu etik kurul izni alınmıştır.

##### 3.1.2. Standart ve kitler

Alfa amanitin standardı Sigma-Aldrich (ABD) firmasından elde edilmiştir.

##### 3.1.3. *Amanita phalloides* mantarlarının toplanması

*Amanita phalloides* mantarları 2011 yılının Ekim ve Kasım aylarında, Yeşilyayla Kasabası ormanlık alanından (Gümüşova/Düzce) toplanmıştır. Toplanan mantarlar toplama sırasında Düzce Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde sistematik olarak tanımlanmıştır. Tanımlamada makroskopik ve mikroskopik özellikleri incelenmiştir. Makroskopik olarak şapka şekli, rengi, çapı, lamel şekli, sap lamel birleşmesi, sap boyu, yüksük ve kapçık şekilleri bakılmıştır. Mikroskopik olarak ise binoküler mikroskopta, x100 büyütmede lamellerden % 20 KOH ile hazırlanmış preparatlarda basidiospor, basidium ve hiflerin şekil ve boyutları incelenerek tanı konulmuştur (Resim 6).

##### 3.1.4. Hayvan materyali

Deneyde 60 adet Balb/c ( $30 \pm 5$ g) erkek fare kullanılmıştır. Hayvanlar kontrol-1 saat, kontrol-6 saat, kontrol-24 saat, intraperitoneal (ip)-1 saat, ip-6 saat, ip-24 saat, perkutan 1 saat, perkutan 6 saat, perkutan 24 saat olmak üzere rastgele 9 gruba ayrılmıştır (Tablo 2). Ayrıca 6 fare de boş HPLC analizi ve kalibrasyon analizleri için kullanılmıştır. Fareler her kafeste 6 adet olacak şekilde yerleştirilmiştir. Deney hayvanlarının tamamı,



çalışma boyunca  $22 \pm 5$  °C oda ısısında, 12 saat aydınlık-karanlık döngüsü bulunan ortamda takip edilmiştir.

Tablo 2: Denejde kullanılan gruplar ve yapılan işlemler

Grup Adı	n sayısı	Yapılan İşlem
Kontrol-1 saat	6	ip ve perkutan distile su, 1 saat sonra dekapitasyon
Kontrol-6 saat	6	ip ve perkutan distile su, 6 saat sonra dekapitasyon
Kontrol-24 saat	6	ip ve perkutan distile su, 24 saat sonra dekapitasyon
İp-1 saat	6	ip 1mg/kg alfa amanitin, 1 saat sonra dekapitasyon
İp-6 saat	6	ip 1mg/kg alfa amanitin, 6 saat sonra dekapitasyon
İp-24 saat	6	ip 1mg/kg alfa amanitin, 24 saat sonra dekapitasyon
Perkutan 1 saat	6	perkutan 1mg/kg alfa amanitin, 1 saat sonra dekapitasyon
Perkutan 6 saat	6	perkutan 1mg/kg alfa amanitin, 6 saat sonra dekapitasyon
Perkutan 24 saat	6	perkutan 1mg/kg alfa amanitin, 24 saat sonra dekapitasyon



Resim 6: *Amanita phalloides*'in makroskopik ve mikroskopik resimleri



### **3.1.5. Laboratuvar koşulları**

Çalışmaların tamamı Düzce Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Farmakoloji ve Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekteştirilmiştir. Çalışmamızda Tıbbi Farmakoloji ve Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan cihaz, teknik malzeme ve sarf malzemeleri kullanılmıştır.

#### **3.1.5.1. Cihazlar ve teknik malzemeler**

Tıraş makinası

Homojenizatör

Sokslet ekstraksiyon sistemi

Çok bölmeli hava akımlı kurutucu

pH ölçüm cihazı (Hanna)

Distile su cihazı (TKA-pacific)

Ependorf tüpler

Farklı çaplarda mikro filtreler

Santrifüj (Nüve)

Mikrosantrifüj (Eppendorf Centrifuge-5415 R)

Öğütücü (Premium)

Vortex (Velp)

Manyetik karıştırıcı ( Lab Companion)

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC, Shimadzu)

Hassas terazi (Precisa)

Otomatik mikropipetler (Nichiryo)

Buzdolabı (Profilo)

Mikro enjektör (Hamilton)

Cerrahi aletleri

### **3.1.5.2. Kimyasallar**

Alfa amanitin (Sigma-Aldrich)

Anestezikler (ketamin ve benzerleri)

Amonyum asetat (Merck)

Asetonitril (Sigma-Aldrich)

Metanol (Merck)

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Alfa amanitin saflaştırması**

Saflaştırma işlemleri alfa amanitinin yeterli miktarlarda elde edilebilmesi için daha önce tanımlanmış olan yöntemle yapılmıştır<sup>108</sup>. Bu yöntem aşağıdaki gibidir:

HPLC analizlerindeki tüm çözücüler analitik kalitede kullanılmıştır. Mantarlar sokslet aparatında %50 metanolde ekstrakte edilmiş, 2 defa preparatif HPLC saflaştırma işlemi uygulanmıştır. Her bir aşamadan sonra saflık oranları ölçülmüştür. Toksinin doğrulaması analitik HPLC'deki tutulma zamanı ve UV spektrumu karşılaştırılması yöntemleriyle yapılmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  SH olarak verilmiştir.

#### **3.2.1.1. Mantar özütü (ekstre) elde etme yöntemi**

Mantarlar 50-60°C hava akımı altında 12 saatte kurutulmuş, öğütülerek toz haline getirilmiştir. 10 gramlık 6 ayrı sokslet filtresi içine alındı, 6 farklı kanalda 150 ml %50 metanolde 4 saat sokslet aparatında ekstraksiyonu yapılmıştır (Resim 7). Elde edilen ekstrelerin vakum evaporatörde tam kuru oluşuna kadar 50°C'de buharlaştırılmıştır. Kalan materyal üzerine 1. mobil fazdan 10 ml eklenerek iyice çözülmüştür, 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edilmiş, üstteki sıvı kısım alınmış, 45  $\mu$ m filtreden geçirilerek preparatif HPLC sistemine 1 ml enjekte edilmiştir.



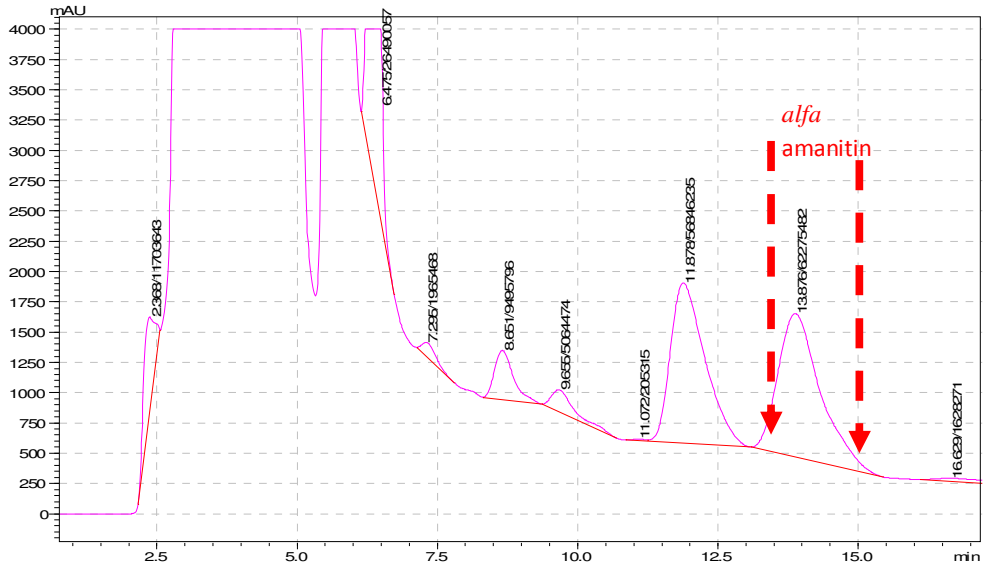
Resim 7: Sokslet ekstraksiyon sistemi

### 3.2.1.2. Preparatif HPLC tekniği

Degazer, pompa ve dedektör 2 farklı paralel hatta bağlanarak bir vana yoluyla hem preparatif hem analitik HPLC sistemleri oluşturulmuştur. Preparatif sistemde degazer (Shimadzu DGU-20A<sub>3</sub>) 0.05 ml/dakika hassasiyetli pompa (Shimadzu LC-6AD), bilgi işlem ünitesi (Shimadzu CBM-20A), ayırıcı vana (preparatif/analitik), 5 ml manuel enjektörlü sample loop, C18 ODS 10 um partikül, 250x20 mm preparatif kolon (GL Science Inc.), diyod array dedektör (Shimadzu SPD-M20A), fraksiyon toplayıcı (Shimadzu FRC-10A) sistemi kullanılmıştır (Resim 8). Mobil faz akış hızı 16 ml/dakika izokratik olarak kullanılmıştır. Birinci mobil faz olarak amonyum asetat (50 mM, pH 5.5 asetik asit), asetonitril, metanol 80+10+10 (v/v/v) kullanılmıştır. Öncelikle alfa amanitin standardı 100µg/ml bu sisteme uygulanmış ve tutulma zamanı ile toksin UV spektrumu kaydedilmiştir. Hazırlanmış olan *A. phalloides* ekstresi bu sisteme 1 ml uygulanmıştır. Alfa amanitin standardı ile aynı tutulma zamanında gelen pik, başlangıcından sonuna kadar fraksiyon toplayıcı ile toplanmıştır (Şekil 4). Elde edilen fraksiyon vakum evaporatörde 50°C'de kurutulmuş, 1 ml olan fraksiyon %40 metanol içerisinde çözülmüş ve ikinci saflaştırma için preparatif HPLC sistemine uygulanmıştır.

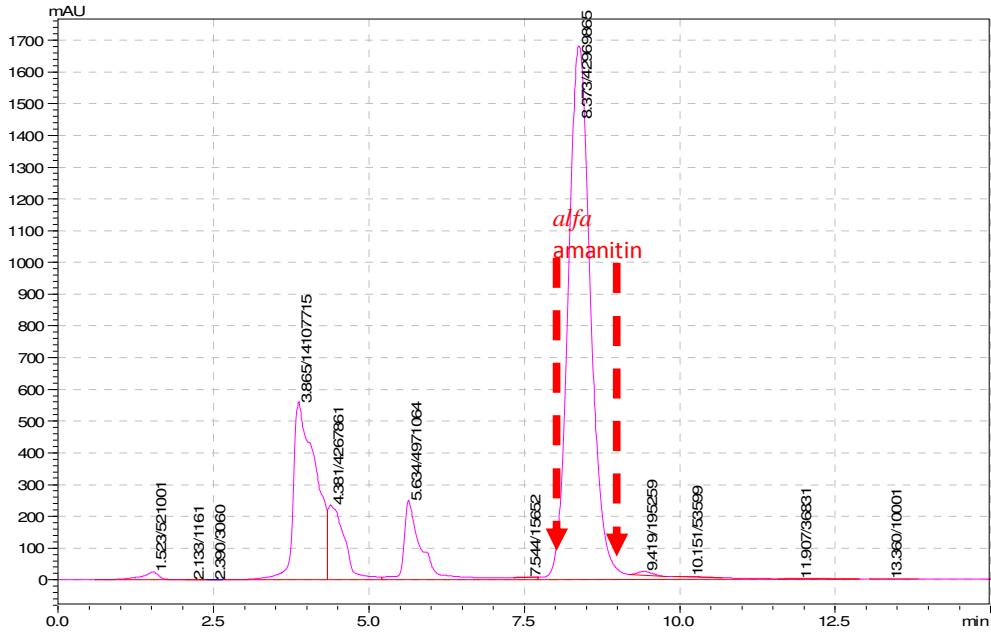


Resim 8: Çalışmada kullanılan HPLC cihazı ve ek aparatları



Şekil 4: 1. preparatif saflaştırmanın kromatogramı: Kesikli oklar fraksiyonlama başlangıç ve bitiş alanlarını göstermektedir.

Saflık oranını artırmak ve toksini amonyum asetat tuzundan arındırmak için ikinci preparatif HPLC uygulaması yapılmıştır. Hemen sonrasında ikinci mobil faz olarak %40 metanol ile uygulanmıştır. Diğer parametrelerde herhangi bir değişiklik yoktur, aynı yöntemle uygulanmışlardır. HPLC ortamına alfa amanitin standardı verilmiş ve tutulma zamanı kaydedilmiştir. Ardından fraksiyonun sisteme verilmesinden sonra standart ile aynı zamanda gelen pik, başlangıcından sonuna kadar fraksiyon toplayıcı ile alınmıştır (Şekil 5). Elde edilen fraksiyonun hacmi ölçülmüştür. Bu fraksiyondaki saflık oranını ve toksin miktarını ölçmek için 20 µL analitik HPLC sistemine uygulanmıştır.



Şekil 5: 2. preparatif saflaştırmanın kromatogramı: Kesikli oklar fraksiyonlama başlangıç ve bitiş anlarını göstermektedir.

### 3.2.1.3. Analitik HPLC

Preparatif HPLC yöntemine ek olarak aynı HPLC sistemine dahil olan analitik kolon yoluyla sistem, analiz için kullanılmıştır.

#### 3.2.1.3.1. HPLC ortamı

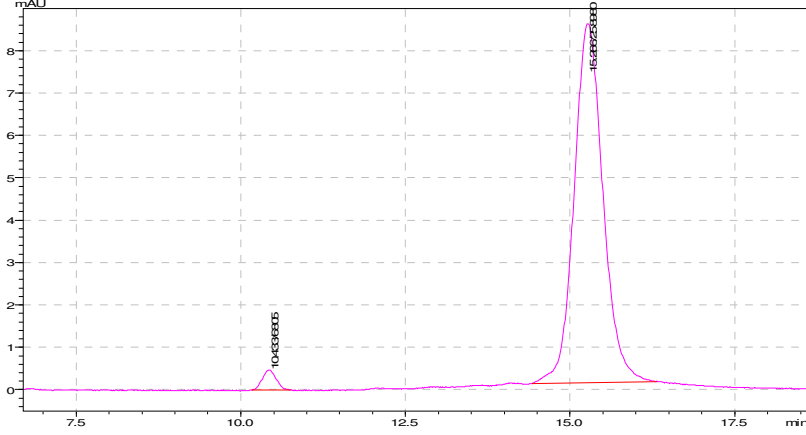
Kolon: 5 µm partiküllü, 4,6 x 250 mm C18 ODS kolon kullanılmıştır.

Mobil faz: Amonyum asetat (50 mM, pH 5.5 asetik asit), asetonitril, metanol 80+10+10 (v/v/v) kullanılmıştır.

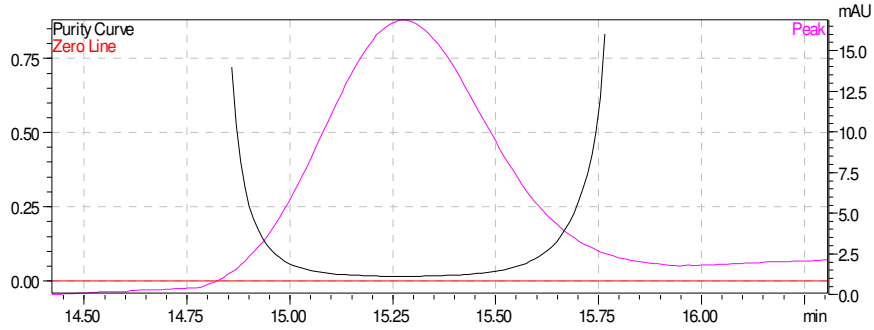
Mobil faz akış hızı: İzokratik olarak 1 ml/dak olarak ayarlanmıştır<sup>133</sup>.

### 3.2.1.4. Saflık

Bu çalışmada analitik HPLC tekniğiyle elde edilen toksin pikinin tüm piklere oranının saflık oranını verdiği kabul edilmiştir. Toksin pikinin saflığı ise UV taraması ile yapılmıştır. Elde edilen alfa amanitin saflık oranı % 99.8 (Şekil 6), pik saflık oranı 0.99995 olarak bulunmuştur (Şekil 7).



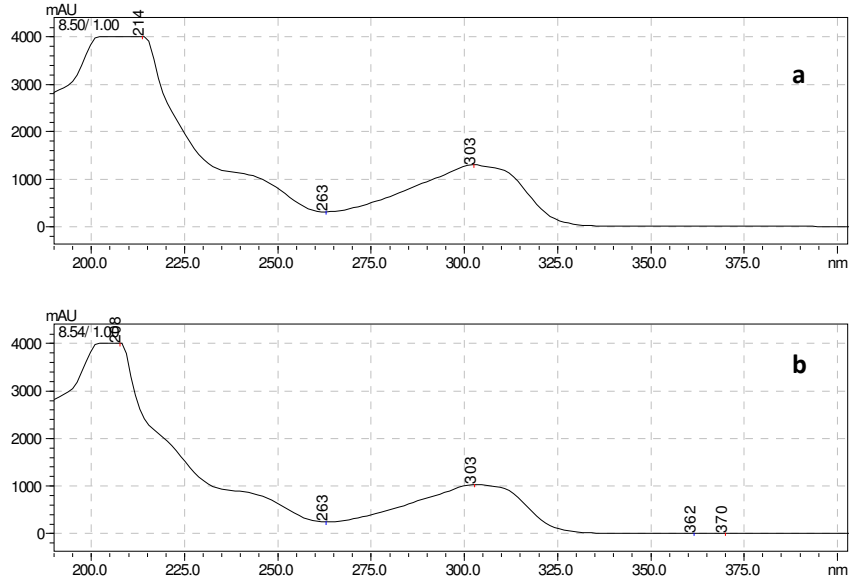
Şekil 6: Saflaştırılarak elde edilen alfa amanitin kromatogramı



Şekil 7: Alfa amanitin pikinin saflık analizi

### 3.2.1.5. Toksinin doğrulaması

Elde edilen alfa amanitin toksininin doğrulanması için 2 yöntem kullanılmıştır. İlk olarak preparatif HPLC sisteminde tutulma zamanı, ikinci olarak UV spektrumunda minimum ve maksimum absorband değerlerin karşılaştırması yapılmıştır (Şekil 8).



Şekil 8: Alfa amanitin standart (a) ve fraksiyon (b) ultraviyole spektrumu

### 3.2.1.6. Miktar analizi

Analitik HPLC sisteminde alfa amanitin standardı için 6 noktalı (her biri 3 defa tekrarlı) kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisinin denklemine, analizlerde elde edilen pik alanları uygulanarak madde miktarı ölçümü yapılmıştır. Elde edilen saf alfa amanitin çözücüsü uçurulduktan sonra 1 ml distile suda çözülerek miktar analizi yapılmıştır. Elde edilen miktar analizi sonucunda farelere 1 mg/kg olacak şekilde distile suda çözülmüş saf alfa amanitin uygulanmıştır.

### 3.2.2. Deney protokolü

Çalışma kapsamındaki bütün uygulamalar Tıbbi Farmakoloji ve Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Deney için farelere su kısıtlaması yapılmamış ve deney öncesi bir gece aç bırakılmıştır. Fareler rastgele olarak 9 gruba ayrılmıştır. Farelere 100 mg/kg ketamin ile anestezi yapılmıştır. Anestezi gerektiğinde ek doz uygulanarak 24 saate kadar uzatılmış, farelerin sırtında 1 cm<sup>2</sup> alandaki tüyler tıraş edilmiştir (Resim 9). Anestezi altındaki farelerden perkutan gruplarının tıraş edilen sırt bölgesindeki deriye 1 mg/kg alfa amanitin distile su içinde çözülmüş olarak perkutan olarak uygulanmıştır. intraperitoneal gruplarına 1 mg/kg alfa amanitin distile su içinde çözülmüş olarak intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Kontrol grubundaki farelere hem

perkutan hem de intraperitoneal olarak çözücü olan distile su uygulanmıştır. Uygulama sonrasında fareler 1., 6. ve 24. saatlerde anestezi altında dekapite edilerek kalpten kanları alınmıştır. Derileri, karaciğer ve böbrekleri alınmış, karaciğer ve böbreklerin yarısı patoloji için %10 formaldehit içine alınmıştır. Diğer kısmı toksin analizi için -20 C de muhafazaya alınmıştır. Alınan kanlar 20 dakika bekletilmiş, sonra 5 dakika 10000 rpm altında santrifüj yapılmıştır. Elde edilen serumdan 30 µL alınarak üzerine 30 µL metanol eklenmiş ve 2 dakika vorteksle karıştırılmıştır. 5 dakika 10000 rpm de santrifüj yapılmıştır. Üstte kalan sıvı bölümden 20 µL alınarak analitik HPLC cihazına enjekte edilmiştir.



Resim 9: Sırt bölgesi tıraş edilmiş fare

### 3.2.3. Serumda ve dokularda alfa amanitin analizi

Alfa amanitin analizi için daha önce tanımlanmış yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır<sup>109</sup>. Bu amaçla öncelikle kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Karaciğer ve böbrek dokuları homojenize edilmiştir. Kontrol grubu farelerden alınan 21 serum, karaciğer ve böbrek örneği üzerine alfa amanitin standardı 0.2-0.5-1-2-5-10 µg eklenmiştir. 3 örnek de boş bırakılmıştır. 2 dakika karıştırılmış, 30 µL materyal üzerine 30 µL metanol eklenmiş ve 2 dakika vorteksle karıştırılmıştır. 5 dakika 10000 rpm'de



santrifüj yapılmıştır. Üstte kalan sıvı bölümden 20 µL alınarak analitik HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Elde edilen sonuçlar X-Y dağılım grafiğine uygulanarak kalibrasyon eğrileri serum, karaciğer ve böbrek için ayrı ayrı oluşturulmuştur. HPLC analizi sonucunda elde edilen pik alanları bu denklemlere uygulanarak alfa amanitin miktarı hesaplanmıştır.

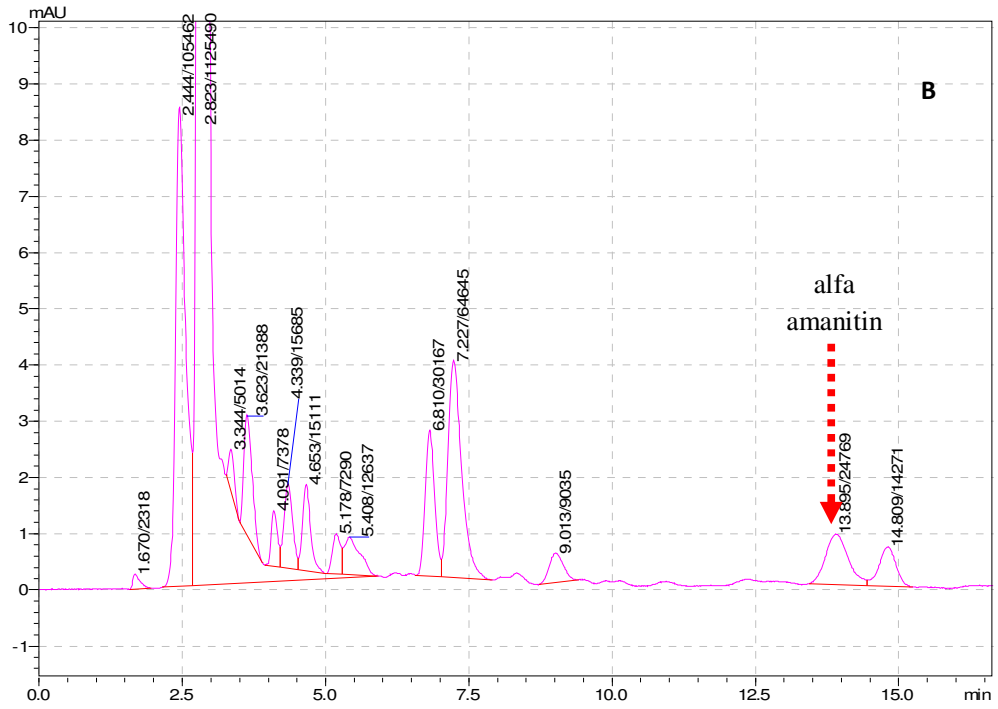
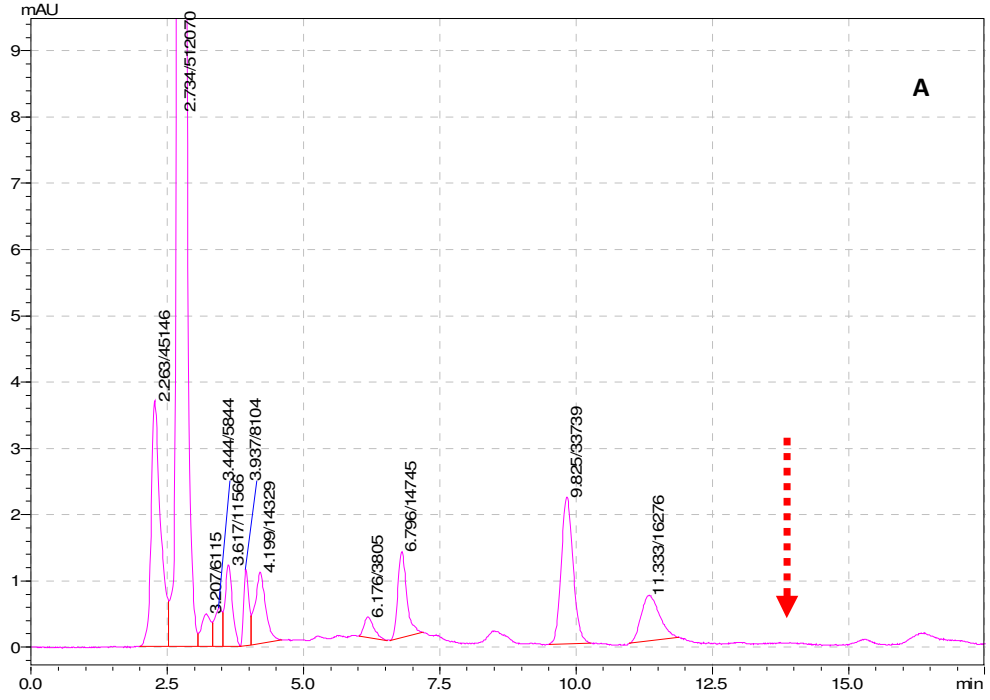
HPLC sisteminde 5 µm partiküllü, 4.6 x 250 mm C18 ODS kolon kullanılmıştır. Mobil faz olarak amonyum asetat (50 mM, pH 5.5 asetik asit), asetonitril, metanol 80+10+10 (v/v/v) kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı izokratik olarak 1 ml/dak olarak ayarlanmıştır. HPLC sistemi olarak yukarıda tanımlanan analitik sistem kullanılmıştır. Sisteme önce boş numuneler enjekte edilmiş, alfa amanitin eklenmiş numunelerdeki alfa amanitin pikinin tutulma zamanında başka pik gelmediği görülmüştür (Şekil 9).

#### **3.2.4. Patolojik inceleme yöntemi**

Materyaller rutin takip işlemlerinden geçtikten sonra parafin bloklarına gömülmüş ve bunlardan 5 mikrometre kalınlıkta kesitler hazırlanmıştır. Kesitler rutin hemotoksilen-eozin yöntemiyle boyanarak preparatlar hazırlanmıştır. Preparatlar ışık mikroskopunda incelenmiştir. Araştırılan ve derecelendirilen parametreler; hepatotoksik nekroz, kolestazis, yağlı dejenerasyon, inflamatuvar infiltrasyon ve granüler dejenerasyonun varlığıdır<sup>110</sup>.

#### **3.2.5. İstatistiksel analiz**

Toksin düzeyleri her organ ve serumda kendi arasında ve her saat gruplarının kendi arasında Kruskall Wallis varyans analizi yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Patolojik bulguların varlığı, her organ için ayrı ayrı olarak ve her saat gruplarının kendi arasında ki-kare testi ile karşılaştırılmıştır. Tüm toksin ölçüm verileri ortalama ( $\pm$  SH) olarak verilmiş, patolojik incelemede hücrel hasar parametrelerinin varlığı veya yokluğu değerlendirilmiş, p değeri <0.05 olan veriler anlamlı olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 9: Alfa amanitinin HPLC’de analizinden elde edilen kromatogramlar (A: boş serum, B: serum üstüne sonradan eklenmiş alfa amanitin)

## 4. BULGULAR

### 4.1. Alfa Amanitin Analiz Sonuçları

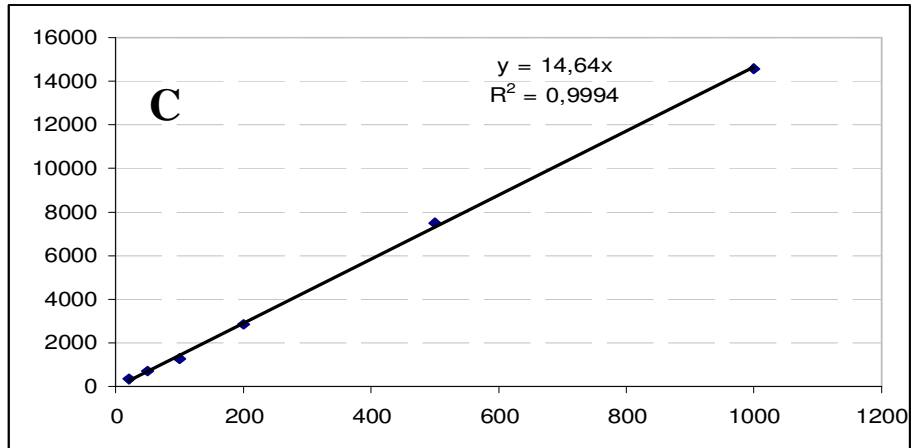
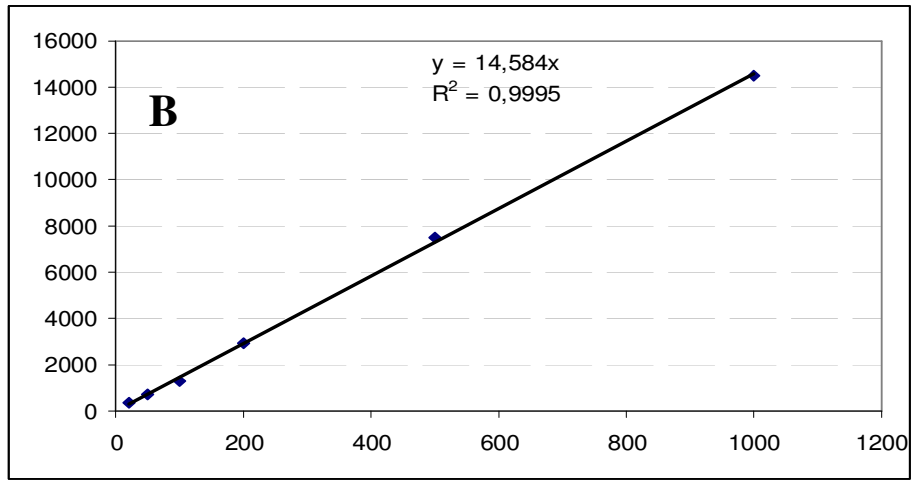
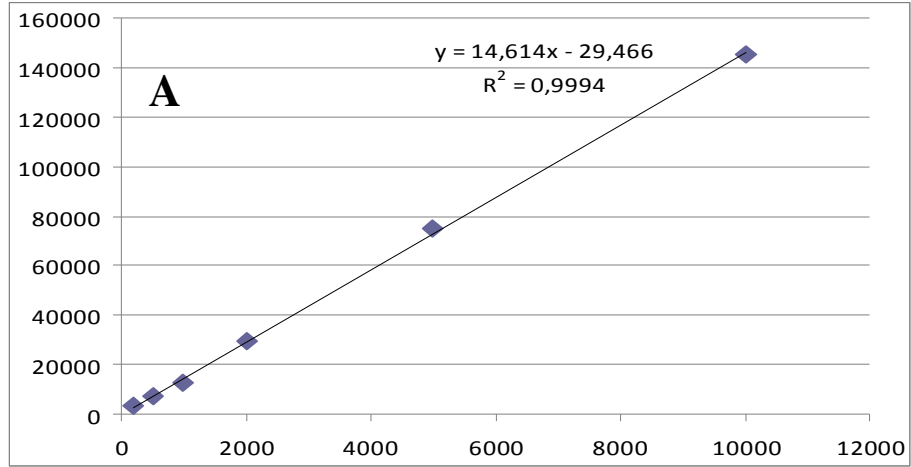
#### 4.1.1. Kalibrasyon kromatogramları pik alanları

Analizler sonucunda serum içine eklenen alfa amanitin için elde edilen kalibrasyon konsantrasyonları ve pik alanları Tablo 3'te gösterilmiştir. alfa amanitinin boş serum ve serum üstüne sonradan eklenmiş alfa amanitin kromatogramları Şekil 9'da gösterilmiştir. Alfa amanitinin pik çıkış süresi 13.89 dakika olarak tespit edilmiştir.

#### 4.1.2. Kalibrasyon eğrileri

Serum, karaciğer dokusu ve böbrek dokusuna alfa amanitin eklenmesi ile elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 10'da gösterilmiştir. Serumda alfa amanitin için kalibrasyon eğrisi denklemi  $y = 14.614x - 29.466$  olarak bulunmuştur ve denklemin  $R^2$  değeri 0.9994 olarak bulunmuştur. Karaciğer dokusunda alfa amanitin için kalibrasyon eğrisi denklemi  $y = 14.584x$  olarak bulunmuştur ve denklemin  $R^2$  değeri 0.9995 olarak bulunmuştur. Böbrek dokusunda alfa amanitin için kalibrasyon eğrisi denklemi  $y=14.64x$  olarak bulunmuştur ve denklemin  $R^2$  değeri 0.9994 olarak bulunmuştur.

Tüm analizlerde alfa amanitin analizi için sinyal/gürültü oranı 3 olarak alındığında tayin limiti (limit of detection, LOD) 5 ng/ml, sinyal/gürültü oranı 10 olarak alındığında ölçüm limiti (limit of quantification, LOQ) 17 ng/ml olarak bulunmuştur.



Şekil 10: Serumda (A), karaciğer dokusunda (B) ve böbrek dokusunda (C) alfa amanitin analizi kalibrasyon grafiği

Tablo 3: Alfa amanitinin serumdaki ters faz HPLC yöntemi ile analizlerini takiben elde edilen kromatogram pik alanları

	Eklenen alfa amanitin konsantrasyonu (ng/ml)	Elde edilen pik alanı
Serum	200	3415 ± 11
	500	7145 ± 4
	1000	12681 ± 9
	2000	29628 ± 11
	5000	75014 ± 180
	10000	145231 ± 26
Karaciğer	20	338 ± 0.9
	50	721 ± 0.3
	100	1275 ± 0.8
	200	2951 ± 1.2
	500	7489 ± 16
	1000	14497 ± 19
Böbrek	20	347 ± 0.9
	50	710 ± 0.5
	100	1254 ± 1.5
	200	2881 ± 2.9
	500	7524 ± 14
	1000	14568 ± 28

#### 4.1.2. Serumda alfa amanitin ölçümü sonuçları

Serumda ve dokularda ölçülen alfa amanitin düzeyleri Tablo 4'te verilmiştir. Kontrol 1 saat, kontrol 6 saat ve kontrol 24 saat gruplarından alınan serumlardan hiçbirinde alfa amanitin tespit edilememiştir. Perkutan 1 saat, perkutan 6 saat ve perkutan 24 saat

gruplarından alınan serumlardan hiçbirinde alfa amanitin tespit edilememiştir. İp 1 saat grubundan alınan serumlarda 1216 ( $\pm 35$ ) ng/ml, ip 6 saat grubundan alınan serumlarda 728 ( $\pm 19$ ) ng/ml, ip 24 saat grubundan alınan serumlarda 216 ( $\pm 14$ ) ng/ml tespit edilmiştir. Kontrol grupları ile perkutan gruplarındaki alfa amanitin düzeyleri arasında fark yoktur ( $p < 0,001$ ). İp grupları ile kontrol ve perkutan grupları arasında her saat grubu kendi arasında karşılaştırıldığında tamamında anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0,001$ ).

#### **4.1.3. Karaciğerde alfa amanitin ölçümü sonuçları**

Kontrol 1 saat, kontrol 6 saat ve kontrol 24 saat gruplarından alınan karaciğer dokularının hiçbirinde alfa amanitin tespit edilememiştir. Perkutan 1 saat, perkutan 6 saat ve perkutan 24 saat gruplarından alınan karaciğer dokularının hiçbirinde alfa amanitin tespit edilememiştir. İp 1 saat grubundan alınan karaciğer dokularında 1057 ( $\pm 57$ ) ng/ml, ip 6 saat grubundan alınan karaciğer dokularında 3294 ( $\pm 42$ ) ng/ml, ip 24 saat grubundan alınan karaciğer dokularında 2895 ( $\pm 71$ ) ng/ml tespit edilmiştir. Kontrol grupları ile perkutan gruplarındaki karaciğer dokularının alfa amanitin düzeyleri arasında fark yoktur ( $p < 0,001$ ). İp grupları ile kontrol ve perkutan grupları arasında her saat grubu kendi arasında karşılaştırıldığında tamamında anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0,001$ ).

#### **4.1.4. Böbrekte alfa amanitin ölçümü sonuçları**

Kontrol 1 saat, kontrol 6 saat ve kontrol 24 saat gruplarından alınan böbrek dokularının hiçbirinde alfa amanitin tespit edilememiştir. Perkutan 1 saat, perkutan 6 saat ve perkutan 24 saat gruplarından alınan böbrek dokularının hiçbirinde alfa amanitin tespit edilememiştir. İp 1 saat grubundan alınan böbrek dokularında 0 ng/ml, ip 6 saat grubundan alınan böbrek dokularında 156 ( $\pm 10$ ) ng/ml, ip 24 saat grubundan alınan böbrek dokularında 85 ( $\pm 9$ ) ng/ml tespit edilmiştir. Kontrol grupları ile perkutan gruplarındaki böbrek dokularının alfa amanitin düzeyleri arasında fark yoktur ( $p < 0,001$ ). İp grupları ile kontrol ve perkutan grupları arasında her saat grubu kendi arasında karşılaştırıldığında 1 saat grupları arasında fark yoktur, 6 saat ve 24 saat grupları arasında anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0,001$ ).

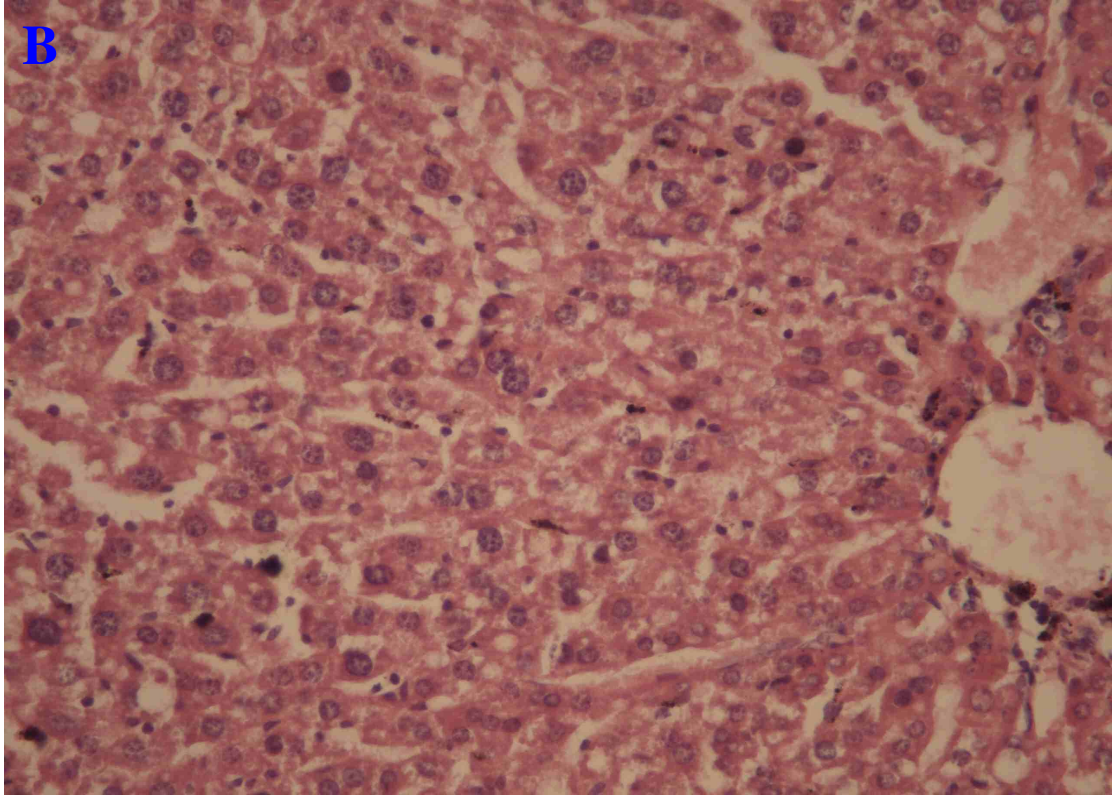
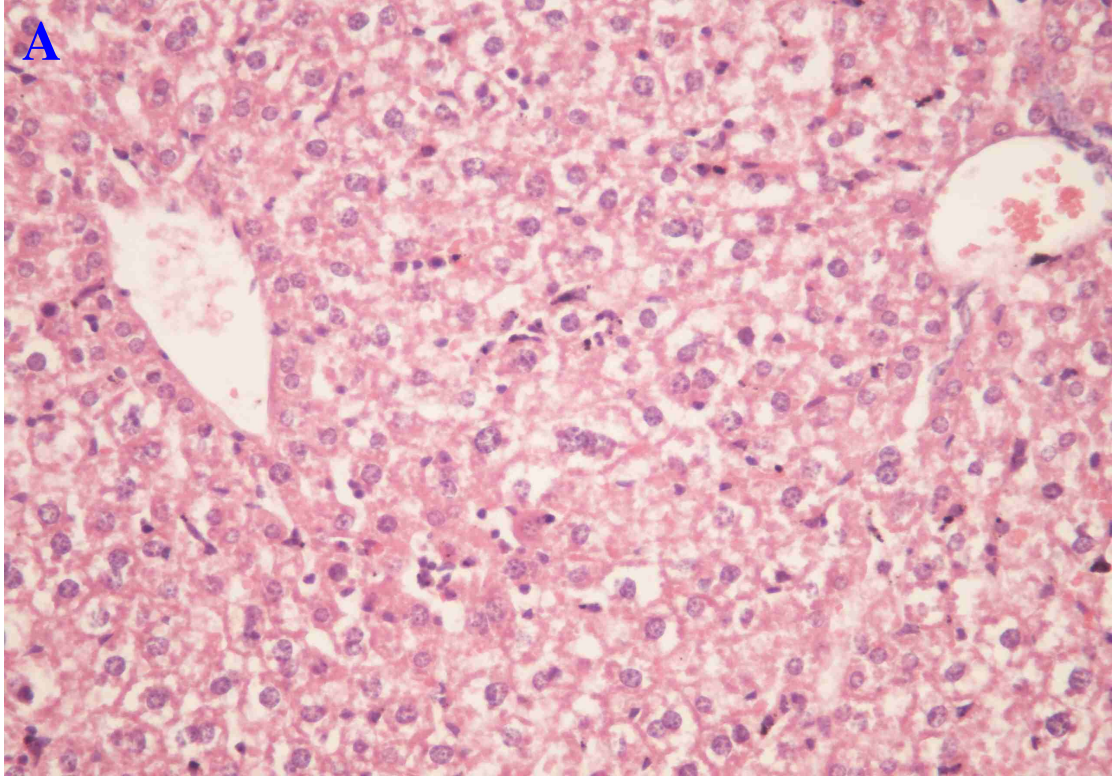
Tablo 4: Serum ve dokularda ölçülen alfa amanitin seviyeleri

	Serum (ng/ml)	Karaciğer (ng/ml)	Böbrek (ng/ml)
Kontrol-1 saat	0	0	0
Kontrol-6 saat	0	0	0
Kontrol-24 saat	0	0	0
İp-1 saat	1216 ( $\pm$ 35)	1057 ( $\pm$ 57)	0
İp-6 saat	728 ( $\pm$ 19)	3294 ( $\pm$ 42)	156 ( $\pm$ 10)
İp-24 saat	216 ( $\pm$ 14)	2895 ( $\pm$ 71)	85 ( $\pm$ 9)
Perkutan 1 saat	0	0	0
Perkutan 6 saat	0	0	0
Perkutan 24 saat	0	0	0

## 4.2. Patolojik İnceleme Sonuçları

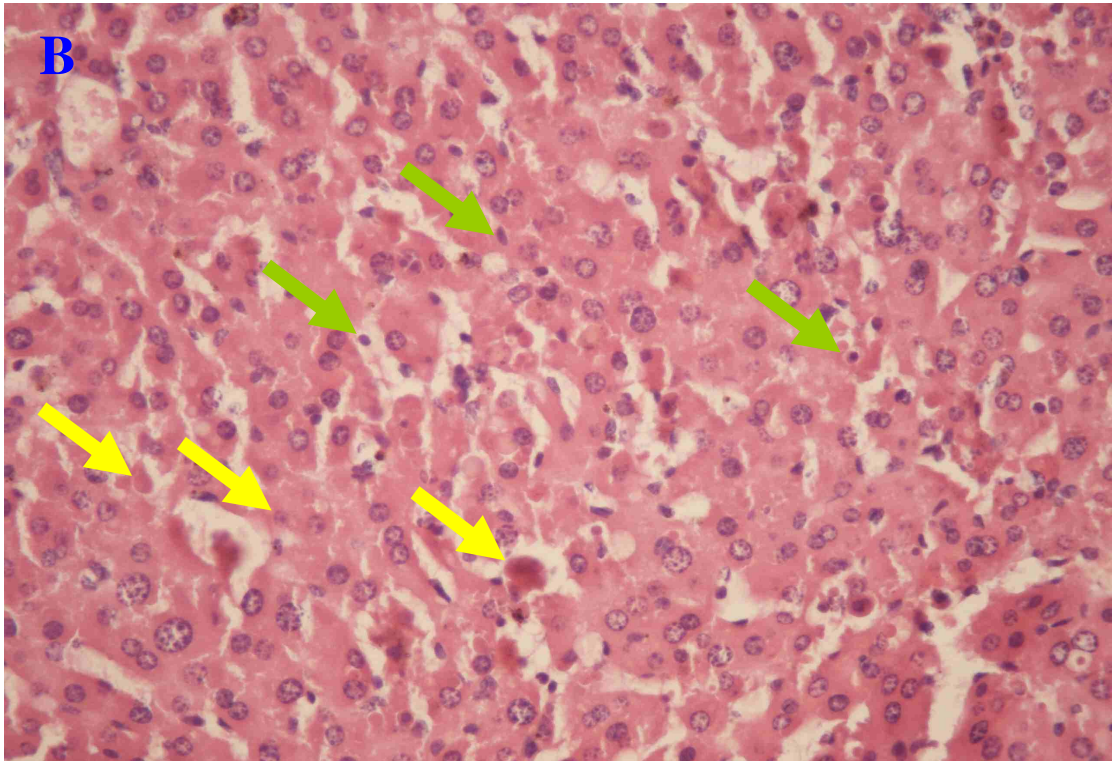
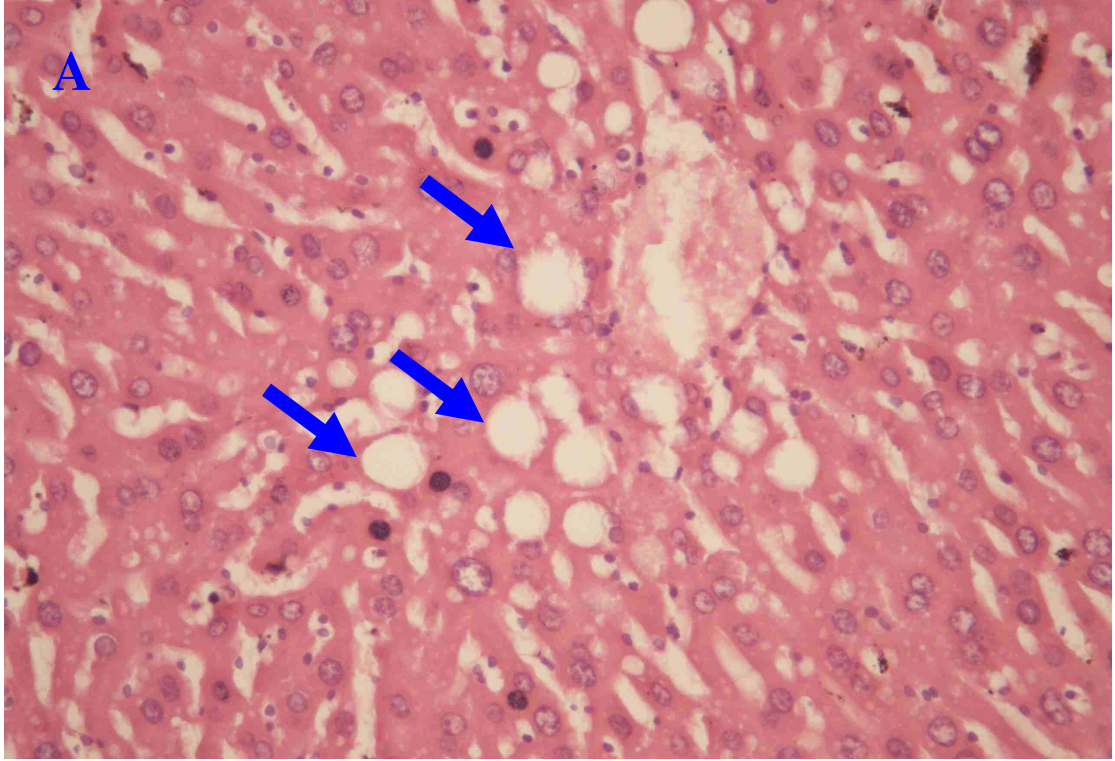
### 4.2.1. Karaciğer patolojik inceleme sonuçları

Kontrol 1 saat, kontrol 6 saat ve kontrol 24 saat gruplarından alınan karaciğer dokularının hiçbirinde hücrel şişme, apoptotik Councilman cisimcikleri, piknotik hücreler görülmemiştir (Resim 10). Perkutan 1 saat, perkutan 6 saat ve perkutan 24 saat gruplarından alınan karaciğer dokularının hiçbirinde hücrel şişme, apoptotik Councilman cisimcikleri, piknotik hücreler görülmemiştir. İp 1 saat ve ip 6 saat grubundan alınan karaciğer dokularının tamamında hücrel şişme görülmüştür. İp 24 saat grubundan alınan karaciğer dokularının tamamında apoptotik Councilman cisimcikleri ve piknotik hücreler görülmüştür (Resim 11). Perkutan grupları ile kontrol grupları arasında hücrel hasar açısından fark bulunmamıştır ( $p < 0,001$ ). İp grupları ile kontrol ve perkutan grupları her saat grupları kendi arasında karşılaştırıldığında hücrel hasar açısından anlamlı fark bulunmuştur ( $p < 0,001$ ).



Resim 10: Kontrol 1 saat (A) ve perkutan 1 saat (B) grubundan alınan karaciğer dokusunun histolojik görünümü (HE, 40x)

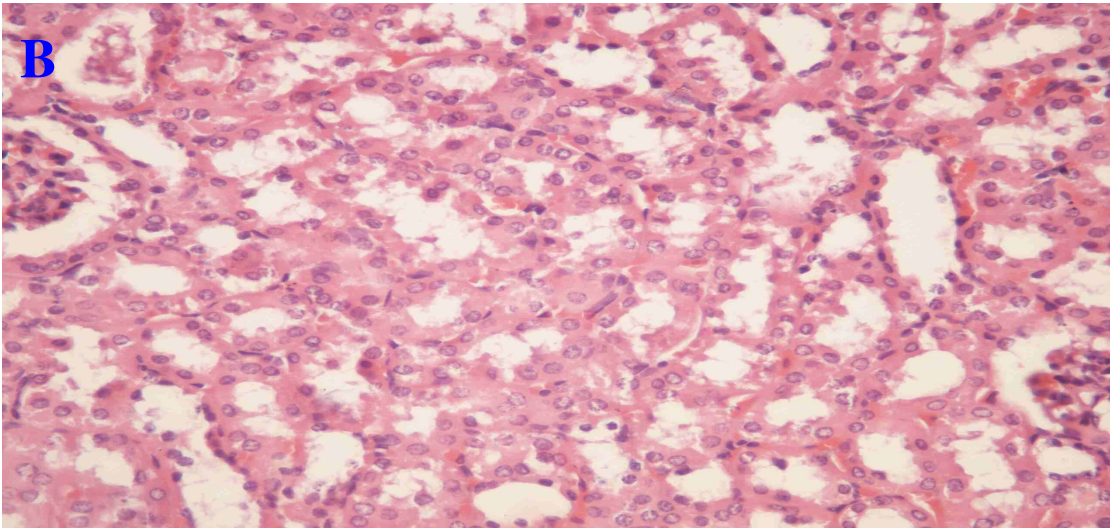
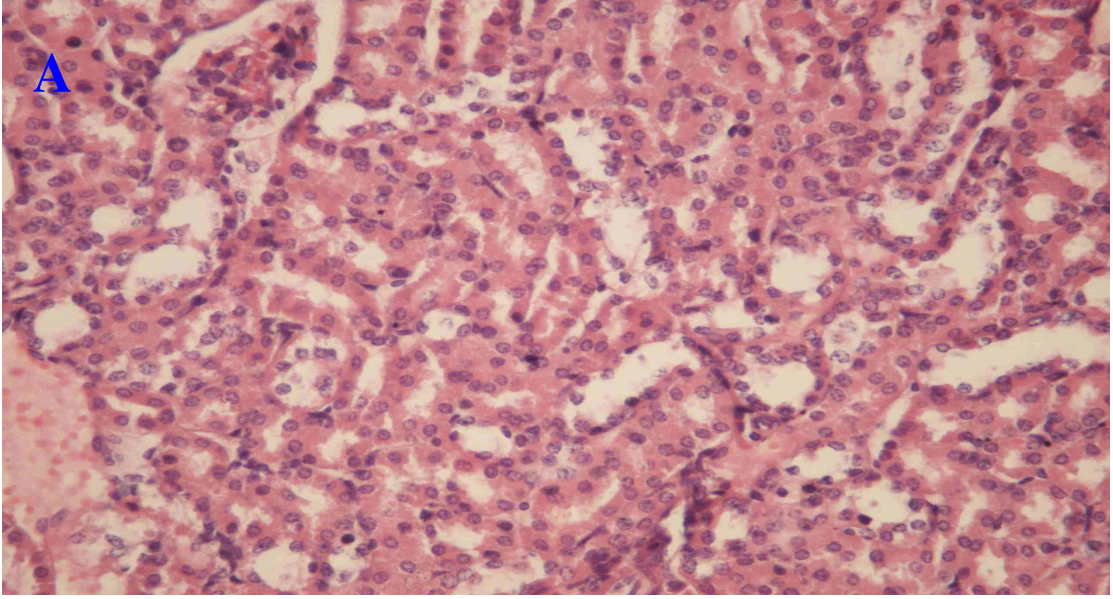




Resim 11: ip 6 saat (A) ve ip 24 saat (B) grubundan alınan karaciğer dokusunun histolojik görünümü (HE, 40x) (mavi oklar vakuoler dejenerasyonu, yeşil oklar piknotik hücreleri, sarı oklar Councilman cisimciklerini göstermektedir.)

#### 4.2.2. Böbrek patolojik inceleme sonuçları

Kontrol 1 saat, kontrol 6 saat ve kontrol 24 saat gruplarından alınan böbrek dokularının hiçbirinde hücresel şişme, apoptotik Councilman cisimcikleri, piknotik hücreler görülmemiştir. Perkutan 1 saat, perkutan 6 saat ve perkutan 24 saat gruplarından alınan böbrek dokularının hiçbirinde hücresel şişme, apoptotik Councilman cisimcikleri, piknotik hücreler görülmemiştir. İp 1 saat, ip 6 saat ve ip 24 saat grubundan alınan böbrek dokularının hiçbirinde hücresel şişme, apoptotik Councilman cisimcikleri, piknotik hücreler görülmemiştir. Böbrek dokusunda hücresel hasar açısından hiçbir grup arasında farklılık bulunmamıştır.

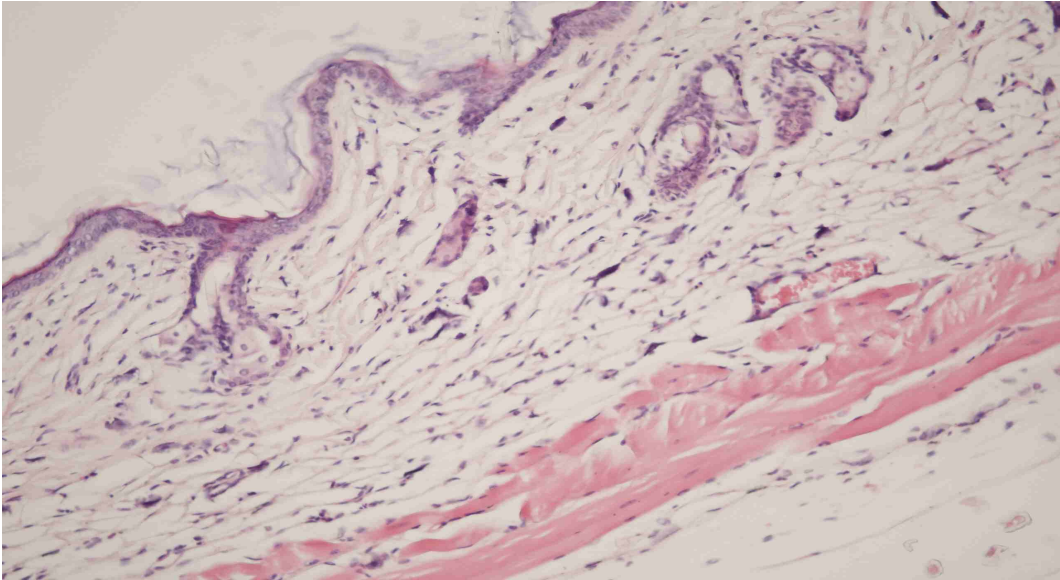
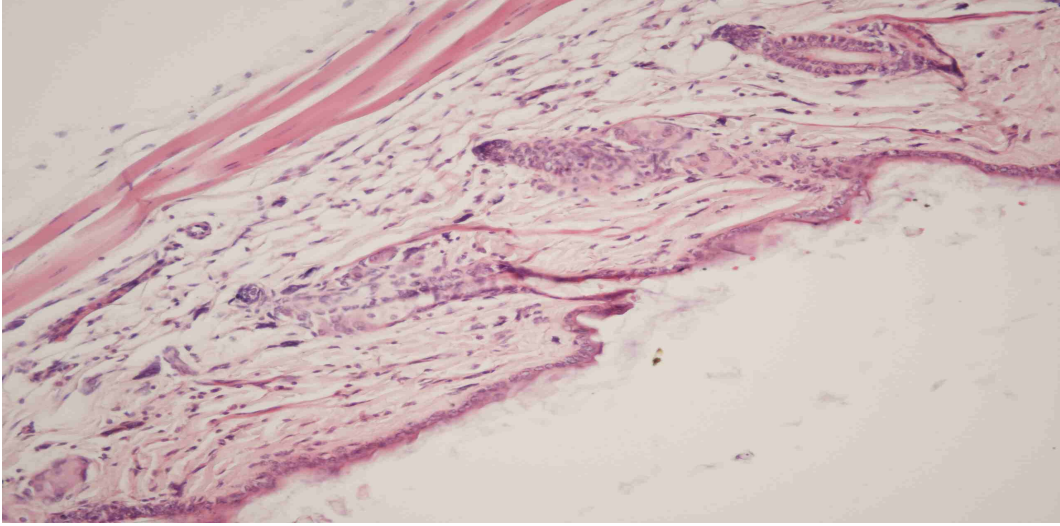


Resim 12: Kontrol 6 saat (A) ve ip 6 saat (B) grubundan alınan böbrek dokusunun histolojik görünümü



#### 4.2.3. Deri patolojik inceleme sonuçları

Kontrol 1 saat, kontrol 6 saat ve kontrol 24 saat gruplarından alınan deri dokularının epidermis, dermis, kıl folikülü ve deri altı dokularının hiçbirinde hücresel hasar belirtisi görülmemiştir. Perkutan 1 saat, perkutan 6 saat ve perkutan 24 saat gruplarından alınan deri dokularının epidermis, dermis, kıl folikülü ve deri altı dokularının hiçbirinde hücresel hasar belirtisi görülmemiştir (Resim 13). İp gruplarında deri patolojisi incelenmediğinden değerlendirmeye alınmamıştır. Kontrol grupları ile perkutan gruplarının deri hücrelerindeki hücresel hasar açısından anlamlı fark bulunmamıştır ( $p<0,001$ ).



Resim 13: Kontrol 24 saat (A) ve perkutan 24 saat (B) gruplarından alınan deri örneklerinin histolojik görünümü

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Fareler üzerinde yaptığımız bu çalışmamızda; alfa amanitinin sağlam bir deri yüzeyinden vücuda geçip geçmediği, alfa amanitin deri yoluyla vücuda geçmişse kan, karaciğer ve böbrekler üzerindeki olası sitotoksik etkileri ve yine karaciğer, böbrek ve kandaki olası alfa amanitin varlığı ve miktarı, alfa amanitin deri yoluyla vücuda geçmese dahi toksinin deri üzerinde herhangi bir sitotoksik etki bırakıp bırakmadığı, konularında net bilimsel veriler elde etmek amaçlanmıştır.

Gerek alfa amanitin gerekse de diğer amatoksinler gastrointestinal sistemden çok hızlı emilmektedirler. Amatoksinler radyoimmünolojik olarak tespit edilebilmektedirler. İdrarda amatoksinlerin radyoimmünolojik olarak tespit edilebileceği en erken zaman dilimi yaklaşık olarak 90-120 dakikadır. Bu tespit süresi sindirim sonrasında elde edilen süredir<sup>11</sup>.

Hayvanlarda, özellikle de deney hayvanları açısından düşünürsek; amatoksinlerin gastrointestinal sistem tarafından emilmesi birçok yönden farklılıklar göstermektedir. Farelerde ve sıçanlarda gastrointestinal olarak amatoksinlerin emilimi şaşırtıcı derecede azdır. Amatoksinler kedi, köpek ve kobaylarda kilogram başına düşük miligram dozlarında bile ölüme neden olmuştur. Alfa amanitinin köpekler için LD<sub>50</sub> değeri, intravenöz uygulamalarda 0.1 mg/kg civarındadır. Sıçanlarda ise bu değer 0.3 mg/kg kadardır<sup>12</sup>.

Amatoksinlerin kinetiği intravenöz olarak köpeklerde ve intraperitoneal olarak da farelerde çalışılmıştır. Amatoksinlerin farmakokinetiklerine dair yapılan çalışmalarda kanda ana taşıyıcı moleküllerden biri olan albümin ile bağlanmadığı gözlenmiştir. Amatoksinlerin insan vücudundaki dağılımı ile ilgili herhangi bir veriye ulaşılamamıştır. Ancak hayvanlarla yapılan toksikokinetik çalışmalar sonucunda anlamlı sonuçlar alınmıştır. Bir köpeğe intravenöz yolla uygulanan alfa amanitinin uygulama sonrasında dağılım hacmi hücre dışı alanda 160-290 ml/kg olarak tespit edilmiştir<sup>3</sup>.

Oral yolla alınan alfa amanitinin yarılanma ömrüne dair insanlarda yapılan çalışmalardan birinde 32 hastanın bulunduğu bir grup oluşturulmuştur. Çok sayıda hastanın serum örneklerindeki alfa amanitin değerleri çok hızlı bir şekilde azalmıştır.

Yaklaşık 36 saat sonra yapılan incelemelerde sadece iki hastanın serumunda amatoksinlere rastlanabilmiştir<sup>86</sup>.

Deney hayvanlarında yapılan biyolojik yarılanma ömrüne dair bir çalışmada tıpkı insandaki gibi amatoksinlerin çok hızlı bir şekilde serum tarafından elimine edildikleri anlaşılmıştır. Alfa amanitinin farelerdeki intraperitoneal uygulamalarında uygulamadan 4 saat sonra yapılan incelemede amatoksinlerden hiçbirisi bulunamamıştır. Köpeklerde intravenöz alfa amanitin uygulaması sonrasında yapılan incelemede toksinin plazmadaki yarılanma ömrü yaklaşık olarak yarım saat olarak gözlemlenmiştir. Yine bu çalışmada intravenöz uygulama sonrası total vücut klirensi dakikada kilogram başına 2.7-6.2 ml olarak hesaplanmıştır<sup>3</sup>.

Radyoimmünolojik saptama yerine çalışmamızın yöntem ve bulgular kısmında da tanımlanan farklı derecelerde saflaştırma ve ayırım yapabilen, farklı özellikteki tarayıcıların sisteme entegre edilebildiği HPLC tekniklerinin kullanıldığı daha yeni bir çalışmada alfa amanitin farmakokinetiğine dair daha farklı veriler elde edilmiştir. HPLC tekniğinin kullanıldığı bu çalışmada zehirlenme geçiren hastalardan önceki çalışmalara göre daha geç alınan örneklerde dahi alfa ve beta amanitin gibi amatoksinlere rastlanmıştır. Amanita phalloides zehirlenmesi geçiren çok sayıda hasta incelenmiştir. Hastalardan alınan kan ve idrar gibi örneklerde yapılan incelemelerde 24 saatten daha uzun sürelerde bile alfa amanitine rastlanmıştır. Karaciğer ve böbrek dokularından günler sonrasında alınan örneklerde dahi alfa amanitin gözlemlenmiştir<sup>86</sup>.

Yukarıda bahsedilen çalışmalardan ve şu ana kadar benzer özellikteki pek çok gözlemden, araştırma ve kayıtlardan anlaşılmaktadır ki alfa amanitin toksik etkileri, zehiri içeren mantar türlerinin yenilmesiyle diğer bir deyişle gastrointestinal sistem aracılığıyla mantar toksinlerinin vücuda geçmesiyle görülmektedir.

Deneyel olarak toksik etkilerin gözlemlenmesi şu ana kadarki çalışmalardan anladığımız kadarıyla ya alfa amanitin intravenöz yolla kedi, köpek veya kobay gibi deney hayvanlarına verilmesiyle ya da intraperitoneal olarak fare gibi daha küçük deney hayvanlarına uygulanmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Yapılan literatür araştırmalarında saflık derecesi oldukça yüksek olan alfa amanitin kullanıldığı pek çok araştırmada bulunmuştur. Fakat bunca çalışmaya rağmen kaza eseri dahi olsa deri yoluyla gerçekleşen herhangi bir zehirlenme olgusuna rastlanmamıştır.

Türkiye'deki zehirlenme vakalarında dahi deri yoluyla zehirlenmeye dair herhangi bir bulgu gözlemlenmemiştir. Çalışmamızda bahsi geçen ve Türkiye'deki zehirlenmeleri konu alan araştırmada da zehirlenme olgularının hepsinin gastrointestinal sistem yoluyla yani alfa amanitin ve diğer amatoksinleri içeren mantarların yenilmesiyle gerçekleştiği görülmektedir.

Zehirlenme vakalarına dair, zehirlenen bazı hastaların yakınlarıyla yaptığımız görüşmelerden anlıyoruz ki aslında zehirli mantarlar toplanırken ve daha önemlisi yemek olarak hazırlanma süresince; yıkanırken, doğranırken ve pişirilirken birçok kişi amatoksinlerle temas edebiliyor. Bilimsel çalışmalara hazırlık esnasında alfa amanitin içeren mantarları doğal habitatından toplayan, pek çok işlemde geçirerek işleyen, alfa amanitin saflaştırması yapan ticari veya bilimsel kurumlarda dahi deri yoluyla zehirlenmeye ait bir veri şu ana kadar ortaya çıkmamıştır.

Yapılan literatür aramalarında deri yoluyla alfa amanitin absorpsiyonunun incelendiği bir çalışma veya deri yoluyla alfa amanitin vücuda girerek zehirlenmelere yol açtığı herhangi bir vaka bulunamamıştır. Şu ana kadar bilinen bütün alfa amanitin zehirlenmeleri alfa amanitin içeren mantar türlerinin özellikle de *Amanita phalloides* türü mantarların yenilmesiyle intestinal yoldan olmuştur<sup>107</sup>.

Daha önce örneklerinin verildiği çalışmalarda olduğu gibi çalışmamızda da intraperitoneal uygulama grupları oluşturulmuştur. İntraperitoneal fare gruplarındaki 1, 6 ve 24 saatlik kan, karaciğer ve böbrek dokularında yapılan incelemelerde kanda alfa amanitin tespiti yapılmış karaciğerlerde nekrotik değişiklik net olarak ortaya konmuştur. En uzun süreli grubumuz 24 saatlik olduğundan böbreklerde net bir sitotoksik değişim gözlemlenmemiştir. Karaciğer ve kan örneklerindeki net bulgulara rağmen böbreklerdeki durum farklı olmasında alfa amanitin önce kanda, ve karaciğerde en son ve uzun süreli olarak da böbreklerde bulunmasının etkili olduğu düşünülmektedir<sup>86</sup>.

Kontrol grubundaki farelerde ve sadece tıraşlanmış deri üzerine alfa amanitin uygulanmış farelerde; 1, 6 ve 24 saatlik incelemelerde deri, karaciğer ve böbrek örneklerinin hiçbirisinde sitotoksik bir etki gözlemlenmemiştir. Kontrol grubu ve deri uygulaması yapılan fare gruplarından alınan kan örneklerinde de HPLC tekniğiyle yapılan incelemelerde alfa amanitin bulunamamıştır.

Daha önce deri yoluyla alfa amanitinin absorbe olduğuna dair insanlar üzerinde herhangi bir çalışma veya deri yoluyla insanların zehirlenmesine dair bir vaka bulunmaması ayrıca deney hayvanları üzerinde alfa amanitinin absorpsiyonunu konu alan bir araştırmanın veya herhangi bir verinin olmaması çalışmamızı başka çalışmalar üzerinden değerlendirmemizi engellemiştir. Ayrıca doğrudan alfa amanitinin deri yoluyla emilimine dair veriler bulunmadığı için farmakokinetik çalışmalarında olduğu gibi farklı zamanlarda yapılan çalışmalardaki verileri kıyaslama ve bu verilerden direkt faydalanma şansımız da olmamıştır. Alfa amanitinin deri yoluyla absorpsiyonuna dair bütün veriler bu çalışmada kazanılmıştır.

Çalışmamız bu yönleriyle zorlayıcı olsa da konusu itibariyle şu ana kadarki ilk ve tek çalışma olması, sonuçlarının oldukça net ve anlaşılır olması nedeniyle de sevindiricidir.

*Amanita* cinsine ait mantar örneklerinden hazırlanarak elde edilen alfa amanitin ve diğer amatoksinlerin insan ve hayvan sağlığını tehdit eden patolojik mantarlara karşı etkili olabileceği, özellikle de deri üzerinde patolojilere neden olan fungal ajanlara karşı fayda sağlayabileceği antifungal duyarlılıkla ilgili yapılan araştırmalardan anlaşılabilir. Deri üzerinde çeşitli patolojilere yol açabilen, genellikle fırsatçı enfeksiyonlar yapan, immün sistemi bir şekilde baskılanmış olan kişilerde ise tüm vücudu etkileyebilecek derecede tehlikeli enfeksiyonlara neden olabilen *Blastomyces albicans* mantarına karşı alfa amanitin, beta amanitin ve falloidin toksinleri denenmiştir<sup>100</sup>.

Yine mantar örneklerinin denendiği bir çalışmada mantar toksinlerinin antibakteriyel etkileri araştırılmış ve amatoksin içeren bir *Amanita* cinsi mantardan elde edilen materyalin *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği saptanmıştır. Ancak alfa amanitinin yüksek toksisitesi, henüz çok net olarak ortaya konulamayan farmakokinetiği ve dağılımı ile ilgili yapılan çalışmaların genelde az sayıdaki hayvan deneylerinden oluşması, dolayısıyla dağılım süreci ile ilgili yeterli verilerin olmaması<sup>86</sup>, sistemik enfeksiyon yapan *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* gibi bakteriyel ayrıca viral ve fungal ajanlara karşı kullanımının şu an için imkansız görünmesine neden olmaktadır.

Alfa amanitinin *Blastomyces albicans* gibi deri üzerinde çeşitli enfeksiyonlar yapabilen ökaryotik bir patojene etkili olması ve antibakteriyel etkinliğinin de fark edilmesi ileride yapılacak daha kapsamlı çalışmalara önemli bir temel niteliğindedir.

Alfa amanitinin hâlihazırda etkili olduğu deri patojeni olan *Blastomyces albicans* ve yakın gelecekte üzerlerindeki olası antimikrobiyal etkisinin fark edilebileceği başka deri patojenleri de düşünüldüğünde; bu güçlü toksinin insan ve hayvanlarda ilaç olarak kullanılmasının önündeki en büyük engellerden birisi muhtemelen deri üzerine uygulandığında ne olacağının bilinmemesidir.

Bu noktada sonuç olarak, yapılan araştırmamıza bakıldığında;

- a) farelerin derileri üzerine uygulanan alfa amanitinin, deri üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin gözlemlenmemesi,
- b) deri uygulaması yapılan hayvanların kan, karaciğer ve böbrek örneklerinde alfa amanitine rastlanmaması
- c) ayrıca intraperitoneal uygulamalardaki fare karaciğer hücrelerinin nekrotik değişime uğramasına rağmen deri uygulaması yapılan farelerin karaciğerlerinde herhangi bir sitotoksik etkinin gözlemlenmemesi,

gibi bulgulara dayanarak deneylerimizde elde edilen verilerin alfa amanitinin yüzeysel enfeksiyonlara karşı bir ilaç veya bir ilaç kombinasyonunun bileşeni olarak kullanılmasını konu alacak olası çalışmalara katkı sağlayacağı umulmaktadır.



## 5. KAYNAKLAR

1. Kayaalp OS. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara, 2000.
2. Mat A. Türkiye’de mantar zehirlenmeleri ve zehirli mantarlar. İstanbul: Nobel Yayınları, 2000: p.151-158.
3. Faulstich H, Talas A, Wellhöner HH. Toxicokinetics of labeled amatoxins in the dog. Arch Toxicol 1985; 56:190-194.
4. Vetter J. Toxins of *Amanita phalloides*. Toxicon. 1998;36:13-24.
5. Erjavec J, Kos J, Ravnikar M, Dreo T. Proteins of higher fungi-from forest to application. Sabotič J. Trends Biotechnol 2012; 30:259-73
6. Wang Y, Bao H, Xu L, Bau T. Determination of main peptide toxins from *Amanita pallidrosea* with HPLC and their antifungal action on *Blastomyces albicans*. Wei sheng wu xue bao 2011; 51:1205-1211.
7. North PM. Poisonous plants and fungi in color. London: Blandford Press, 1967
8. Vaillant, Sébastien. Botanicon Parisiense. Leide & Amsterdam: J. H. Verbeek and B. Lakeman 1727.
9. Neville P, Poumarat S. *Amanita*, *limacella* and *torrendia*. Fungi Europaei 2004;9
10. Tulloss, R. E., Halling and G. M. Mueller. Studies in *Amanita* (Amanitaceae) of Central America. I. Three new species from Costa Rica and Honduras. Mycotaxon 2011; 117: 165-205.
11. Curtis Gates Lloyd. Mycological Notes 1898.
12. Bresinsky A, Besl H. A colour atlas of poisonous fungi. London: Wolfe Publishing, 1990: p. 26–40.
13. Jordan M. The encyclopedia of fungi of Britain and Europe. London: David & Charles Publications, 1995: p99-108
14. Bresinsky A, Besl H. A colour atlas of poisonous fungi. London: Wolfe Publishing, 1990: p. 26–29. 508 Jordan & Wheeler. p108
15. Linus Zeitlmayr. F. Muller, 1968: p61

16. Evenson VS. Mushrooms of colorado and the southern rocky mountains. Wisconsin: Big Earth Publishing, 2008: p. 19.
17. Jordan M. The encyclopedia of fungi of britain and europe. London: David & Charles Publications, 1995: p. 198.
18. Lange, Lene. "The distribution of macromycetes in Europe". Dansk Botanisk Arkiv 1974;30: 5–105.
19. Bertault, R. Amanites du Maroc (troisième contribution). Bull. Trimestriel Soc. Myc. France 1980;96(3): 271-287.
20. Asef, M.R. Poisonous mushrooms of Iran. Iran-shenasi publishing. 2009.
21. Tulloss, R. E., Halling and G. M. Mueller. Studies in Amanita (Amanitaceae) of Central America. I. Three new species from Costa Rica and Honduras. Mycotaxon 2011; 117: 100-205.
22. Litten W. The most poisonous mushrooms. Scientific American. 1975; 232: 1143-1152.
23. Litten W. The most poisonous mushrooms. Scientific American. 1975; 232: 1155-1152.
24. Pringle, Anne; Adams, Rachel I.; Cross, Hugh B.; Burns, Thomas D. "The ectomycorrhizal fungus *Amanita phalloides* was introduced and is expanding its range on the west coast of North America". Molecular Ecology 2009: 18 (5): 817–833.
25. Reid, D.A. "A monograph of the Australian species of Amanita Pers. ex Hook (Fungi)". Australian Journal of Botany Supplementary. 1980; 8: 1–96.
26. Hall B. Death cap tragedy: bistro still closed. Canberra Times, 7 January 2012
27. Herter, W.G. "La aparición del hongo venenoso *Amanita phalloides* en Sudamérica". Revista Sudamericana de Botánica 1934; 1: 111–119.
28. Valenzuela E, Moreno G and Jeria M. *Amanita phalloides* in forests of Pinus radiata the IX Region in Chile: taxonomy, toxins, detection methods and phalloidin intoxication. Boletín Micológico. 1992;7:17-21.
29. Pegler, D.N. A preliminary agaric flora of East Africa. Kew Bulletin Additional Series (6). London: Royal Botanic Gardens, 1977

30. Reid, DA. "A monograph of the Australian species of *Amanita* Pers. ex Hook (Fungi)". Australian Journal of Botany Supplementary. 1980; 8: 20–150.
31. Dr. ÇETİN H, Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Dahiliye Ve Pediatri Kliniklerinde 2005 Ve 2006 Yıllarında Mantar İntoksikasyonu Ön Tanısıyla Yatırılan Hastaların Retrospektif Değerlendirilmesi. 2007, T.C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği Koordinatörlüğü, Uzmanlık Tezi, İstanbul, Koordinator: Uz. Dr. Refik Demirtunç
32. Ertuğrul Kaya, Selim Karahan, Mustafa Hancı, Kürşat Oğuz Yaykaşlı, Ayhan Sarıtaş, Recep Bayram, İsmail Yılmaz, Seyfullah Oktay Arslan. Düzce Yöresinde Yetişen *Amanita phalloides* Mantarındaki Alfa Amanitin Düzeyinin HPLC Yöntemiyle Ölçümü. Düzce Tıp Dergisi 2012; (Baskı aşamasında)
33. Kaya E, Karahan S, Yaykaşlı KO, Bayram R, Sarıtaş A. Purification of High Purity Alpha Amanitin Using Preparative HPLC Method. Konuralp Med J. 2012;4(3): (Baskı aşamasında)
34. Benjamin, D. Mushrooms: Poisons and panaceas. (W. H. Freeman, New York). 1995: p200
35. Litten, W. "The most poisonous mushrooms". Scientific American 1975; 232 (3): 90–101.
36. Litten, W. "The most poisonous mushrooms". Scientific American 1975; 232 (3): 80–101.
37. <http://www.australianprescriber.com/magazine/23/2/artid/359/>, Erişim tarihi: 20 Haziran 2012
38. Carluccio A. The complete mushroom book. London: Quadrille Publishing, 2003: p. 224.
39. Trim GM. Poisoning by *Amanita phalloides* mushrooms in the Australian Capital Territory. Medical Journal of Australia 2007; 171: 247–249.
40. Trim GM, Lepp H, Hall MJ, McKeown RV, McCaughan GW, Duggin GG. Poisoning by *Amanita phalloides* ('deathcap') mushrooms in the Australian Capital Territory. Med J Aust 1999;171:247-9.

41. Benjamin, D. Mushrooms: Poisons and panaceas. (W. H. Freeman, New York). 1995: p198–199
42. Trim Geoffrey M. "Poisoning by *Amanita phalloides* ("deathcap") mushrooms in the Australian Capital Territory". Medical Journal of Australia, September 1999; 171 (5): 247–249.
43. Hall IR, Stephenson SE, Buchanan PK, Yn W, Cole AL. Edible and poisonous mushrooms of the world. Published by New Zealand Institute for Crop & Food Research Limited , 2003: p. 131–133.
44. Phillips R. Mushrooms and other fungi of North America. New York: Firefly Books Publishing, 2005: p. 14.
45. Australian National Botanic Gardens Fungi Web Site, <http://www.anbg.gov.au/fungi/deathcap.html>, Erişim tarihi: 20 Mart 2012.
46. Linus Zeitlmayr. F. Muller, 1968: p62
47. Litten, W. "The most poisonous mushrooms". Scientific American 1975; 232 (3): 90–97.
48. Köppel C. Clinical symptomatology and management of mushroom poisoning. Toxicon. 1993; 31:1513–1540.
49. Karlson-Stiber C, Persson H. Cytotoxic fungi-an overview. Toxicon 2003;42:320–345.
50. Horgen Paul A, Allan C, Vaisius F, Joseph F. The insensitivity of mushroom nuclear RNA polymerase activity to inhibition by amatoxins. Archives of Microbiology. 1978; 118: 317–9.
51. Horgen, Paul A.; Allan C. Vaisius and Joseph F. Ammirati. "The insensitivity of mushroom nuclear RNA polymerase activity to inhibition by amatoxins". Archives of Microbiology. 1978; 118 (3): 317–9.
53. Karlson-Stiber C, Persson H. Cytotoxic fungi - an overview. Toxicon. 2003; 42: 339–49.
54. Litten W. The most poisonous mushrooms. Scientific American. 1975; 232: 95–101.
55. Vetter J. Toxins of *Amanita phalloides*. Toxicon. 1998; 36: 13–24.

56. Karlson-Stiber C, Persson H. Cytotoxic fungi-an overview. *Toxicol* 2003;42:339–349.
57. Cleland JB. Toadstools and mushrooms and other larger fungi of South Australia. Adelaide : South Australian Government Printing. 1976.
58. Pinson CW, Daya MR, Benner KG, Norton RL, Deveney KE, Ascher NL, Roberts JP, Lake JR, Kurkchubasche AG, Ragsdale JW. Liver transplantation for severe *Amanita phalloides* mushroom poisoning. *American Journal of Surgery*. 1990; 159: 493–9.
59. North, Pamela Mildred. Poisonous plants and fungi in color. Pharmaceutical Society of Great Britain [by] Blandford P., 1967
60. Nicholls DW, Hyne BE, Buchanan P. Death cap mushroom poisoning. *The New Zealand Medical Journal*. 1995; 108: 234.
61. Klein AS, Hart J, Brems JJ, Goldstein L, Lewin K, Busuttill RW. Amanita poisoning: treatment and the role of liver transplantation. *American Journal of Medicine*. 1989; 86: 187–93.
62. Fineschi V, Di Paolo M, Centini F. Histological criteria for diagnosis of *Amanita phalloides* poisoning. *J. Forensic Sci*. 1996; 41: 429–432
63. Floersheim, GL, Weber O, Tschumi P, Ulbrich M. Die klinische knollenblatterpilzvergiftung (*Amanita phalloides*): prognostische faktoren und therapeutische massnahmen (Clinical death-cap (*Amanita phalloides*) poisoning: prognostic factors and therapeutic measures.). *Schweizerische medizinische Wochenschrift*. 1982; 112: 1164–1177.
64. Benjamin, D. Mushrooms: Poisons and panaceas. (W. H. Freeman, New York). 1995: p215
65. Yelken B, Erkan A. Mantar zehirlenmeleri - 104 olgunun değerlendirmesi. *Türk Yoğun Bakım Derneği Dergisi*. 2009; 7: 12-16.
66. Enjalbert F, Rapior S, Nouguiet-Soulé J, Guillon S, Amouroux N, Cabot C. Treatment of amatoxin poisoning. 20-year retrospective analysis. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*. 2002; 40: 715–757
67. Vesconi S, Langer M, Iapichino G, Costantino D, Busi C, Fiume L. Therapy of cytotoxic mushroom intoxication. *Critical care medicine*. 1985; 13: 402–406.

68. Enjalbert F, Rapior S, Nouguier-Soulé J, Guillon S, Amouroux N, Cabot C. Treatment of amatoxin poisoning: 20-year retrospective analysis. *Journal of Toxicology - Clinical Toxicology*. 2002; 40: 715–57.
69. Spoerke DG, Rumack BH. *Handbook of mushroom poisoning, diagnosis and treatment*. Boca Raton : CRC Press, 1994: p. 233-248.
70. Kinghorn AD. *Toxic plants*. New York: Columbia University Press, 1979: p. 7-58.
71. Spoerke DG, Rumack BH. *Handbook of mushroom poisoning, diagnosis and treatment*. Boca Raton : CRC Press, 1994: p. 165-231.
72. Bresinsky A, Besl H. *A colour atlas of poisonous fungi*. London: Wolfe Publishing, 1990: p. 30-49.
73. Bresinsky A, Besl H. *A colour atlas of poisonous fungi*. London: Wolfe Publishing, 1990.
74. Wieland, T. *Peptides of poisonous Amanita mushrooms*. New York: Springer-Verlag Publishing, 1986.
75. Spoerke DG, Rumack BH. *Handbook of mushroom poisoning, diagnosis and treatment*. Boca Raton : CRC Press, 1994: p. 249-264.
76. Reisdorff EJ, Roberts MR, Wi-egenstein JG. *Pediatric emergency medicine*. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1993: p. 762-766.
77. Spoerke DG, Rumack BH. *Handbook of mushroom poisoning, diagnosis and treatment*. Boca Raton : CRC Press, 1994: p. 289-301.
78. Vetter J. Toxins of *Amanita phalloides*. *Toxicon*. 1998;36:13-24.
79. [http://assay.nih.gov/assay/index.php/Types\\_of\\_Inhibition](http://assay.nih.gov/assay/index.php/Types_of_Inhibition) Erişim tarihi: 20:18 30.07.12
80. Köppel C. Clinical symptomatology and management of mushroom poisoning. *Toxicon*. 1993;31:1513-1540.
81. Greenleaf AL. Amanitin-resistant RNA polymerase II mutations are in the enzyme's largest subunit. *J. Biol. Chem*. 1983; 258:13403-13406.
82. Belliaro F, Massano G. Determination of  $\alpha$ -amanitin in serum by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography*. 1983; 6: 551-558.

83. Cessi C, Fiume L. Increased toxicity of  $\alpha$ -amanitin when bound to a protein. *Toxicol.* 1969; 6: 309-310.
84. Belliardo F, Massano G, Accomo, S. Amatoxins do not cross the placental barrier. *Lancet.* 1983; 7: 1381
85. Bresinsky A, Besl H. A colour atlas of poisonous fungi. London: Wolfe Publishing, 1990: p .85.
86. Jaeger A, Jehl F, Flesch F, Sauder P, Kopferschmitt J. Kinetics of amatoxins in human poisoning: therapeutic implications. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1993;31(1):63-80.
87. Ford WW. The distribution of poisons in mushrooms. *Science.* 1909; 30: 97-108.
88. Lynen F, Wieland U. Über die giftstoffe des knollenblatterpilzes IV. *Liebigs Ann. Chem.* 1938; 533: 93-117.
89. Wieland.H, Hallermayer R. Amanitin, das hauptgift des knollenblatterpilzes. *Liebigs Ann. Chem.* 1941; 548: 1-8.
90. Mat A. Türkiye’de Mantar Zehirlenmeleri ve Zehirli Mantarlar, İlaveli 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2000: p. 154
91. Thevenin M, Claude JR, Truhaut R. L'amanite phalloide et ses toxines. I. L'evolution des connaissances sur l'identite des principes toxiques. *Eur.J.Tox.*1976: 9: 197-211.
92. Andary C, Enjalbert F, Privat G, Mandrou B. Etude de la variation du taux d'amanitines (alpha, beta et gamma) chez A. phalloides Fr. *Bull. Soc. Myc. Fr.* 1979; 95: 169-180.
93. Andary C, Privat G, Enjalbert F, Mandrou B. Teneur comparative en Amanitines de différents agaricales toxiques d'Europe. *Documents Mycologiques* 1979; 10: 61-69.
94. Mat A, Yurdun T, Tümkör Z. Determination of a-amanitin by HPLC in *Amanita phalloides* growing in Istanbul forests. *I.U.Ecz. Fak. Derg.* 1995; 31: 17-24.
95. Spoerke DG, Rumack BH. Handbook of mushroom poisoning, diagnosis and treatment. Boca Raton : CRC Press, 1994: p.279-287.
96. Bresinsky A, Besl H. A colour atlas of poisonous fungi. London: Wolfe Publishing, 1990: p. 21

97. Wieland T. Zeitungspapier-test für giftpilze, umschau wiss. Technik. 1978; 78: 611.
98. Stijve T. High-performance thin-layer chromatographic determination of the toxic principles of some poisonous mushrooms. Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 1981; 72: 44-54.
99. Mat A, Yurdun T, Tümkor Z, Ayanoglu A, Öz V. Deetermination of amanitin in serum by HPLC. Marmara Üniv. Ecz. Der. 1996; 12: 1-8.
100. Grzymala S. L'isolement de l'orellanine, poison du Cortinarius orellanus Fries et l'étude de ses effets anatomopathologiques. Bull. Soc. Myc. Fr. 1962; 78: 394-404.
101. <http://www.res-medical.com/basic-medical/27952>, Erişim tarihi: 30.07.12
102. HPLC Separation and Purification of Peptide Toxin and It's Antitumor Effect of Amanita Subjunquillea.S.lmai, <http://www.tumorres.com/malignant-tumor/32486.htm> Erişim tarihi: 30.07.12
103. HE. Hallen, GC. Adams and A. Eicker. Amatoxins and phallotoxins in indigenous and introduced South African Amanita species, South African Journal of Botany 2002;68: 322–326
104. Moldenhauer G, Salnikov AV, Lüttgau S, Herr I, Anderl J, Faulstich H. Therapeutic potential of amanitin-conjugated anti-epithelial cell adhesion molecule monoclonal antibody against pancreatic carcinoma. J Natl Cancer Inst. 2012; 104(8): 622-34.
105. Antibacterial Activity in Higher Fungi (Mushrooms) and Endophytic Fungi from Slovenia. Damjan Janes, Samo Kreft, Maja Jurc, Katja Seme, and Borut S ˇtrukelj. Faculty of Pharmacy, Biotechnical Faculty, Institute of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine University of Ljubljana, Jamnikarjeva, Ljubljana, Slovenia; 2007;45(9): 700–706
106. K.D. Kröncke, G. Fricker, P. J. Meier, W. Gerok, T. Wieland, G. Kurz. Journal Article alpha-Amanitin uptake into hepatocytes. Identification of hepatic membrane transport systems used by amatoxins. Journal of Biological Chemistry 1986; 261(27):12562-7.
107. <http://www.inchem.org/documents/pims/fungi/amatox.htm#SectionTitle:5.3%20%20Dermal>, Erişim tarihi: 30.07.12



108. Kaya E, Karahan S, Bayram R, Hancı M, Bayram S, Yılmaz İ, Yaykaşlı KO: Amanitin Phalloides Mantar Ekstresinden  $\alpha$ -amanitin Toksinin Semipreparatif HPLC Yöntemi ile Saflaştırılması, 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Eskişehir, 19-22 Ekim 2011.
109. Defendenti C, Bonacina E, Mauroni M, Gelosa L. Validation of a high performance liquid chromatographic method for alpha amanitin determination in urine. *Forensic Sci Int.* 1998;92(1):59-68.
110. Tong TC, Hernandez M, Richardson WH 3rd, Betten DP, Favata M, Riffenburgh RH, Clark RF, Tanen DA. Comparative treatment of alpha-amanitin poisoning with N-acetylcysteine, benzylpenicillin, cimetidine, thioctic acid, and silybin in a murine model. *Ann Emerg Med.* 2007 Sep;50(3):282-8.
111. Homann J, Rawer P, Bleyl H, Matthes KJ, Heinrich D. Early Detection of Amatoxins in Human Mushroom Poisoning. *Arch. Toxicol.* 1986;59:190-191.
112. Marinozzi V, Fiume L. Effects of  $\alpha$ -amanitin on mouse and rat liver cell nuclei. *Exp Cell Res.* 1971;67(2):311-322

## ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Karabük ilinde doğdum. Lise eğitimini İstanbul Çapa Anadolu Öğretmen Lisesinde gördüm. 2005 yılında İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümünden mezun oldum. Okuldaki bazı hocalarımın yönlendirmesiyle TUS sınavının TTBT-1 ve TTBT-2 kısımları için hazırlandım. 2008 yılının güz döneminde 60.287 puan aldım. Ancak tıp dışı branşların kadrolarının 3 yıl boyunca daraltılması ve sonrasında sınav hakkının alınması nedeniyle başarılı olamadım. Halen 2010 yılında girmiş olduğum Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında eğitimimi sürdürmekteyim.



DÜZCE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAYI  
DÜZCE UNIVERSITY LOCAL ETHICS COMMITTEE FOR LABORATORY ANIMALS  
RESEARCHES APPROVAL FOR APPLICATION

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b> (APPLICATION INFORMATION)	<b>ARAŞTIRMANIN ADI</b>	"Farelerde Amanita Phalloides Toksini Alfa Amanitinin Deriden Emilimi "		
	<b>TITLE OF THE PROJECT</b>	"Transdermal absorption of Amanita Phalloides' toxin, that alfa amanitin, in mice"		
	<b>SORUMLU ARAŞTIRICI (AUTHORIZED RESEARCHER)</b>	Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul KAYA		
	<b>DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER RESEARCHERS)</b>	Yrd. Doç. Dr. Havva ERDEM Arş Gör Sait BAYRAM YL Öğr Selim KARAHAN YL Öğr Mustafa G. SÜRME		
<b>ÇALIŞMA ESASI İYİ LABORATUAR UYGULAMALARI KILAVUZU (Good Laboratory Practice)</b>				
<b>KARAR BİLGİLERİ</b> (INFORMATION OF DECISION)	<b>Karar No (Decision Nr) : 2011/006</b>	<b>Tarih (Date:dd.mm.yyyy) : 03/08/2011</b>		
	Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul KAYA sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgelerin araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda, adı geçen araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir. (This project was decided to be approved for clinical ethics.)			
<b>Ünvanı/Adı/Soyadı (Members)</b>	<b>Uzmanlık Alanı (Profession)</b>	<b>Kurumu (Institution)</b>	<b>Serb Açıklaması (Varsa) (Declaratory Clause [if any])</b>	<b>İmza (Signature)</b>
Prof. Dr. S. Oktay ARSLAN (Başkan)	Tıbbi Farmakoloji (Pharmacology)	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi		
Yrd. Doç. Dr. Meral KEKEÇOĞLU	Zootekni (Zootechnics)	Düzce Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi		
Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul KAYA (Üye)	Tıbbi Farmakoloji (Pharmacology)	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	ARAŞTIRMACI RESEARCHER	ARAŞTIRMACI RESEARCHER
Doç. Dr. Ramazan MEMİŞOĞULLARI (Üye)	Biyokimya (Biochemistry)	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi		
Doç. Dr. Handan ANKARALI (Üye)	Biyoistatistik (Biostatistics)	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi		
Yrd. Doç. Dr. Ümran YILDIRIM (Üye)	Patoloji (Pathology)	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi		
Yrd. Doç. Dr. Gülbin SEZEN (Üye)	Anestezi (Anesthesia)	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi		
Yrd. Doç. Dr. AKIL KETEN (Üye)	Orman Entomolojisi (Entomology of Forest)	Düzce Üniversitesi Orman Fakültesi		
İsmail İşildak (Üye)	Sivil Toplum Örgütü (Civil Association)	Kızılay Derneği Kurulup Şubesi		
Nihat YAZ (Üye)	Sivil Üye (Civil Member)			