



T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALFA-AMANİTİNE BAĞLI KARACİĞER
TOKSİSİTESİNİN ÖNLENMESİNDE SİLİBİNİN
İLE RESVERATROLÜN ETKİLİLİĞİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

AYNUR ŞAHİN

**TOKSİKOLOJİ
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2018

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970016

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ALFA-AMANİTİNE BAĞLI KARACİĞER
TOKSİSİTESİNİN ÖNLENMESİNDE SİLİBİNİN
İLE RESVERATROLÜN ETKİLİLİĞİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

**TOKSİKOLOJİ
DOKTORA TEZİ**

AYNUR ŞAHİN

Danışman Öğretim Üyesi: DOÇ. DR. MUALLA AYLİN ARICI

Bu araştırma TUBİTAK 3001 tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 114S927

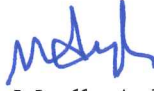
TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2013970016

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı, Toksikoloji

Doktora programı öğrencisi Aynur ŞAHİN ‘Alfa-Amanitine Bağlı Karaciğer

Toksisitesinin Önlenmesinde Silibinin ile Resveratrolün Etkililiğinin Karşılaştırılması’

konulu Doktora tezini 12/03/2018 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



Doç. Dr. Mualla Aylin ARICI

BAŞKAN

(Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi)



Prof. Dr. Yeşim TUNÇOK

ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi)



Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR

ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi)



Prof. Dr. Serap ANNETTE AKGÜR

ÜYE

(Ege Üniversitesi Madde Bağımlılığı,
Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü)



Prof. Dr. Yusuf Cem KAPLAN

ÜYE

(İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Prof. Dr. Şule KALKAN

YEDEK ÜYE

(Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi)

Prof. Dr. Tijen KAYA TEMİZ

YEDEK ÜYE

(İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR	vi
TEŞEKKÜR	vii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
1.1. Problemin Tanımı ve Önemi.....	5
1.2. Araştırmanın Amacı	6
1.3. Araştırmanın Hipotezleri.....	6
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. Mantar Zehirlenmeleri Hakkında Genel Bilgiler.....	8
2.1.1. Mantar Zehirlenmelerinin Sıklığı.....	8
2.2. <i>Amanita Phalloides</i> Türü Mantarlar	9
2.2.1. Tarihçe	9
2.2.2. Fiziksel Özellikler	10
2.2.3. <i>Amanita Phalloides</i> Türü Mantarların Toksinleri.....	11
2.2.4. Alfa Amanitin (α -AMA).....	12
2.2.4.1. Farmakokinetik Özellikler	12
2.2.4.2. Toksik Doz ve Etki Mekanizması.....	13
2.2.5. Klinik Bulgular	14
2.2.6. Tanı	15
2.2.7. Zehirlenmenin Tedavisi	16
2.3. Karaciğer Toksisitesi.....	17
2.3.1. Oksidatif Stres.....	18
2.3.1.1 Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)	19
2.3.1.2 Eksojen Oksidanlar	20

2.3.1.2	Antioksidanlar	21
2.3.1.4.	Oksidatif Stres DNA Hasarı.....	24
2.3.1.5.	Oksidatif Stresin Lipidler Üzerindeki Etkisi	25
2.3.1.6.	Oksidatif Stresin Protein Yapılar Üzerine Etkisi	25
2.3.2.	Oksidatif Stres ve Karaciğer	26
2.3.3.	Akut Karaciğer Nekrozu	26
2.3.3.	α -AMA'ye Bağlı Karaciğer Nekrozu.....	26
2.3.4.	Hücre Kültürü Çalışmalarında α -AMA	28
2.4.	Resveratrol	28
2.4.1.	Resveratrolün Farmakokinetik Özellikleri.....	29
2.4.2.	Resveratrolün Etki Mekanizması	30
2.4.3.	Parasetamole Bağlı Karaciğer Toksisitesinde Resveratrol	31
2.4.4.	CCl ₄ Bağlı Karaciğer Toksisitesinde Resveratrol	31
2.4.5.	Alkole Bağlı Karaciğer Toksisitesinde Resveratrol	32
2.4.6.	Diğer Ksenobiyotiklere Bağlı Gelişen Karaciğer Toksisitesinde Resveratrol	32
2.5.	Silibinin	33

3. GEREÇ VE YÖNTEM35

3.1.	Araştırmanın Tipi	35
3.2.	Araştırmanın Yeri ve Zamanı	35
3.3.	Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	35
3.3.	Çalışma Materyali	35
3.4.	Çalışma Protokolü.....	35
3.4.1	Protokolde Yer Alan İş Paketleri	36
3.4.1.1.	Ön Çalışma.....	36
3.4.2	Deney Protokolü	40
3.4.3.	Deney Gruplarında Değerlendirme Yöntemleri.....	42
3.4.3.1.	Histomorfolojik Değerlendirme	42
3.4.3.2.	Apoptozis Varlığının Değerlendirilmesi	43
3.4.3.3.	Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi	44
3.5.	Araştırmanın Değişkenleri	45
3.6.	Veri Toplama Araçları	46
3.7.	Araştırma Planı ve Takvimi	48

3.8.	Verilerin Değerlendirilmesi	49
3.9.	Araştırmanın Sınırlılıkları	49
3.10.	Etik Kurul Onayı	50
4.	BULGULAR	51
4.1	Farelerde Karaciğer Fonksiyon Testlerinin ve Direkt ve İndirek Bilirubinin Bazal Değerlerinin belirlenmesi	51
4.1.2	Çözücülerin ve Legalon®'un karaciğer üzerine etkilerinin değerlendirilmesi	57
4.2.	Sonuçlar	61
4.2.1	Deney Gruplarında, Karaciğer Histomorfolojik Hasar Skoru ve Karaciğer Histomorfolojisi	63
4.2.2	Deney Gruplarında Karaciğer Örneklerinin Histomorfolojik Görünümü	64
4.2.3	Deney Gruplarında Antioksidan Enzim Düzeyleri	66
4.2.4	Deney Gruplarında İmmunhistokimyasal Değerlendirmeler	66
4.2.5	Deney Gruplarında Elektron Mikroskopik İncelemeler	70
5.	TARTIŞMA.....	72
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	81
7.	KAYNAKLAR.....	83
8.	EKLER	91
8.1.	Etik Kurul Raporu	91
8.2.	Özgeçmiş	92
8.3.	Tez Sonuçlarının Uluslararası Kongrede Sözlü Bildiri Özeti	100
8.4.	Uluslararası Kongrede Alınan Sözlü Bildiri Özel Ödülü	102

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1.	Amatoksinlerin kimyasal yapısı	12
Tablo 2.	Karaciğer toksisitesine neden olan etkenler ve etki mekanizmaları	18
Tablo 3.	Erkek Balb/c farelerin bazal biyokimyasal değerleri	22
Tablo 4.	α -AMA doz-cevap eğrisi çalışmalarında, farelerin deney başlangıcı ve sonrasında ölçülen ağırlık ortalamaları ve ağırlık farkı ortalamaları	23
Tablo 5.	Logaritmik olarak artırılan α -AMA'nın biyokimyasal parametreler ve histomorfolojik hasar skoruna etkisi	46
Tablo 6.	Deneyde kullanılan kimyasallar, markaları ve kullanım amaçları	47
Tablo 7.	Erkek Balb/c farelerin bazal biyokimyasal değerleri	52
Tablo 8.	α -AMA doz-cevap eğrisi çalışmalarında, farelerin deney başlangıcı ve sonrasında ölçülen ağırlık ortalamaları ve ağırlık farkı ortalamaları	53
Tablo 9.	Logaritmik olarak artırılan α -AMA'nın biyokimyasal parametreler ve histomorfolojik hasar skoruna etkisi	55
Tablo 10.	6 saat, 12 saat aralıklı DMSO, alkol ve Legalon® gruplarında farelerin deney başlangıcı ve sonrasında ölçülen ağırlık ortalamaları ve ağırlık farkı ortalamaları.....	58
Tablo 11.	6 saat, 12 saat aralıklı DMSO, alkol ve Legalon®'un biyokimyasal parametreler üzerine etkisi	59
Tablo 12.	Deney gruplarında farelerin deney başlangıcı ve sonrasında ölçülen ağırlık ortalamaları ve ağırlık farkı ortalamaları	61
Tablo 13.	Deney gruplarında, AST ve ALT değerleri (U/L)	62
Tablo 14.	Deney gruplarında, Total bilirubin ve Direk bilirubin değerleri (mg/dL).....	63
Tablo 15.	Deney gruplarında antioksidan enzim düzeyleri	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1.	<i>Amanita Phalloides</i> türü mantar	10
Şekil 2.	<i>Amanita phalloides</i> ; a. Şapka , b. Annulus , c. Volva, d. Sap.....	11
Şekil 3.	α -AMA'in hücre içine transportu ve toksisite mekanizması	14
Şekil 4.	Lipid peroksidasyon oluşumu	25
Şekil 5.	α -AMA'in oksidatif hasar oluşturma mekanizması	27
Şekil 6.	Ön çalışma gruplarında deney protokolü	38
Şekil 7.	Fareden kardiyak ponksiyon ile kan alınması	39
Şekil 8.	Fareden karaciğer örneğinin alınması	39
Şekil 9.	Deney protokolü	41
Şekil 10.	Logaritmik olarak artırılan α -AMA'e bağlı AST (U/L) ve ALT değerleri (U/L) ..	56
Şekil 11.	Logaritmik olarak artırılan α -AMA'e bağlı Total bilirubin ve Direkt bilirubin değerleri	56
Şekil 12.	α -AMA uygulaması ile karaciğerin histomorfolojik görünümü.	57
Şekil 13.	DMSO (Dimetil sülfoksit) 6 saat, DMSO 12 saat, Alkol, Legalon grubunda karaciğerin histomorfolojik görüntüleri	60
Şekil 14.	Deney gruplarında karaciğer fonksiyon testleri	62
Şekil 15.	Deney gruplarında karaciğer histolojik hasar skoru	64
Şekil 16.	Deney gruplarında karaciğer Hemotoksilen Eozin boyaması ile histomorfolojik görünüm.	65
Şekil 17.	Deney gruplarında, karaciğer dokusuna ait aktif kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama örnekleri.....	67
Şekil 18.	Deney gruplarında, aktif kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama skoru ortalaması	68
Şekil 19.	Deney gruplarında, karaciğer dokusuna ait TUNEL boyama örnekleri	69
Şekil 20.	Elektron mikroskopik inceleme için karaciğer yarı ince kesitleri.....	70
Şekil 21.	Karaciğer dokusuna ait elektron mikroskop resim örnekleri.	71

KISALTMALAR

α -AMA:	Alfa Amanitin
OATP :	Organik anyonik transporter peptid
SOR:	Serbest oksijen radikalleri
CCl ₄ :	Karbon tetraklorür
RIA :	Radioimmunoassay
ELISA:	Enzim işaretli immunosorbent assay
CZE :	Kapiller elektroforez
LC:	Ultraviyole ile kombine sıvı kromatografi
LC-MS/MS:	Sıvı kütle spektrofotometri
NAS:	N-asetilsistein
AST:	Aspartat transaminaz
ALT:	Alanin transaminaz
O ₂ :	Oksijen
Fe:	Demir
Bakır:	Cu
O ²⁻ :	Süperoksit
OH ⁻ :	Hidroksil
8-OHdG :	8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
GC:	Gaz kromatografisi
HPLC:	Yüksek basınçlı likit kromatografi
MDA:	Malondialdehit
PCO:	Protein karbonil deriveleri
DNPH:	Dinitrofenilhidrazin
DNP:	Dinitrofenol
SOD:	Süperoksit dismutaz
GSH/GSSG:	Glutasyon/okside glutasyon
PBS:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
KCFT:	Karaciğer fonksiyon testleri
APAP :	Parasetamol
İ.p:	İntraperitoneal

DEÜTF: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

KHHS : Karaciğer Histolojik Hasar Skoru

DAB: Diaminobenzidin



TEŞEKKÜR

İlk teşekkürümü doktora eğitimim boyunca bir danışmandan öte bir abla gibi bana her türlü desteğini sağlayan, akademik anlamda tecrübelerini benimle paylaşan, her anlamda ilerleyişime katkı sağlayan, uzak mesafelerden gelişlerimde bana evinin ve ailesinin kapılarını sonuna kadar açan kısacası bu doktora eğitimimdeki başarımın en önemli mimarlarından biri olan danışmanım ve ablam sayın Doç.Dr. M. Aylin ARICI'ya,

Klinik Toksikoloji Doktorası hayalimin gerçekleşmesine aracılık eden, tüm anlayışları ve bilimsel birikimleriyle bana şimdiki akademik hayatıma unutamayacağım ve her zaman gurur duyacağım deneyimleri katan Klinik Toksikoloji Bilim Dalı öğretim üyeleri sayın Prof. Dr.Yeşim TUNÇOK'a, sayın Prof. Dr.Şule KALKAN'a ve sayın Doç.Dr. Nil HOCAOĞLU AKSAY'a,

Eğitimim boyunca bilgi, ilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Sedef GİDENER'e ve Anabilim Dalı'nda görev yapan diğer öğretim üyelerine,

Türkiye'nin ilk Klinik Toksikoloji Doktorası yapan Acil Tıp uzmanlarının zor ve başarılı serüveninde benimle birlikte kader birliği yapan diğer doktora öğrencisi olan arkadaşlarım Uzm. Dr. Süveyda YEŞİLARAS ve Uzm. Dr. Feriye ÇALIŞKAN'a,

Tezimin deney aşamasında gece gündüz fark etmeksizin emeğini ve desteğini esirgemeyen Biyolog Oktay KESİCİ'ye,

Arkadaşlıklarını ve desteklerini doktora eğitimim boyunca her zaman hissettiğim başta Uzm. Dr. Burç AYDIN ve Dr. Erkan KARA başta olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma ve doktora başvurumun ilk aracısı olan Dr. Barış SARIÇOBAN'a,

Doktora eğitimime gidiş ve gelişlerimde beni pozitif olarak destekleyen başta Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp öğretim üyeleri olmak üzere Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Acil Tıp Kliniği'nde ve Dr. Faruk İlker Bergama Devlet Hastanesi'nde birlikte çalıştığım hekim ve sağlık personeli arkadaşlarıma,

Son olarak da en çok onlarla geçireceğim zamanlarını, anılarını feda ederek hayallerimin gerçekleşmesinde en büyük katkısı olan eşim ve canım oğlum Berat Eren olmak üzere hayattaki en değerli varlığım olan tüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

Alfa-Amanitine Bağlı Karaciğer Toksisitesinin Önlenmesinde Silibinin ile Resveratrolün Etkililiğinin Karşılaştırılması

Aynur ŞAHİN, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı

dr-aynursahin@hotmail.com

ÖZET

Amaç: Alfa amanitin (α -AMA) içeren *Amanita phalloides* türü mantarlar, ölümcül mantar zehirlenmelerinin çoğundan sorumludur ve karaciğer toksisitesi ve akut karaciğer yetmezliği ile sonlanan ciddi zehirlenmelere neden olur. Silibinin ve penisilin G gibi mevcut antidotlar, α -AMA ile oluşturulan karaciğer toksisitesinin önlenmesi ve/veya tedavisinde yeterince etkili değildir. Çalışmamızın amacı, resveratrolün α -AMA'e bağlı karaciğer toksisitesi üzerindeki etkilerini *in vivo* deneysel toksisite modelinde araştırmak ve tedavide antidot olarak kullanılan silibinin ile karşılaştırmaktır.

Yöntem: Balb/c farelerde, AST ve ALT değerlerinde anlamlı oranda yüksekliğe neden olan ve histomorfolojik olarak da karaciğerde hasara neden olan 1.4 mg/kg α -AMA ile *in vivo* toksisite modeli oluşturuldu. Kontrol grubunda α -AMA+%0.9. sodyum klorür (NaCl), Dimetil sülfoksit (DMSO) grubunda, α -AMA+ DMSO, resveratrol gruplarında, 30 mg/kg resveratrol, α -AMA ile eş zamanlı (α -AMA +ER), 12 saat (α -AMA +12R) ve 24 (α -AMA +24R) saat sonra olmak üzere 3 farklı tedavi protokolünde uygulandı. 5 mg/kg silibinin ise (α -AMA +Sil) α -AMA ile eş zamanlı olarak 6 saat arayla uygulandı. Kırk sekiz saatlik deney protokolünün sonunda fareler kurban edildi. Alınan serum örneklerinden AST, ALT, Total bilirubin, Direk bilirubin düzeyleri, karaciğer dokularından antioksidan enzimler ve histomorfolojik incelemeler yapıldı. TUNNEL ve aktif kaspaz-3 incelemeleri ile apoptozis değerlendirildi.

Bulgular: AST ve ALT değerleri, α -AMA+ER ve α -AMA+12R gruplarında, histomorfolojik hasar skorları ise α -AMA+ER, α -AMA+12R, α -AMA+24R ve gruplarında α -AMA+SF grubuna göre anlamlı düşüş gösterdi. Resveratrol, karaciğerde mononükleer hücre infiltrasyonunu, nekrozu ve aktif kaspaz-3 immünopozitifliğini azalttı.

Sonuç: *İn vivo* deneysel toksisite modelimizde, resveratrol, α -AMA'e bağlı gelişen karaciğer toksisitesini önlemede etkili bulundu. Sonuç olarak; resveratrol, *Amanita phalloides* türü mantarlarla zehirlenmelerde kullanılabilme potansiyeli olan yeni bir tedavi alternatifidir.

Anahtar Sözcükler: α -AMA, resveratrol, karaciğer toksisitesi , silibinin.



A Comparison of the Effectiveness of Silibinin and Resveratrol in Preventing Alpha-Amanitin-Induced Hepatotoxicity

ABSTRACT

Objective: *Amanita phalloides* species mushrooms containing alpha amanitin (α -AMA) are responsible for the majority of fatal mushroom intoxications and can lead to severe poisonings resulting in liver toxicity and acute hepatic failure. Existing antidotes, such as silibinin and penicillin G, are not sufficiently effective in the prevention and/or resolution of α -AMA induced liver toxicity. We investigated the effects of resveratrol on α -AMA induced liver toxicity and compared with silibinin, a known antidote in the *in vivo* toxicity model.

Method: The *in vivo* toxicity model was established with 1.4 mg/kg α -AMA, which results in significant elevation in AST and ALT values in Balb/c mice and also causes histomorphological damage in the liver. α -AMA+0.9% sodium chloride (NaCl) was administered in the control group, and α -AMA+dimethyl sulfoxide (DMSO) in the DMSO group, while 30 mg/kg resveratrol was administered in the resveratrol groups, in three different treatment protocols, simultaneously with α -AMA (α -AMA +ER), after 12 h (α -AMA +12R) and after 24 h (α -AMA +24R). Silibinin at 5 mg/kg (α -AMA +Sil) was administered at 6-h intervals simultaneously with α -AMA. Mice were sacrificed at the end of the 48-h experimental protocol. AST, ALT, total bilirubin, and direct bilirubin levels were investigated from serum specimens collected, while antioxidant enzymes and histomorphological examinations were performed from liver tissue. TUNEL and active caspase-3 were examined and apoptosis was evaluated.

Results: The liver transaminase levels in α -AMA+SR and α -AMA+12R groups and histomorphologic injury score in the α -AMA+SR, α -AMA+12R, α -AMA+24R and α -AMA+Sil groups were significantly lower than that of the α -AMA+NS group. Resveratrol, decreased mononuclear cell infiltration, necrosis and active caspase-3 immunopositivity in liver.

Conclusion: Resveratrol was found to be effective in α -AMA induced liver toxicity with its anti-inflammatory properties. It is a promising antidote with the potential for use in the treatment of liver toxicity associated with *Amanita phalloides* type mushroom poisonings.

Key Words: α -AMA, resveratrol, liver toxicity, silibinin.

1. GİRİŞ VE AMAC

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Amanita phalloides türü mantarlar, tüm dünyada morbidite ve mortalite ile sonlanan ciddi zehirlenmelere neden olmaktadır. Halk arasında, evcik kıran ve köy göçüren mantarı olarak da bilinen bu tür mantarlarla zehirlenmelerde, klinik bulguların, asemptomatik bir periyod sonrasında geç ortaya çıkışı, hastaların acil servise başvurularının gecikmesine neden olmakta ve zehirlenmelerin tanısı ve tedavisini zorlaştırmaktadır.

Siklopeptid içeren mantarlar içinde yer alan *Amanita phalloides* türü mantarların içeriğinde; amanitin, falloidin ve viroidin gibi çeşitli toksinler vardır. Hepatotoksisiteden sorumlu başlıca toksin Alfa Amanitin (α -AMA)'dır. α -AMA'nın toksik dozu 0.1 mg/kg'dır. Bir mantar yaklaşık olarak 10-15 mg α -AMA içerir ve tek bir mantarın yenmesi bile zehirlenmeye neden olur. α -AMA, gastrointestinal sistemden emilip sistemik dolaşıma geçtikten sonra hepatositlerin sinuzoidal membranında yer alan organik anyonik transporter peptid (OATP)1B3, adlı taşıyıcı proteinlerle hücre içine girerek, hepatosit çekirdeğinde yer alan RNA polimeraz II'yi inhibe ederek mRNA sentezi ve DNA transkripsiyonunu önler. mRNA sentezlenmemesi sonucunda, hepatositler gibi hücresel devri yüksek hücrelerde protein sentezi durur ve hepatosit hücre nekrozu gelişir.

Tedavide, toksinin karaciğer hücrelerine alımını inhibe eden silibinin, N-asetil sistein ve yüksek dozda Penisilin G de α -AMA'e bağlı zehirlenmelerde antidot olarak kullanılmasına karşın mortalite ve morbiditeyi önlemede yeterli derecede etkili olmadıkları bilinmektedir.

Resveratrol, pek çok maddeye bağlı karaciğer hasarını geri döndürücü etkisi gösterilmiş hepatoprotektif bir maddedir. Karaciğer hücrelerinde yenilenmeye neden olduğu, yükselen serbest oksijen radikallerinin (SOR) düzeyinde düşme oluşturduğu pek çok çalışmada gösterilmiştir. Bu etkilerin yanısıra, antiinflamatuvar, hepatik fonksiyonların işlevselliği ile ilgili mekanizmaların aktivasyonu ve ksenobiyotiklerin metabolizmasında da düzenleyici etkileri nedeniyle parasetamol, karbontetraklorür (CCl₄) gibi pek çok deneysel toksisite modelinde koruyucu etkileri gösterilmiştir.

1.2. Araştırmanın Amacı

Çalışmamızın amacı, antioksidan özellikleri bilinen resveratrolün, α -AMA'e bağlı karaciğer toksisitesinde etkililiğinin araştırılması ve klinikte antidot olarak kullanılan silibinin ile karşılaştırılmasıdır.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri:

H0: α -AMA'e bağlı karaciğer toksisitesinin iyileştirilmesinde resveratrol silibinininden daha üstün değildir.

H1: α -AMA'e bağlı karaciğer toksisitesinin iyileştirilmesinde resveratrol silibinininden daha üstündür.

Bu amaçla, hipotezimizi, *in vivo* deneysel α -AMA karaciğer toksisite modelinde araştırdık.

Deneysel çalışmamızda, farelerde karaciğer toksisitesi oluşturan α -AMA dozunu, yaptığımız ön çalışma ile 1.4 mg/kg (i.p.) olarak bulduk. Bu doz ile karaciğer toksisitesi oluşturduğumuz farelere 30 mg/kg (i.p.) resveratrol, α -AMA ile eş zamanlı, α -AMA uygulamasından 12 saat, 24 saat sonra ve α -AMA'e bağlı karaciğer toksisitesinde antidot olarak kullanılan silibininini de (5 mg/kg, i.p.) α -AMA ile eş zamanlı olarak uyguladık. Tüm fareleri deney süresince 48 saat gözledik ve 48. saatte, eter anestezisi altında sakrifiye edilen farelerden kardiyak ponksiyonla alınan kan örneklerinden karaciğer fonksiyon testleri, total ve direkt bilirubin düzeylerini ölçtük. Karaciğer dokusundan alınan örnekleri, histomorfolojik olarak ayrıca apoptozis ve/veya nekroz varlığı açısından değerlendirdik. Karaciğer homojenatlarından serbest oksijen radikallerine (SOR) bağlı hasarın değerlendirilebilmesi için antioksidan enzim düzeylerini ölçtük.

Biyokimyasal incelemeler ve karaciğer histomorfolojisini değerlendirdiğimizde, resveratrolün α -AMA'e bağlı karaciğer toksisitesini ne kadar erken uygulanırsa o kadar iyi düzelttiğini, apoptozisi geri döndürdüğünü ve antiinflamatuvar etkili olduğunu gösterdik. Silibinin ise, karaciğer dokusunda histomorfolojik olarak düzelme yapmasına rağmen biyokimyasal parametreler üzerine etkili olmadı.

Sonuç olarak; resveratrol, α -AMA'e bağlı karaciğer toksisitesinde *in vivo* deneysel koşullarda, karaciğer örneklerinin histomorfolojik incelemesi yanında yükselen biyokimyasal parametrelerde de iyileşmeye neden olması ile *Amanita phalloides* türü mantarlarla zehirlenmelerde kullanılabilme potansiyeli olan yeni bir tedavi alternatifidir. Resveratrolün, α -AMA'e bağlı karaciğer toksisitesinde kullanılabilcek bir antidot olarak geliştirilmesine yönelik çalışmalar planlanmalıdır.

Projemiz TÜBİTAK 3001 (Başlangıç Ar-ge Projeleri destekleme) programı tarafından 114S927 proje no'su ile desteklenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mantar Zehirlenmeleri Hakkında Genel Bilgiler

Dünyada bulunan 1.5 milyon tür mantardan yaklaşık olarak 1000 tanesi toksiktir. Yaklaşık 7000 tanesinin yenilebilir olduğu bildirilmektedir. Doğadan toplanarak yenen toksik mantarlar, tüm dünyada mortalite ve morbidite ile sonlanan ciddi zehirlenmelere neden olmaktadır. Özellikle kırsal kesimde, lezzetleri ve besin değerinin yüksek olduğu düşüncesi ile toplama mantar yeme yaygın bir alışkanlıktır. Mantarların lezzetli tadı, ucuzluğu, doğada kolayca yetişmesi ve ulaşılabilirliği zehirlenmelerin temel nedenleri arasındadır. Her ne kadar ülkemizde doğadan toplama mantarların yenmemesi ile ilgili çeşitli yollarla uyarılar yapılsa da özellikle yerel halktan toplayıcılar mantarların morfolojik özelliklerine bakarak ayırt edebildikleri düşüncesiyle her yıl topladıkları mantarları yerel pazarlarda satmakta ve bunun sonucu olarak zehirlenme olguları ortaya çıkmaktadır (1, 2).

Zehirlenmelere neden olan toksik mantarlar arasında; siklopeptid, monometilhidrazin, muskarin, koproin içeren mantarlar, halüsinojenik mantarlar yer almaktadır. Ölümle sonlanan zehirlenmelerin büyük çoğunluğundan ise siklopeptid içeren mantarlar sorumludur ve siklopeptid içeren mantarlar arasında da *Amanita phalloides* türü mantarlar en sık karşılaşılan zehirlenme etkenleridir (3). Bu tür mantarların içeriğinde yer alan ve karaciğerde toksisite oluşturan α -Amanitin (α -AMA), *Amanita*, *Galerina* ve *Lepiota* familyalarına ait bazı türlerin içeriğinde yer alır (4, 5).

Mantar zehirlenmeleri, klinik bulgularına göre; erken başlangıçlı (<6 saat), ertelenmiş başlangıçlı (6-24 saat) ya da geç başlangıçlı (>1 gün) olarak üç grupta sınıflanır. Erken başlangıçlı olanlar; nörotoksik, gastrointestinal ya da alerjik bulgulara, ertelenmiş başlangıçlı olanlar karaciğer ya da böbrek üzerinde toksik etkilere neden olur. Geç başlangıçlı olanlar ise böbrek üzerinde toksik etkilere, nörotoksik etkilere ya da rabdomiyolize neden olur (6).

2.1.1.Mantar Zehirlenmelerinin Sıklığı

Tanı koymanın zorluğu nedeniyle; mantar zehirlenmelerinin sıklığı ile ilgili veriler sınırlı olsa da, Dünya Sağlık Örgütü 2004-2014 yılları arasında mantar zehirlenmelerinin 346.000 ölümden sorumlu olduğunu bildirmiştir (1). Amerika Zehir Danışma Merkezleri Birliği'nin 2014 yılı Raporuna göre mantarlarla zehirlenmelerin oranı yaklaşık olarak %0.3'tür (7). Batı Karadeniz bölgesinde dört yıllık bir sürede, çocukluk çağında, ölümle

sonlanan zehirlenmeler içerisinde mantar zehirlenmelerinin oranı %4.5 olarak bildirilmiştir. İstanbul bölgesinde çocukluk çağı mantar zehirlenmelerinin retrospektif olarak incelendiği bir çalışmada, *Amanita phalloides* ile zehirlenme oranı %28'dir(8). Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç ve Zehir Danışma Merkezi'ne başvuran tüm zehirlenmeler içerisinde ise mantarlarla zehirlenmelerin oranı %2.5' dir (9). Mantar zehirlenmelerinde, dünya genelinde epidemiyolojik verilere bakıldığında Amerika ve Avrupa'da her yıl Amatoksin içeren mantarlarla zehirlenmelere bağlı, 100-200 arasında ölüm bildirilmektedir (10). Mantar zehirlenmelerinde, ölümlerin büyük oranından *Amanita phalloides* türü mantarlar sorumludur. Bunun nedeni, *Amanita phalloides* türü mantarlarla ya da siklopeptid içeren mantarlarla zehirlenmelerde tanı konulmasının zorluğundan kaynaklanmaktadır (11).

Amanita phalloides türü mantarlar, ılıman ve nemli iklim kuşağında, başlıca Avrupa ülkeleri ve Türkiye olmak üzere Amerika, Asya, Avustralya hatta Afrika kıtası da dahil dünyanın bir çok ülkesinde yetişmektedir (5). *Amanita phalloides* için en uygun çoğalma mevsimi bahar ve sonbahar aylarıdır ve zehirlenme olgularına en sık bu mevsimlerde rastlanmaktadır (12). Ancak zehirlenmeye neden olan toksin stabil olduğundan, bu tür mantarlarla zehirlenmelere, mantar konservesi ve kurutulmuş mantarların yenmesiyle bahar ayları dışında da rastlanabilmektedir (13).

2.2. *Amanita Phalloides* Türü Mantarlar

2.2.1 Tarihçe

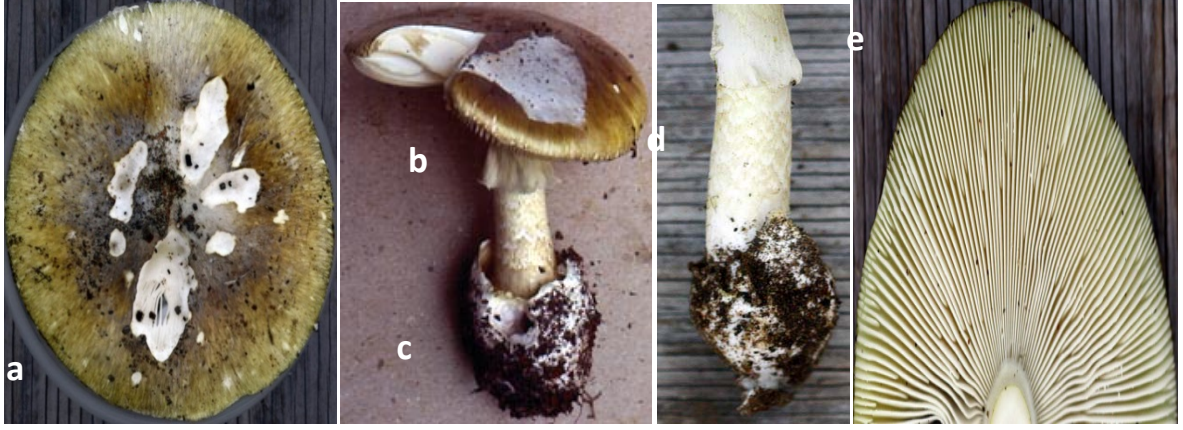
Amanitaceae ailesine mensup, “Death cap-ölüm şapkası” olarak da isimlendirilen *Amanita phalloides* türü mantarlar, İlk kez Fransız botanikçi Sébastien Vaillant tarafından 1727'de tanımlanmıştır (Şekil 1). Rusya'da Çar Alexis ve karısı (1694) ve Alman imparatoru IV. Charles (17. yüzyıl) *Amanita phalloides* türü mantar zehirlenmesi nedeniyle ölmüştür.



Şekil 1. *Amanita Phalloides* türü mantar

2.2.2 Fiziksel Özellikler

Amanita phalloides türü mantarlar, şapka, sap, annulus, volva olmak üzere 4 kısımdan oluşur (Şekil 2a-2b-2c-2d). Şapka yüzeyi düzgün, 6-12 cm genişliğinde olup mantarın genç evresinde yeşilimsi sarı iken yaşlandıkça renk kahverengiye doğru koyulaşır. Şapkanın alt yüzeyindeki lamelleri saptan bağımsız, hafif radyal çizgili ve beyazdır (Şekil 2e). Sapı ise düzgün, beyaz renkli ve yaklaşık 6-12 cm yüksekliğinde silindirik ve aşağıya doğru hafif şişkindir. Sapın üst kısımlarında beyaz zarımsı halkası (annulus) ve sapın dip kısmında ise fincan şeklinde volvası vardır. Bu halka ve volva morfolojisi, *Amanita Phalloides*'in diğer türlerden ayrımında önemlidir. Şapka kısmının tadının güzel, kokusunun ise meyvemsi olduğu belirtilmektedir (12). Fiziksel özellikler yılın farklı zamanlarında farklı bölgelerde hava, toprak özelliklerine göre değişkenlik gösterebilmekte ve bu nedenle diğer mantar türlerinden ayrımı zor olmaktadır(14).



Şekil 2: *Amanita phalloides* ; a. Şapka , b. Annulus, c. Volva, d. Sap, e. Lamel

2.2.3 *Amanita Phalloides* Türü Mantarların Toksinleri:

Amanita phalloides türü mantarlar, yaklaşık 15-20 adet siklopeptid toksine sahiptir. Bu toksinlerin içinde en iyi bilinenler: Amatoksinler (siklik oktapeptidler), Fallotoksinler (siklik heptapeptidler) ve Virotoksinler (siklik heptapeptidler)'dir (3). Tüm toksinler triptofan halkası ve indol halkası içerdiğinden kimyasal yapıları birbirine benzer fakat toksisite güçleri birbirinden farklıdır (15).

Fallotoksinler, bisiklik heptapeptidlerdir. Fallotoksinlerin, falloidin, falloin, profallin, fallisin, fallasin, fallasidin ve fallisinin olmak üzere 7 türü bulunmaktadır (15). Fallotoksinler, etkilerini hızla gösteren toksinlerdir. Oral yolla emilimleri azdır ve karaciğer üzerinde toksik etkileri sadece parenteral yolla uygulanmalarında gösterilmiştir (16). Fallotoksinler, *Amanita phalloides* türü mantarlarla zehirlenmelerde, erken dönemde ortaya çıkan diyare ve kusma gibi gastrointestinal semptomlardan sorumlu tutulmaktadır (17).

Virotoksinler, monosiklik peptidlerdir. Virotoksinlerin, alaviroidin, viroisin, deoksoviroisin, viroidin ve deoksoviroidin olmak üzere 5 türü bulunmaktadır (15). Yapısal ve biyolojik aktiviteleri fallotoksinlere benzer ve oral alım sonrası insanlarda ciddi toksisiteye neden olmazlar. Deneysel çalışmalarda, virotoksinlerin farelere intraperitoneal uygulandığında, hemorajik karaciğer nekrozuna neden olduğu gösterilmiştir (18).

Amatoksinler, bisiklik oktapeptidlerdir. Amatoksinlerin, α -amanitin, β -amanitin, γ -amanitin, ϵ -amanitin, amanin, amaninamid, amanullin, amanullinik asit ve proamanullin olmak üzere toplam 9 türü bulunmaktadır. Birbirlerinden hidroksil grup sayısı ve amid karbomil halka çeşitliliğiyle ayrılırlar (Tablo 1) (15). Amatoksinler hem karaciğer hem böbrek hem de santral sinir sistemi hasarı oluşturur ve siklopeptid yapıları toksinlerden en toksik olanlardır. α -Amanitin (α -AMA) ise karaciğer toksisitesinden sorumlu primer toksindir (3).

Tablo 1. Amatoksinlerin kimyasal yapısı

	R1	R2	R3	R4	R5
α-amanitin	CH ₂ OH	OH	NH ₂	OH	OH
β-amanitin	CH ₂ OH	OH	OH	OH	OH
γ-amanitin	CH ₃	OH	NH ₂	OH	OH
ϵ-amanitin	CH ₃	OH	OH	OH	OH
Amanin	CH ₂ OH	OH	OH	H	OH
Amanin amid	CH ₂ OH	OH	NH ₂	H	OH
Amanullin	CH ₃	H	NH ₂	OH	OH
Amanullik asit	CH ₃	H	OH	OH	OH
Proamanullin	CH ₃	H	NH ₂	OH	H

2.2.4 Alfa Amanitin (α -AMA)

2.2.4.1 Farmakokinetik Özellikler

Amanita phalloides türü mantar içeriğinde yer alan, karaciğer toksisitesine neden olan toksin α -Amanitin (α -AMA); yüksek ısıya, soğuğa, pişirilmeye, dondurulmaya, kurutulmaya dayanıklı ve stabildir (13). Gastrointestinal sistemden kolay absorbe olur (16, 19). Plazma proteinlerine bağlanmaz ve suda çözünür. Oral alımdan 90-120 dk sonra, absorpsiyonu tamamlanarak sistemik dolaşıma geçer ve hedef doku olan karaciğer ve böbrek dokularına ulaşarak 48. saatin sonunda plazmadan tamamen uzaklaşır.

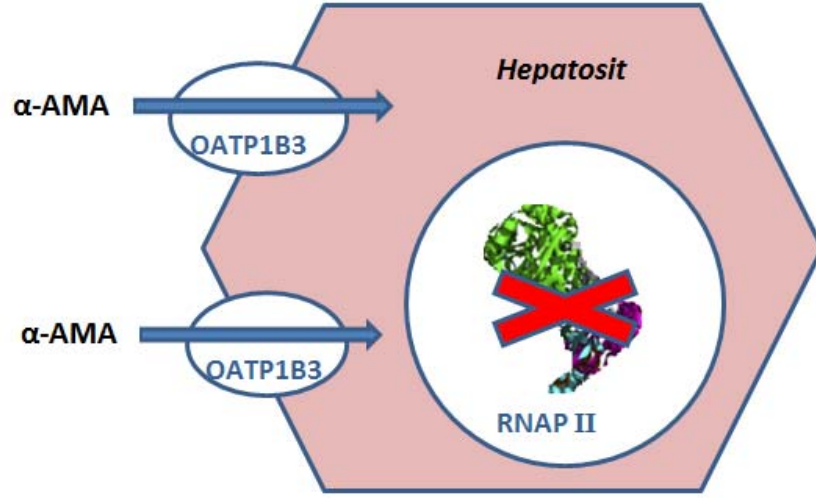
Toksin metabolize olmaz, küçük bir kısmı safra ile atılır. Enterohepatik dolaşıma katılır, bu karaciğer hücrelerinin toksine maruz kalım süresini uzatır (20). Toksinin büyük oranı ise böbrekler aracılığıyla idrarla atılır. α -AMA, oral yolla alımından 3-4 gün sonrasına dek, idrarda tespit edilebilir (21).

2.2.4.2 Toksik Doz ve Etki Mekanizması

α -AMA'nın letal dozu oral yolla alımlarda 0.1 mg/kg'dır (16). Bir mantar yaklaşık olarak 60 g olup, gramında 0.5-1.5 mg α -AMA içermektedir. Bu durumda, 70 kg ağırlığındaki bir yetişkinde tek bir mantarın yenilmesi bile öldürücü zehirlenmeye neden olabilir (22).

α -AMA'nın hedef hücresi, primer olarak karaciğer hücreleridir. α -AMA'ye bağlı zehirlenmelerde morbidite ve mortalitenin başlıca sorumlusu da karaciğer toksisitesidir. Ancak gastrointestinal sistem epitel hücreleri, böbrek proksimal tubul hücreleri de etkilenen diğer hücreler arasında yer alır (23, 24).

α -AMA, gastrointestinal sistemden emilip sistemik dolaşıma geçtikten hemen sonra hepatositlerin sinusoidal membranında yer alan organik anyon transporter peptid (OATP)1B3 adı verilen taşıyıcı proteinlerle hücre içine giriş yapar (25). Hücre içi toksisite mekanizmaları hakkında birçok araştırma yapılsa da bilinen en temel mekanizma, α -AMA'nın karaciğer hücresi nükleusunda yer alan RNA polimeraz II'yi inhibe ederek mRNA sentezi ve DNA transkripsiyonunu önlenmesidir (26). mRNA sentezlenmemesi sonucunda, karaciğer hücreleri gibi hücresel devri yüksek hücrelerde protein sentezi durur ve karaciğer hücre nekrozu gelişir (Şekil 3) (27).



Şekil 3. α -AMA'nın hücre içine transportu ve toksisite mekanizması

2.2.5. Klinik Bulgular

Amanita phalloides türü mantar zehirlenmeleri, klinik olarak dört evredir:

I.Evre (Latent dönem): Asemptomatik evredir. Mantarın alımından sonraki ilk 8-12 saat, hastada herhangi bir bulgu gözlenmez. Bu evrenin 6-40 saat arasında değişebildiği de bildirilmektedir (27, 28).

II.Evre (Gastrointestinal dönem): Bu evrede, sulu diyare, kolik tarzı karın ağrısı ve kusma gözlenir. Semptomlar, oral alımı takiben en erken 6-24 saatte başlar. Diyare, kanlı ve mukuslu olabilir. Bu durum, mantar zehirlenmesinden kuşulanılmazsa, viral gastroenterit ile karışabilir. Laboratuarda karaciğer enzimleri normaldir, fakat şiddetli diyareye sekonder elektrolit anormallikleri (hipokalemi, metabolik asidoz), akut böbrek yetmezliği, dehidratasyona bağlı hipovolemik şok görülebilir (29).

III.Evre (Sitotoksik dönem): Bu evrede, hastalarda gözlenen gastroenterit tablosu düzelir, karaciğer toksisitesinin biyokimyasal ve klinik belirtileri belirginleşir. Karaciğer enzimleri (AST, ALT), 24-36. saatler arasında yükselmeye başlar ve yaklaşık 60-72 saatler arasında en yüksek seviyeye ulaşır. Laboratuarda aynı zamanda hiperbilirubinemi, protrombin zamanında uzama ve dissemine intravasküler koagülopati bulguları görülür (29).

IV.Evre (Fulminan dönem): Bu evrede, mantar yenmesinden yaklaşık 2-4 gün sonra, karaciğer ve böbrek yetmezliği gelişir. Karaciğer hücrelerinde ölüm, karaciğer kan akımını bozar. Karaciğer yetmezliği nedeniyle, hipoglisemi, koagülopati, ensefalopati, nöbet, solunum yetmezliği, çoklu organ yetmezliği ve 7-15 gün içinde ölüm gerçekleşir (30).

2.2.6. Tanı

Amanita phalloides türü mantarlarla zehirlenmelerin tanısının konmasında; doğadan toplanmış mantar yeme öyküsü olması ve bulguların başlangıç zamanı zehirlenmeden şüphelendirir. Ancak, *Amanita phalloides* türü mantarlarla zehirlenmelerde, ilk olarak ortaya çıkan bulantı, kusma, karın ağrısı ve diyare *Amanita phalloides* türü mantarlarla zehirlenmelere spesifik değildir ve çoğu zaman bakteri, virus ya da toksik olmayan mantarlara bağlı gelişen gastroenteritlerden ayırılmalıdır. Bulguların özellikle mantar yenilmesini izleyen, ilk 6 saat içinde başlaması *Amanita phalloides* türü mantarlarla zehirlenme tanısından uzaklaştırırsa da toksik mantarı tamamen ekarte ettiremez. Çünkü, doğadan toplanmış mantarlar, içerisindeki tek bir toksik mantar bile, yiyen kişide ölümcül zehirlenmeye neden olabilir. Bu nedenle toksinin vücut sıvılarında erken ve hızlı tanısı için klinikte kullanılabilecek çeşitli kalitatif ve kantitatif yöntemler geliştirilmektedir. Rutinde kullanılsa da *Amanita phalloides* türü mantarın, karaciğer üzerine toksik olan toksini, α -AMA; plazma ya da serumda 30 saate dek, idrarda ise 72 saate kadar tespit edilebilmiştir (20, 31). Biyolojik sıvılarda toksin tespiti için radioimmunoassay (RIA), enzim işaretli immunosorbent assay (ELISA), kapiller elektroforez (CZE) ve ultraviyole ile kombine sıvı kromatografi (LC) gibi yöntemler yanlış pozitiflik oranı ve pratik olmayan laboratuvar prosedürlerinden dolayı klinik uygulamalarda rutin kullanılamamaktadır. Fakat sıvı kütle spektrofotometri (LC-MS/MS) yöntemi, günümüzde yüksek sensivite, spesifite oranı ile α -AMA'nın erken tanısını koymada klinik pratikte kullanıma aday hem kalitatif hem de kantitatif bir yöntemdir (32). Ancak şu an için klinik kullanımda olan rutin bir tanı testi yoktur. Mantarın bir mikolog tarafından değerlendirilmesi ya da kandan ya da idrardan toksinlerin ölçülmesi sıklıkla mümkün değildir. Bu nedenlerle, mantar zehirlenmelerinin ayırıcı tanısı, sıklıkla klinik bulgulara dayanır.

Yenebilen mantarlarla zehirli mantarların da kesin ayırıcı özellikleri yoktur. Halk tarafından zehirli mantarların çekici görünümde oldukları, pişirirken gümüş çatal batırıldığında kararmaları, yabani hayvanlar tarafından yenmemeleri, koparıldıklarında iç kısımlarının mavileşmesi ve belli bölgelerde yetişen mantarların zehirli olması gibi mantarları ayırmada kullanılan yöntemlerin ise bilimsel değeri bulunmamaktadır.

Doğadan toplayarak mantar yeme öyküsü olan, bulantı, kusma ve diyare gibi klinik bulguları geç ortaya çıkan hastalarda, *Amanita phalloides* türü mantarlarla zehirlenmeden şüphelenilmeli ve hastalardan geldikleri anda alınan kandan, karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri bakılmalı ve tetkikler 24. ve 48. saatlerde tekrarlanmalıdır.

2.2.7 Zehirlenmenin Tedavisi

Amanita phalloides türü mantarlarla zehirlenmelerde, α -AMA'nın gastrointestinal sistemden emiliminin azaltılabilmesi için dekontaminasyon yöntemlerinden mide yıkama ve aktif kömür uygulaması ilk 1 saat içerisinde önerilmektedir. Ancak toksin enterohepatik dolaşıma girdiğinden tekrarlayan dozda aktif kömür uygulamasının da tedavide yeri bulunmaktadır.

Antidot olarak, toksinin karaciğer hücresi tarafından tutulumunu engelleyen silibinin uygulaması ayrıca yüksek doz kristalize penisilin tedavi protokollerinde yer almaktadır (30). Ayrıca etanol, simetidin, N-asetilsistein (NAS), tiotik asit, steroidler de potansiyel tedavi seçeneklerindendir (33). Ancak özellikle hücre kültürü çalışmalarının sonuçları, toksinin hücreler tarafından tutulmasının erken dönemde olması nedeniyle karaciğer hücre hasarını önleyebilmek için tedaviye erken başlanması gerektiği bildirmektedir (34, 35).

Silibinin, *Amanita phalloides* türü mantar zehirlenmelerinde kullanılan antidottur. Silibinin, α -AMA'nın karaciğer hücresi tarafından tutulumunu, karaciğer hücresi üzerindeki bağlanma bölgesine bağlanarak inhibe eder ve toksinin enterohepatik sirkülasyonunu da önler (36, 37). Ayrıca, glutatyon depolarını da artırır, inflamasyonlu bölgede lökosit migrasyonunu azaltarak antiinflamatuvar etki de yapar (34, 38). 20-50 mg/kg/gün i.v. yolla 48-96 saat boyunca uygulanması önerilmektedir.

Penisilin G, yüksek dozda ve yüksek kan konsantrasyonlarında, OATP substratı olarak α -AMA'nın karaciğer hücresi tarafından alımını inhibe eder. α -AMA'ye bağlı zehirlenmelerde,

günlük 300.000- 1.000.000 U/kg i.v. infüzyon ile uygulanması önerilir. Yüksek doz beta laktamların DNA polimeraz alfa inhibisyonu ile ökaryotik hücre proliferasyonu ve GABA üretimini azaltarak da hepatik hasarı önleyebileceği bildirilmektedir (39).

N-asetilsistein (NAS), glutatyon donörüdür. *Amanita phalloides* türü mantarlarla zehirlenmelerde, ilk 60 dakika içinde, 150 mg/kg infüzyon, ardından 4 saat boyunca 50 mg/kg infüzyon ve hasta klinik olarak iyileşene dek 6.25 mg/kg/saat'lik infüzyon ile uygulanabilir. Ancak etkililiği ile ilgili yeterince kanıt yoktur (40).

Tioktik asit, çeşitli çalışmalarda özellikle lipid peroksidasyonunu önlemesi ile ortaya çıkan, antioksidan etkisi ile *Amanita phalloides* türü mantarlar zehirlenmelerinin tedavisinde kullanılmıştır (41). Zehirlenmeden sonraki ilk bir saat içerisinde, 150 mg/kg infüzyon, ardından 4 saat boyunca 50 mg uygulanması önerilmektedir. Sonrasında da 6 saate bir 50-150 mg dozunda uygulanmaktadır. Çeşitli çalışmalarda, mortaliteyi azalttığı gösterilmiş olmasına karşın, bu tür mantarlarla zehirlenmelerde kullanımları ile ilgili yeterli kanıtlar yoktur ve hipoglisemiye neden olması kullanımını kısıtlamaktadır(40).

2.3 Karaciğer Toksisitesi

Karaciğer, ksenobiyotiklerin ve toksinlerin metabolize yani detoksifiye olduğu primer organdır ve gastrointestinal sistem aracılığıyla alınan tüm maddeler portal ven aracılığıyla karaciğere gelir (42). Karaciğer toksisitesine neden olan ilaçlar, endüstriyel maddeler, bitkisel ürünler dahil olmak üzere pek çok kimyasal ve biyolojik etken ortak olarak hepatotoksin olarak isimlendirilir. Karaciğerin rejenerasyon kapasitesi yüksek olmasına rağmen, hepatotoksinler karaciğer hücrelerinde nekroz ya da apoptozise neden olabilir (43).

Karaciğer toksisitesi, ilaçlar ya da ksenobiyotiklere bağlı oluşan karaciğer disfonksiyonu ve hasarıdır. Klinikte karaciğer toksisitesi, serum alanin transaminaz (ALT) düzeyinin 3 kat veya daha fazla artması ve/veya total bilirubin düzeyinin üst sınırının 2 kat veya daha fazla artış göstermesi ve ile tanınır (44). Karaciğer toksisitesi, klinik olarak; asemptomatik olabilir ya da kolestaz, steatoz, akut karaciğer nekrozu ve fulminan karaciğer yetmezliğine kadar gidebilir. Klinik tablonun değişkenliğinin temel nedeni, hepatotoksinlerin ve altta yatan patofizyolojik mekanizmaların çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır.

Karaciğer toksisitesi, nekroz, steatoz ve kolestaz olmak üzere üç şekilde meydana gelir. En sık karşılaşılan karaciğer toksisitesi tipi ise, karaciğer nekrozudur. Pek çok ilaç ve toksik madde, karaciğerde nekroza neden olabilmektedir. Hatta gelişen karaciğer toksisitelerinin yaklaşık yarısından akut karaciğer nekrozu sorumludur. Siroz, fibrozis ve venooklüziv hasar da diğer karaciğer toksisite tipleri arasındadır (Tablo 2) (42).

Tablo 2. Karaciğer toksisitesine neden olan etkenler ve etki mekanizmaları

Karaciğer toksisite tipi	Karaciğer toksisitesine neden olan etkenler
Akut nekroz	Parasetamol, <i>Amanita phalloides</i> , karbon tetraklorür, dantrolen, diklofenak, halotan, demir, izoniazid, ketokonazol, metildopa, minosiklin, nitrofurantoin, pirazinamid, fenitoin, tetrasiklin, troglitazon, valproik asit
Kolestaz	Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri, amoksisilin klavulonik asit, anabolik steroidler, atorvastatin, azatioprin, beta laktam antiyotikler, bosentan, bupropion, karbamazepin, klorpromazin, klopidoğrel, eritromisin, östrojen, fosinopril, irbersartan, mirtazapin, fenotiazin, fenitoin, sülfonamidler, terbinafin, trisiklik antidepresanlar
Steatoz	
Mikroveziküler	Aflatoxin, fialuridin, hipoglisin, nükleozid inhibitörleri, tetrasiklin, valproik asid
Makroveziküler	Amiodoron, tamoksifen
Siroz, fibrozis	Amiodaron, etanol, metotreksat, metildopa, A vitamini
Venooklüziv hasar	Busulfan, siklofosamid, oral kontraseptifler, üretan

2.3.1. Oksidatif Stres

Karaciğer toksisitesinin altında yatan en önemli mekanizmalardan biri de oksidatif strestir. Oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması şeklinde tanımlanan oksidatif stres; kanser, nörolojik bozukluklar, ateroskleroz, hipertansiyon, iskemi-

perfüzyon patolojileri, diyabet, akut respiratuvar distres sendromu, astım gibi birçok durumun patofizyolojisinde rol alır.

Serbest oksijen radikalleri (SOR), canlılarda normal hücresel metabolizma sonucu ortaya çıkar ve fizyolojik süreçlere katkıda bulunur. Ancak, yüksek konsantrasyonlarda hücrelerin protein, lipid ve DNA gibi komponentlerinde değişikliklere neden olur (45).

Aerobik canlılar SOR'un kötü etkilerine karşı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan sistemlerle donatılmışlardır. Fakat patolojik durumlarda bu sistemler devre dışı kalıp hücreyi savunmasız bırakabilmektedir.

2.3.1.1 Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)

SOR; serbest radikaller ve nonradikaller olmak üzere 2'ye ayrılır.

Serbest radikal: Molekülünde 1 veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan ve karşılaştığı moleküle reaktivite özelliği kazandıran yüksek enerjili moleküldür. Serbest radikaller, hücre metabolizmasında enerji üretimi için gerekli olan birçok reaksiyon sonucu ortaya çıkmaktadır.

Nonradikal: Kararlı yapıda bulunan, eşleşmemiş elektronu bulunmayan, diğer moleküllerle serbest radikallerden daha zayıf reaksiyona giren moleküllerdir.

Hem serbest radikal hem de nonradikal olan birçok SOR olmasına karşın, canlı fizyopatolojisinde önemli etkilere neden olan SOR'leri; süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleridir.

Süperoksit anyonu

Süperoksit anyonu; aerobik organizmalarda, moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir. Fizyolojik koşullarda, elektronlar, mitokondri membranı boyunca elektron transport zinciri aracılığıyla transport edilir ve transport sonucu oksijen suya dönüşür. Elektron miktarının fazla olduğu iç mitokondri zarında, ksantin oksidaz, NADPH oksidaz enzimleri aracılığıyla süperoksit anyonu oluşturulur. Süperoksit anyonu, polimorfonükleer hücrelerde ve makrofajlarda bakterisidal etkilidir.

Süperoksitler, süperoksit dismutaz enzimi ile hidrojen peroksit'e dönüşür. Sonrasında Haber Weiss ve Fenton reaksiyonları ile hidrojen peroksit, demir (Fe^{+2}) ve bakır (Cu^{+3}) aracılığıyla hidroksil radikallerine dönüşür (45).

Hidrojen peroksit

Hidrojen peroksit, granülositik enzimler olan eozinofil peroksidaz ve myeloperoksidaz aracılığıyla oluşur. Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin (Fenton reaksiyonu) ve süperoksit radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) varlığında (Haber-Weiss reaksiyonu) güçlü bir radikal olan hidroksil radikalini ($OH^{\cdot}$) meydana gelir. Hidrojen peroksit, süperoksit radikalinden farklı olarak yağda çözünür ve oluştuğu yerden uzaktaki Fe^{2+} içeren hücresel membranlarda da hasar oluşturabilir (46).

Hidroksil radikalleri

Hidroksil radikalleri, hidrojen peroksitten ve metallerin Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonu ile tepkimeye girmesi sonucu oluşan, SOR arasında en potent radikallerdir. Çok güçlü oldukları için, karşılaştıkları çeşitli moleküllerden bir proton koparması sonucu yeni radikaller oluşturarak hücrede hasar meydana getirirler (47).

2.3.1.2 Eksojen Oksidanlar

Sigara içimi: Sigara süperoksit ve nitrik oksit gibi birçok oksidan ve serbest radikal içerir. Ek olarak sigara dumanı inhalasyonu, akciğerlerde nötrofil ve makrofajların akümüle ettiği ve oksidan hasar oluşturduğu endojen mekanizmaları aktive eder.

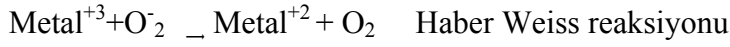
Ozon maruziyeti: Ozon inhalasyonu, solunum yolu epitelinde nötrofilleri aktivasyonuna ve inflamatuvar sitokinlerin salınmasına neden olur. Bu durum, oksijen redüksiyonunun artmasına ve SOR artışına neden olur.

Hiperoksijenizasyon: Metabolizma sonucu SOR ürünlerinin artışına neden olur.

İyonize radyasyon: Oksijen varlığında, oksijen ile tepkimeye girerek, hidroksil, süperoksit, hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlere dönüştürür.

Ağır metaller: Özellikle demir, bakır, kadmiyum, civa, kurşun, arsenik gibi ağır metaller, SOR miktarında artma ile hücrenin lipid ve nükleer proteinlerine zarar verirler.

Fenton ve Haber Weiss reaksiyonu ile süperoksit ve hidrojen peroksitle reaksiyona girip hidroksil iyonu meydana getirirler.



2.3.1.2 Antioksidanlar

SOR'nin, hücre sel yapıları vereceği hasarı engellemede görevli savunma mekanizmaları arasında, antioksidanların enzimatik ya da nonenzimatik yolla etki göstermesi önemli bir rol oynar. Bu antioksidan moleküllerin etki mekanizmaları:

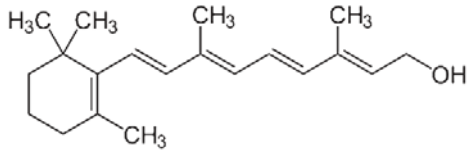
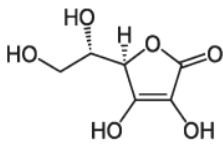
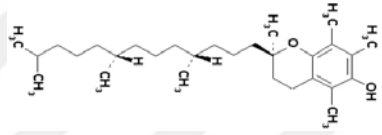
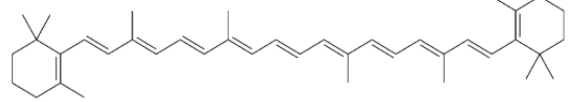
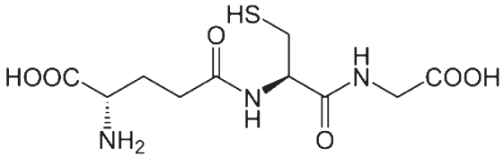
- Oksijenin ortamdan uzaklaştırılması veya konsantrasyonunun azaltılması.
- Serbest radikallerle reaksiyona girebilecek metal iyonlarının ortamdan uzaklaştırılması.
- Serbest radikal hasarına yol açan zincirleme reaksiyonların başlamasının engellenmesidir.

Antioksidanlar, enzimatik ve nonenzimatik olmak üzere 2 grupta sınıflandırılırlar. Enzimatik antioksidan moleküllerin çeşitleri ve özellikleri Tablo 3'de yer almaktadır. Enzim olmayan başlıca antioksidanlar Tablo 4'de yer almaktadır.

Tablo 3. Enzimatik antioksidanlar

ENZİMATİK ANTIOKSİDANLAR	KISALTMA	KATALİZLEDİĞİ REAKSİYON	
Süperoksit dismutaz	SOD	$M^{n+1}-SOD + O_2^- \rightarrow M^{n+}-SOD + O_2$ $M^{n+1}-SOD + O_2^- + 2H^+ \rightarrow M^{n+}-SOD + H_2O_2$	Süperoksit radikalini temizler
Katalaz	CAT	$2 H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2 H_2O$	H_2O_2 ' i yüksek konsantrasyonda ise temizler
Glutatyon peroksidaz	GPx	$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2 H_2O$	H_2O_2 ' i düşük konsantrasyonda ise temizler
Tioredoksin	TRX	$AMP + \text{sülfit} + TRX \rightarrow 5'-\text{adenilil sülfat} + TRX$	
Peroksiredoxin	PRX	$2 R-SH + ROOH = R-S-S-R + H_2O + ROH$	
Glutatyon transferaz	GST	$RX + GSH = HX + R-S-GSH$	
Sitokrom oksidaz	CYT	Oksidatif fosforilasyon elektron transport zinciri	Oksijenin suya indirgenmesi sırasında aktif oksijenin ortama salınımını engellerek SOR oluşumunu engeller.
GSH: Redükte glutatyon, GSSG: Okside glutatyon			

Tablo 4. Enzim olmayan antioksidanlar

KİMYASAL ADI	YAPISI	
Vitamin A	Trans retinol 2 	Yağda çözünür. Hidroksil radikallerini (OH [•]) temizler
Vitamin C	Askorbik asit 	Suda çözünür. Hem intra hem ekstraselüler düzeyde SOR'ni nötralize eder. Yaşlanmayla plazma düzeyiazalır.
Vitamin E	Tokoferol 	Yağda çözünür. Lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan peroksi radikallerine e ⁻ verir. Kanser hücrelerinin apoptozisini artırır ve radikal oluşumunu önler.
Karoten	Beta karoten 	Bitkilerde yer alan pigmentlerdir. Yağda çözünür peroksi radikalleri ile süperoksit radikalini temizler. Oksidanların indüklediği ,NF-κB, IL-6, TNF-α üretimini inhibe eder.
Glutatyon	Glutatyon 	Majör antioksidandır. GSH/GSSG oranı oksidatif stresin majör belirleyicisidir. Antioksidan etkisini birçok yolla gösterir.

Çeşitli toksik etkenlere bağlı gelişen oksidatif stres, farklı mekanizmalarla vücutta doku ve organlarda pek çok hasara neden olur

-DNA hasarı

Oksidatif stres nedeniyle gelişen DNA hasarı, başta kanser olmak üzere birçok hastalığın patogeneğinde önemli rol oynar. SOR'ne bağlı DNA hasarı, tekli veya çiftli DNA kırıkları,

pürin-pirimidin bazlarında mutasyonlar, modifikasyonlar, delesyon ve translokasyon gibi mekanizmalarla gerçekleşir.

-Lipid peroksidasyonu

Oksidatif strese bağlı gelişen lipid peroksidasyonu, hücre membranında yer alan reseptör ve enzimlerin inaktivasyonuna yol açarak hücre permabilitesinin artmasına neden olur. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA) veya doymamış aldehytler birçok intraselüler proteini inaktive ederler (Şekil 4).

-Protein yapılarında konformasyonel değişiklikler

SOR, hücre içi proteinler üzerinde reversibl veya irreversibl oksidatif modifikasyona yol açarak oksidatif hasar oluştururlar. Bu modifikasyonlar peptid zincirinin parçalanması, protein yüzeyindeki elektrik yükünün değişmesi, çapraz bağların değişmesi, proteinlerde konformasyonel değişikliklerdir. Sonuç olarak bu değişiklikler, protein yapılarında bozulma ile protein yapıların proteazlara duyarlılığını artırır. Sistein ve metionin en duyarlı aminoasitlerdir (48, 49).

-Sinyal iletiminde değişiklikler

SOR, sinyal iletimi ile ilişkili birçok genin indüksiyonuna neden olabilir. Yüksek glutatyon/okside glutatyon (GSH/GSSG) oranı, hücreyi oksidatif hasardan koruyan önemli bir faktördür. Bu oranın ters dönmesi inflamatuvar yanıtta rol oynayan indirgenme duyarlı nükleer faktör kappa B, hipoksi indükleyici faktör 1 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna yol açar ve böylece hücre dışından içine doğru sinyal akımı başlar (50).

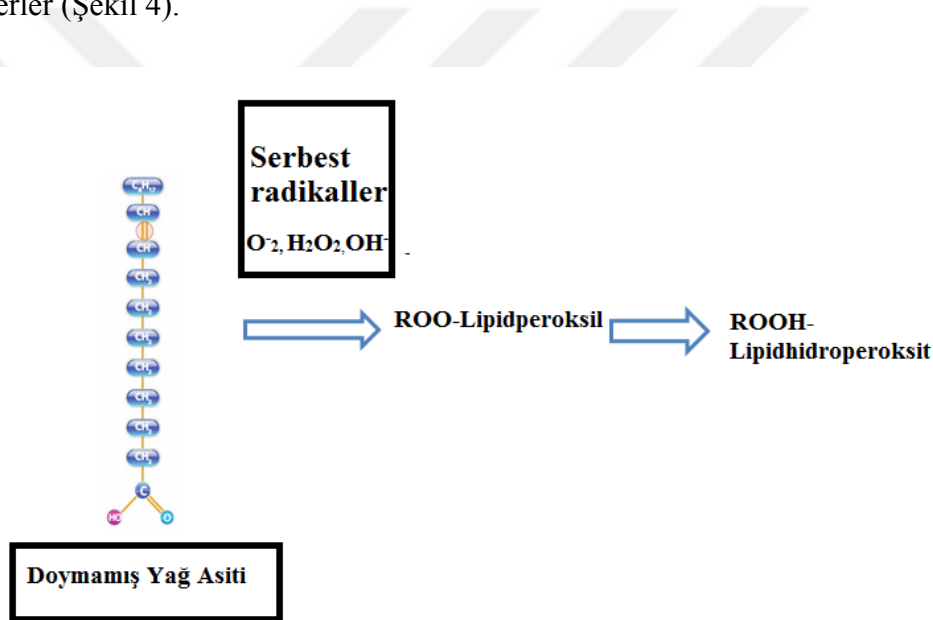
2.3.1.4 Oksidatif Stres DNA Hasarı-

SOR'ne bağlı, artan oksidatif stres nedeniyle oluşan DNA hasarı, başta kanser olmak üzere birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynar. Bu DNA hasarı, tekli veya çiftli DNA kırıkları, pürin-pirimidin bazlarında mutasyonlar, modifikasyonlar, delesyon ve translokasyon gibi birçok mekanizmayla gerçekleşir. Tekli DNA kırıkları hücre tarafından tolere edilebilirken özellikle iyonize radyasyonun neden olduğu çiftli kırıklar hücre canlılığı için tehliktir. DNA'daki bu modifikasyonların sonucu olarak, yaşlanma karsinogenez, nörodejeneratif ve otoimmün hastalıkların geliştiğine dair bilgiler literatürde yer almaktadır.

(51). Oksidatif stres mikrosatellit bölgelerin (ardışık kısa tekrar bölgeleri) instabilizasyonuna neden olur. Aktif metal iyonları, hidroksil radikalleri en sık etkenlerdir. Reaktif radikallerin DNA’da yol açtığı hasar sonucu oluşan ürünler, başta gaz kromatografisi (GC) ve yüksek basınçlı likit kromatografisi (HPLC) olmak üzere ELISA (enzim işaretli immunosorban analizi) yöntemi gibi çeşitli yöntemlerle belirlenebilir (46).

2.3.1.5 Oksidatif Stresin Lipidler Üzerindeki Etkisi

SOR, lipid peroksidasyonu aracılığıyla hücre membranında yer alan reseptör ve enzimlerin inaktivasyonuna yol açarak hücre permabilitesinin artmasına neden olur. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA veya doymamış aldehitler birçok intraselüler proteini inaktive ederler (Şekil 4).



Şekil 4. Lipid peroksidasyon oluşumu

2.3.1.6 Oksidatif Stresin Protein Yapılar Üzerine Etkisi

SOR, hücre içi proteinler üzerinde reversibl veya irreversibl oksidatif modifikasyona yol açarak oksidatif hasar oluştururlar. Bu modifikasyonlar peptid zincirinin parçalanması, protein yüzeyindeki elektrik yükünün değişmesi, çapraz bağların değişmesi, proteinlerde konformasyonel değişikliklerdir. Sonuç olarak bu değişiklikler protein açılımına ve bozunumuna yol açarak protein yapıların proteazlara duyarlılığını artırır. Sistein ve metionin

en duyarlı aminoasitlerdir (48, 49). Protein karbonilasyonu ve tirozin nitasyonu geridönüşümsüz oksidatif modifikasyonlar olup sistein modifikasyonların geridönüşümlü

modifikasyonlardır. Oksidatif stres sonucu oluşan protein karbonil deriveleri protein oksidasyonunun en yaygın kullanılan belirteci olup hastalıklar sonucunda oluşan oksidatif stresi değerlendirmede kullanılır. Ölçüm yöntemlerinin çoğu karbonil grupların 2,4-Dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile derivatizasyonu sonucu dinitrofenol (DNP) oluşumuna dayalıdır. Son ürün spektrofotometrik, ELİSA ve Western Blotting gibi yöntemlerle ölçülebilir (46).

2.3.2 Oksidatif Stres ve Karaciğer

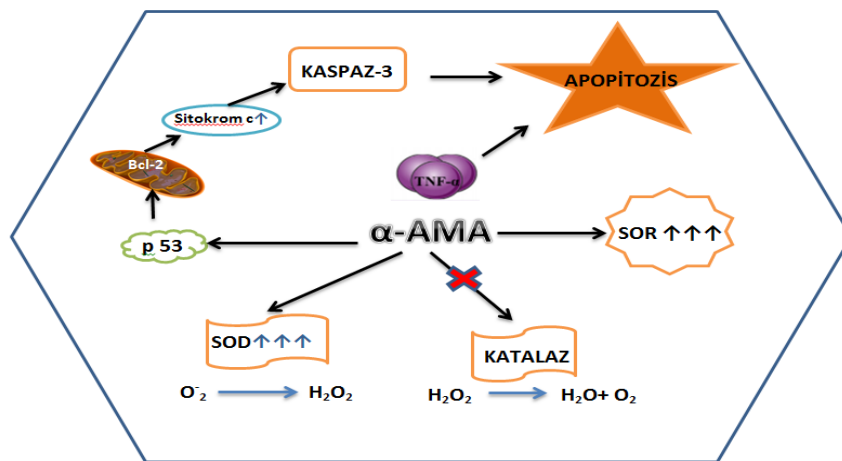
Hepatositler sürekli olarak SOR üretirler. Ayrıca karaciğerdeki nonparenkimal hücreler, Kupffer hücreleri, endotelyal hücreler, polimorfonükleer lökositler ve makrofajlar da indirgenmiş oksijen ürünleri ve nitroradikal üretebilirler. Sağlıklı kişilerde, karaciğer hücreleri, oksidanları belirli bir konsantrasyonda tutarak vücuda zarar vermesini engelleyecek düzeyde antioksidan kapasiteye sahiptir. Bu antioksidan kapasiteye örnek olarak, C ve E vitaminleri, metal sekestrasyonuna yardımcı olan ferritin, lipid peroksidazları detoksifiye eden glutatyon peroksidaz, tiol zengin peptidlerin en önemli örneği olan glutatyon verilebilir. Glutatyon, oksidanlarla reaksiyona giren majör enzimlerin kofaktörü olarak görev yapar. Karaciğer, hücrenin en önemli antioksidanı olan glutatyonun temel olarak sentezlendiği organdır.

2.3.3 Akut Karaciğer Nekrozu

Karaciğer toksisitelerinin yaklaşık yarısından, akut karaciğer nekrozu sorumludur. Akut karaciğer nekrozunda; karaciğer hücrelerinde, hücre membranının rüptüre olması ile salınan hücresel içeriğe yanıt olarak masif inflamatuvar reaksiyon gelişir. Histomorfolojik olarak ise, karaciğerde; inflamasyon, balonlaşmış hepatositler, sinüzoidal genişlemeler görülür (52). Nekrozun büyüklüğü ile orantılı olarak, karaciğer fonksiyonları kısmen ya da tamamen ortadan kaybolabilir. Akut karaciğer nekrozuna en sık neden olan etkenler; toksinlerden, parasetamol, *Amanita phalloides* gibi siklopeptid içeren mantarlar, CCl₄ gibi uçucu hidrokarbonlar ve izoniaziddir (42).

2.3.3.1 α -AMA'e Bağlı Karaciğer Nekrozu

α -AMA, karaciğer nekrozu yapan toksik etkenler arasında önemli bir yere sahiptir. α -AMA ile karaciğer nekrozu gelişimi, pek çok deneysel araştırmada gösterilmiştir. α -AMA'nın karaciğer nekrozunun oluşum sürecindeki en bilinen mekanizması hepatositlerde RNA polimeraz II'ye bağlanarak inaktif hale getirmesi ve hücre canlılığının devamı için gereken proteinlerin sentezinin olmazsa olmazı mRNA sentezinin bozulmasıdır. Bu sentezin bozulması direk hücre ölümüne neden olur (5). Hepatositler de, SOR miktarını artırarak nekroz veya apoptozis sürecini başlatır. Dündar ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada, α -AMA toksisitesinin oksidatif stres biyobelirteçlerinin üzerindeki etkisi araştırılmış ve özellikle maruz kalınan toksinin dozu arttıkça SOD, MDA gibi oksidatif stres parametrelerinde anlamlı oranda artış tespit edilmiştir (53). Bu artış, α -AMA'e bağlı artan dozlarda gelişen karaciğer nekrozu ile de orantılı bulunmuştur. *In vitro* çalışmalar, α -AMA maruziyetine bağlı gelişen karaciğer toksisitesinde, α -AMA'nın TNF- α 'ya sinerjistik etkisi ile apoptozisi indüklemesi, SOR artışı nedeniyle oksidatif stres oluşturmasını sorumlu tutmaktadır (52, 54). Oksidatif stres gelişimi ile, süperoksit dismutaz (SOD) ve malonildialdehit (MDA) artışı ve katalaz düzeyinde düşme gözlenmektedir (Şekil 5) (54). α -AMA ile gelişen karaciğer toksisitesinin histomorfolojik bulguları ise yağlı dejenerasyon, sentrilobuler nekroz ve hemorajidir (10). Hücresel düzeyde oluşan nekroz ve/veya apoptozis süreci α -AMA'nın klinik bulgularının geç ortaya çıkmasına neden olmaktadır.-



Şekil 5. α -AMA'nın oksidatif hasar oluşturma mekanizması (SOD: süperoksit dismutaz, SOR:serbest oksijen radikalleri)

2.3.4 Hücre Kültürü Çalışmalarında α -AMA

Hepatosit hücre kültürlerinde, α -AMA maruziyetinden 24-48 saat sonra, hücre canlılığında azalma gösterilmiş ve α -AMA'nın hepatosit hücre kültürlerinde 12 saat içerisinde hepatositler tarafından tutulumunun gerçekleştiği bildirilmiştir (35, 55). Hücre kültürü çalışmalarında, silibinin, N-asetilsistein ve benzilpenisilinin hepatosit hücre canlılığında artmaya neden olduğu, rifampisin ve seftazidimin ise hücre canlılığını artırmadığı gösterilmiştir (35).

Primer köpek hepatosit hücre kültürlerinde de 12 saat boyunca α -AMA maruziyetinin, α -AMA konsantrasyonu ve maruz kalınan süre ile orantılı şekilde hücre canlılığında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Bir başka çalışmada da insan karaciğer hücre kültüründe, apoptozisin α -AMA'ye bağlı karaciğer toksisitesinde rolü olduğu ve apoptozisin programlı hücre ölümünde önemli rolü olan ve apoptotik belirteç olarak kabul edilen kaspaz enzimlerinden kaspaz-3 bağımlı olduğu da gösterilmiştir (56). Apoptozisin özellikle 6 saatlik maruziyet sonrasında belirgin olduğu bildirilse de (56), köpek karaciğer hücre kültürlerinde apoptozis ve nekrozun eş zamanlı olarak α -AMA'ye maruz kalınan süre ve konsantrasyon ile orantılı şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir (24).

Hücre kültürü ile yapılmış çalışmalarda, α -AMA'nın, lipid peroksidasyonunu, SOD düzeyini artırdığı ve katalaz düzeyini düşürdüğü bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, silibininin lipid peroksidasyonu üzerine olumlu etkileri gözlenirken benzilpenisilinde benzer etki gözlenmemiştir. NAS ve benzilpenisilinin insan karaciğer hücre kültüründe yaşayan hücre sayısını artırdığı ve apoptozisi azalttığı gösterilmiştir (38). Dolayısı ile hücre kültüründe, α -AMA ile karaciğer hücrelerinde ölüm gözlemlendiği ve çeşitli tedavilerinde erken dönemde uygulandığında etkili olduğu göze çarpmaktadır.

2.4 Resveratrol

Resveratrol non-flavanoid stilben içeren polifenolik yapıda bir bileşik olup kimyasal adı *trans-3,4,5,-trihidroksistilben*'dir (57). Resveratrolün cis ve trans olmak üzere 2 kimyasal konfigürasyonu vardır ve ultraviyole ışını ile trans formu cis formuna dönüşmektedir (58). Doğal fenol ve fitoleksin yapıda olan resveratrol, başta kırmızı üzüm olmak üzere yer fıstığı, çam ve baklagiller dahil doğada yaklaşık 72 adet bitkide bulunmaktadır (59). Geleneksel

Japon ve Çin tıbbında *Polygonum cuspidatum* kurutulmuş kökleri kalp, karaciğer ve cilt hastalıklarını tedavide kullanılmıştır. Resveratrol ilk kez 1939 yılında *Veratrum grandiflorum* adlı bitki kökünden elde edilmiştir ve resveratrol adı bu bitki türünün içerdiği resorsinol adlı maddenin isminden türetilmiştir (58, 60).- Fakat resveratrolün esas popularitesi, 1992’de “Fransız paradoksu” adı verilen Fransız mutfağının yüksek miktarda doymuş yağ içerikli olmasına ve yoğun sigara tüketimine rağmen özellikle Bordeaux bölgesinde yaşayan kesiminde, kalp hastalıklarının yok denecek kadar az görülmesinin bilim adamları tarafından gözlemlenmesi sonucu artmıştır (61). Bordeaux bölgesinin rutubetli havasında yetişen “cabernet sauvignon” cinsi üzümlerin kabuğunda oluşan küf mantarı olan *Botrytis cinerea* enfeksiyonu nedeniyle aşırı miktarda resveratrol sentezlenir. Beyaz şarap yapımında bu üzümlerin kabukları fermente edilmediğinden sadece kırmızı şarapta tespit edilebilecek miktarda resveratrol bulunur (62).

2.4.1 Resveratrolün Farmakokinetik Özellikleri

Absorbsiyon

Resveratrolün suda çözünürlüğü düşüktür. Lipofilik olduğundan, gastrointestinal sistemden yüksek oranda emilir. Resveratrolün hidroksil grubuyla birleştirilmesi sonucu intestinal absorpsiyonu artar (63, 64). İntegrin adı verilen taşıyıcılarla bağırsaktan pasif difüzyon ile emilir. Biyoyararlanımı ise düşüktür. Düşük biyoyararlanımına rağmen *in vivo* çalışmalarda etkili bulunması, enterohepatik dolaşım aracılığıyla ince bağırsaklardan reabsorpsiyonu ile karaciğer gibi hedef dokularda sülfat ve glukronid konjugasyonlarına dönüşümü olduğu düşünülmektedir(64)

Dağılım

Serbest formu, albumin ve LDL’ye (düşük dansiteli protein) bağlanarak hücre membranında özelleşmiş reseptörler aracılığıyla serbestleşir ve hücre içine girer (65). *In vivo* ve *in vitro* çalışmalarda trans resveratrolün % 90 dan fazlasının insan plasma lipoproteinlerine bağlandığı gösterilmiştir (66, 67). Yağ asitleri lipofilik ortamı sağlayarak resveratrolün karaciğer hücrelerinde yer alan özel transmembran taşıyıcı proteinlerine yüksek afinite göstermesine aracılık eder (68).

Metabolizma

Resveratrol, karaciğerde metabolize olur ve enterohepatik dolaşıma girer. Kendi metabolizmasını faz 2 hepatik detoksifikasyon enzimlerinin aktivitesini artırarak indükleyen resveratrol, karaciğerde sülfat ile glukronik asit ile konjuge olur (64, 69).

Atılım

Resveratrol her ne kadar lipofilik yapıda olsa da hidrofilik bileşikler gibi metabolitleri böbrekler aracılığıyla vücuttan atılır. Az bir oranı ise enterohepatik sirkülasyona girmesinden dolayı feçes yoluyla atılır.

Resveratrolün farmakokinetik özelliklerinin araştırıldığı çalışmalarda, yarılanma ömrünün sıçanlarda i.v. farklı dozlarda uygulamada 168-647 dakika arasında olduğu bildirilmiştir (70). Farelerde yapılan *in vivo* bir çalışmada ise resveratrolün intraarteriyel 60 mg/kg uygulandığında yarılanma ömrü 109.75 ± 22.90 dakika, başka bir çalışmada da 15 mg/kg dozda intraarteriyel uygulandığında 201.2 ± 158.12 dakika olarak saptanmıştır (71). Resveratrolün trans analogu ile ilgili sıçanlarda yapılmış *in vivo* akut toksisite çalışmalarında, 50, 150, 500 mg/kg/gün 28 günlük uygulamalarında ve kronik toksisite çalışmalarında da 700 mg/kg/gün dozun üzerinde 90 günlük uygulamada herhangi bir yan etkiye neden olmadığı ve güvenli olduğu bildirilmektedir (72). Yapılan klinik çalışmalarda erişkinlerde trans-resveratrolün günlük tolere edilen dozu 1 ay boyunca 5 g/gün olduğu belirtilmiş fakat 1g/gün üstü dozlarda resveratrol CYP2C9 inhibe ettiği dolayısıyla bu enzimle metabolize edilen ilaçlarla etkileşebileceği bildirilmiştir (73).

2.4.2 Resveratrolün Etki Mekanizması

Resveratrolün şimdiye kadar yapılan çalışmalarda gösterilen antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser özelliğinin altında yatan en önemli mekanizma oksidatif strese karşı olan güçlü koruyucu etkisi olsa da moleküler düzeyde birçok sinyal yolları ile olan ilişkisi günümüzde popüler araştırma konularındandır (57, 62).

Resveratrolün karaciğer toksisitesini önleyici veya iyileştirici etkisinin altındaki mekanizmalar aşağıda yer almaktadır:

1. SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin sentezini artırarak serbest oksijen radikallerini hücreden temizlemesi ile gösterdiği antioksidan etki,
2. TNF- α 'yı baskılayarak gösterdiği antiinflamatuvar etki,
3. Mitokondriyal metabolizma, glukoneogenez ve lipid metabolizması gibi karaciğer hücre fonksiyonlarda kritik önemi olan peroksizom-proliferatör-aktif reseptör γ ko-aktivatörü-1 α 'nın aktivasyonu,
4. Hücre büyümesinde görev alan birçok transkripsiyonel reseptör faktörleriyle etkileşim halinde olan, AMP-ilişkili kinaz ve sirtuin 1 sensörlerinin aktivasyonu,
5. Ksenobiyotiklerin hepatik metabolizmasında Faz 1 ve 2 enzimlerinin inhibisyon/indüksiyonu yoluyla detoksifiye edilmesi.

Literatürde, resveratrolün çeşitli ajanlara bağlı karaciğer toksisitesini önleme ve iyileştirmesi üzerine çok sayıda çalışma bulunmaktadır:

2.4.3 Parasetamole Bağlı Karaciğer Toksisitesinde Resveratrol:

Resveratrolün parasetamole (APAP) bağlı karaciğer toksisitesini önleyici etkilerine dair pek çok deneysel çalışma bulunmaktadır. Farelerde, 3 gün boyunca, üç farklı dozda oral resveratrol tedavisi sonrasında, 400 mg/kg APAP ile oluşturulan karaciğer toksisitesi modelinde, resveratrolün; CYP2E1, CYP3A11 ve CYP1A2 enzimlerini inhibe ederek APAP'ın toksik metaboliti olan *N*-asetil-*p*-benzokinamin (NAPQI)'e biyotransformasyonunu engellediği ve dolayısıyla karaciğer toksisitesini önemli oranda engellediği gösterilmiştir (74). Şener ve arkadaşlarının 2006 yılında Balb-c farelerle yaptığı *in vivo* çalışmada ise, parasetamol toksisitesi (900mg/kg i.p) oluşturularak hemen sonrasında resveratrol (30 mg/kg i.p.) uygulandığında, APAP toksisitesine bağlı artan TNF- α ve azalan MDA, myeloperoksidaz (MPO) ve glutatyon seviyeleri resveratrol tedavisi sonrası kontrol düzeylerine dönmüştür. (75).

2.4.4 CCl₄ Bağlı Karaciğer Toksisitesinde Resveratrol:

Karbontetraklorür (CCl₄), karaciğer hücrelerinde, lipid peroksidasyonu oluşturarak hücre membran yapısını ve hücre içi dengeyi bozarak ölüme neden olan bir maddedir (76). Resveratrol, farelerde oluşturulan CCl₄ karaciğer toksisitesinde, oksidatif hasara bağlı gelişen

apoptozisi kaspaz 8 ve aktive kaspaz 3 ekspresyonunu azaltarak engellemiş ve proinflatuar sitokinler olan TNF- α ve IL-6'yı azalttığı gösterilmiştir. Histomorfolojik incelemede, resveratrol, oluşan sentrilobuler nekroz alanını da küçültmüştür (77).

2.4.5 Alkole Bağlı Karaciğer Toksisitesinde Resveratrol:

Alkol metabolizması sonucu ortaya çıkan metabolitler hücre içi SOR'nin artmasına, oksidatif stress gelişimi ile karaciğer hasarının ortaya çıkmasına neden olur. (78). Resveratrolün alkole bağlı karaciğer toksisitesinden de koruyucu etkisi gösterilmiştir. Balb/c farelerde, etanole bağlı gelişen karaciğer hasarında, 35 gün boyunca i.p. resveratrol tedavisinin, histomorfolojik incelemelerde, alkole bağlı gelişen santral ven etrafında inflamasyon, sentrilobuler nekroz, karaciğer hücre boyutlarında artış gibi bulguları düzelttiği gösterilmiştir (79). Resveratrolün, yağ asidi oksidasyonunu artırarak ve lipogenezi azaltıp karaciğer yağlanmasını engelleyerek alkole bağlı karaciğer toksisite gelişimini azalttığı bildirilmektedir (80).

2.4.6 Diğer Ksenobiyotiklere Bağlı Gelişen Karaciğer toksisitesinde Resveratrol:

- Tüberküloz tedavisinde kullanılan, izoniazid ve rifampisin karaciğer üzerinde toksik etkisini *in vivo* olarak farelerde, SIRT1 mRNA ekspresyonunu düzenleyerek ve myeloperoksidaz aktivitesi ile sitokin seviyelerini düşürerek (81);
- Androjen reseptörünün kompetitif antagonisti olan flutamide bağlı karaciğer toksisitesini *in vitro* koşullarda sıçan karaciğer hücrelerinde, mitokondriyal membran potansiyeli ile glutatyon seviyelerini artırıp lipid peroksidasyonunu azaltarak (82);
- Metotreksata bağlı karaciğer toksisitesini, sıçanlarda, *in vivo* olarak lipid peroksidasyonu göstergesi olan tiobarbitürik asit reaktif madde, katalaz ve Glutatyon-S-transferaz ezim düzeyini düşürerek (83);
- Sıçanlarda, antikonvülzan sodyum valproik asite bağlı karaciğer toksisitesini CYP2E1 enzim inhibisyonu ile aktif metabolitine dönüşümünü azaltarak (84);
- Naftaline bağlı karaciğer toksisitesini, farelerde doku glutatyon, plasma total antioksidan kapasitesinde, doku MDA, MPO ve kollajen düzeylerinde anlamlı düşüşe neden olarak (85);

- Çevresel kirliliğe ve arseniğe bağlı karaciğer toksisitesini *in vivo* olarak sıçan karaciğerinde, dokuda arsenik birikimini azaltarak ve plazmada SOD, katalaz, glutatyon düzeylerini artırarak önlediği gösterilmiştir (86).

2.5. Silibinin

Silimarin, arkeolojik verilerle kullanımı tarihi eski Mısır dönemine dayanan *Silybum marianum* (şevketi bostan) bitkisinin çekirdeklerinin ekstraksiyonu ile elde edilen ve birçok karaciğer hastalığının tedavisinde kullanılan yüksek antioksidan aktiviteye sahip flavonoglikandır (10, 87). Silimarin de bulunan aktif komponentler olan silibinin, silidianin, izosilibinin ve silikristin içinde, antioksidan özelliği en yüksek olanı silibinindir. Elde edilen ekstratların %70-80 içeriğini de silibinin oluşturmaktadır (5).

Hidrofilik yapıda olan silibininin oral biyoyararlanımı düşüktür ve gastrointestinal sistemden yaklaşık %23-47 oranında emilir. Bunun nedeni hem bağırsaktaki emilimin yetersiz olması hemde karaciğerde ilk geçiş eliminasyonuna uğramasıdır (88). Dolayısıyla parenteral formu maksimum absorpsiyon için tercih edilir. Silibinin absorpsiyon sonrası sistemik dolaşıma geçtiğinde karaciğerde sitokrom P450 enzimleri tarafından konjugasyona uğrayarak metabolize olur. Safra yoluyla atılan silibininin sadece %5'lik kısmı total silibinin olarak idrar yolu ile atılır (89).

Legalon® SIL, silibinin parenteral formudur. Her bir flakonda 528.5 mg silibinin-C-2',3-dihidrojen süksinat ihtiva eder ve bu yaklaşık 350 mg silibinine eş değerdir. α -AMA'e bağlı karaciğer toksisitesinde önerilen dozu ise 5 mg/kg intravenöz yüklemenin ardından 20 mg/kg 24 saat iv infüzyon şeklindedir.

Silibinin, çeşitli toksisite modellerinde, apoptozis ve inflamasyonu baskılayarak pek çok patolojik durumu tedavi etmede kullanılmaktadır (90). Silibininin bu etkisini, özellikle oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunu önleyerek oluşturduğu bildirilmektedir(91). Silibinin antikanserojen, antifibrotik, antidiyabetik, antiinflamatuvar, antioksidan etkinlikleri ve bu etkinliklerinin altında yatan kimyasal ve hücresel mekanizmalarla ilgili araştırmalar hala devam etmektedir(88).

Silibininin *Amanita phalloides*'e bağlı karaciğer toksisitesinde etkililiği

Günümüzde *Amanita phalloides*'e bağlı karaciğer toksisitesinde, silibinin-C-2',3-dihydrogen süksinat, parenteral yolla antidot olarak kullanılsa da etkililiğini gösteren klinik kanıtlar yeterince güçlü değildir. *İn vivo* ve *in vitro* deneysel çalışmalarda, silibininin α -AMA'e bağlı karaciğer toksisitesini önleme mekanizmaları arasında, α -AMA'in karaciğer hücresi içine OATP aracılığıyla transportunu inhibe etmesi, biliyer sekresyonu azaltarak α -AMA enterohepatik dolaşımını engellenmesi, SOD aktivitesinin sitümüle etmesi, glutasyon seviyesini artırması, hasarlanan karaciğer hücrelerinden TNF- α salınımını baskılanması, RNA polimeraz I aktivitesini stimüle ederek α -AMA tarafından inhibe edilen RNA polimeraz II fonksiyonunu kompanze etmesi gibi mekanizmalar öne çıkmaktadır (5, 10, 92).

İnsan karaciğer hücre kültüründe oluşturulan α -AMA toksisite modelinde silibininin, 12, 24 ve 48 saat uygulandığında hücre hasarını anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir (34). Farklı hayvan modellerinde de, yine silibinin karaciğer üzerinde koruyucu özelliğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Köpeklerde oluşturulan *in vivo* α -AMA toksisite modelinde silibinin oral yolla verildiğinde karaciğer üzerinde koruyucu etkisi olduğu gösterilirken farelerde yapılan *in vivo* toksisite modelinde ise silibinin intraperitoneal verildiğinde anlamlı bir etki gözlenmemiştir (41, 93).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmamız; randomize, kontrollü deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Deneysel çalışmalar, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda 2015 ve 2016 yılları arasında gerçekleştirildi.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırma insanlar üzerinde yapılan klinik bir çalışma olmadığından evren ve örneklemi bulunmamaktadır.

3.3. Çalışma Materyali

Çalışmamızda ağırlıkları 20-30 gram arasında değişen 140 adet Balb/c türü erkek fare kullanıldı. Fareler, DEÜTF Laboratuvar Hayvanları Bilim Dalı'ndan temin edildi. Fareler 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortam koşullarında DEÜTF Laboratuvar Hayvanları Bilim Dalı sıçan barınma odasında standart yem ve su ile beslendi. Fareler deneyden önceki gün Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na getirildi. Deney koşullarını standardize etmek için fareler, deney öncesinde 12 saat aç bırakıldı.

3.4. Çalışma Protokolü

Farelerde karaciğer fonksiyon testlerinin ve Direkt ve indirek bilirubinin bazal değerlerinin belirlenmesi

Deneysel çalışmamızda, farelerden kan alınması konusunda deneyim kazanabilmek için 15 adet Balb/c fareden, kardiyak ponksiyon ile kan alınması çalışması yapıldı. Kan alınabilen farelerin ayrılan serumlarından, deneyde değerlendireceğimiz biyokimyasal parametreler olan; AST (Aspartat Aminotransferaz), ALT (Alanin Aminotransferaz), total ve direkt bilirubin düzeyleri ölçüldü. Böylelikle hiçbir tedavi almamış farelerin deneyde değerlendirilecek parametrelerinin bazal değerleri konusunda bilgi edinildi.

Ön çalışma

- α -AMA'in karaciğerde toksisite oluşturan dozunu bulmak,
- Deney gruplarında kullanılacak olan resveratrol ve silibinin çözücüsü Dimetilsülfoksit (DMSO)'in, resveratrolün diğer bir çözücüsü olan %96'lık alkolün ve silibininin rutin tedavide kullanılan ticari preparatı olan Legalon®'un karaciğer üzerine etkisini değerlendirmek

3.4.1. Protokolde yer alan iş paketleri

3.4.1.1. Ön Çalışma

1. Alfa-amanitin (α -AMA)'in karaciğerde toksisite oluşturan dozunun belirlenmesi

α -AMA'in LD₅₀'si 0.6 mg/kg (i.p.) olarak bildirilmektedir (41). Balb/c farelere, α -AMA'in literatürdeki LD₅₀'si (0.6 mg/kg) (n=4) i.p. yolla uygulandı. Ancak 48 saatlik izlem sonunda farelerde ölüm gözlenmedi. Eter anestezisi altında, kardiyak ponksiyonla alınan kanda AST ve ALT değerlerinde ılımlı yükselme olması ve histomorfolojik olarak değerlendirilen karaciğer dokusunda yeterli hasar oluşmaması üzerine α -AMA'in karaciğer üzerinde toksik dozunu bulabilmek amacıyla α -AMA dozu logaritmik olarak artırılarak (0.25, 0.5 ve 1 log artışlarla), farelere sırasıyla 1.08 mg/kg (n=10), 1.4 mg/kg (n=10) ve 1.92 mg/kg (n=8) α -AMA uygulandı ve α -AMA için doz-cevap eğrisi çıkarıldı.

Tüm farelerin deney başlangıcında ve 48. saatte, sakrifiye edilmeden önce ağırlıkları ölçüldü ve ağırlık farkları ortalamaları değerlendirildi.

2. Çözücülerin ve Legalon®'un karaciğer üzerine etkilerinin değerlendirilmesi

2.a. 6 saat aralıklı DMSO grubu (n=5):

Deney gruplarımızda kullanacağımız resveratrol (16 mg/mL) ve silibinin (10 mg/mL) DMSO'de çözünmektedir. DMSO'in tek başına karaciğer üzerine etkisini göstermek amacıyla planladığımız bu deney grubunda; resveratrolün etkililiğini göstermek ve silibininin etkililiği ile karşılaştırmak üzere planladığımız deneysel protokol göz önünde bulundurularak; farelere %0.9'luk sodyum klorür ve eş zamanlı olarak DMSO intraperitoneal olarak uygulandı.

DMSO enjeksiyonları, 6 saat aralıklı olarak 48 saat boyunca 8 kez tekrarlandı. Fareler, 48 saat boyunca gözlendi ve 48. saatte eter anestezisi altında sakrifiye edildi(Şekil 6).

2.b. Alkol grubu (n=3):

Resveratrol aynı zamanda %96'lık alkolde de çözünmektedir. %96'lık etil alkolün tek başına karaciğere etkisinin gösterilmesi amacıyla farelere %0.9'luk sodyum klorür ve eş zamanlı olarak %96'lık alkol i.p olarak uygulandı. Enjeksiyonlar 12 saat aralıklı olarak 3 kez tekrarlandı. Deney gruplarında standardizasyon amacıyla, silibinin 6 saat aralıklarla uygulanacağı için 6., 18., 30. ve 42. saatlerde de farelere %0.9'luk sodyum klorür enjeksiyonları yapıldı (Şekil 6).

2.c. 12 saat aralıklı DMSO grubu (n=3):

12 saat aralıklarla uygulanan DMSO'in karaciğere etkisinin gösterilmesi amacıyla farelere %0.9'luk sodyum klorür ve eş zamanlı olarak DMSO i.p olarak uygulandı. Enjeksiyonlar 12 saat aralıklı olarak 3 kez tekrarlandı. Deney gruplarında standardizasyon amacıyla, silibinin 6 saat aralıklarla uygulanacağı için 6., 18., 30. ve 42. saatlerde de farelere %0.9'luk sodyum klorür enjeksiyonları yapıldı (Şekil 6).

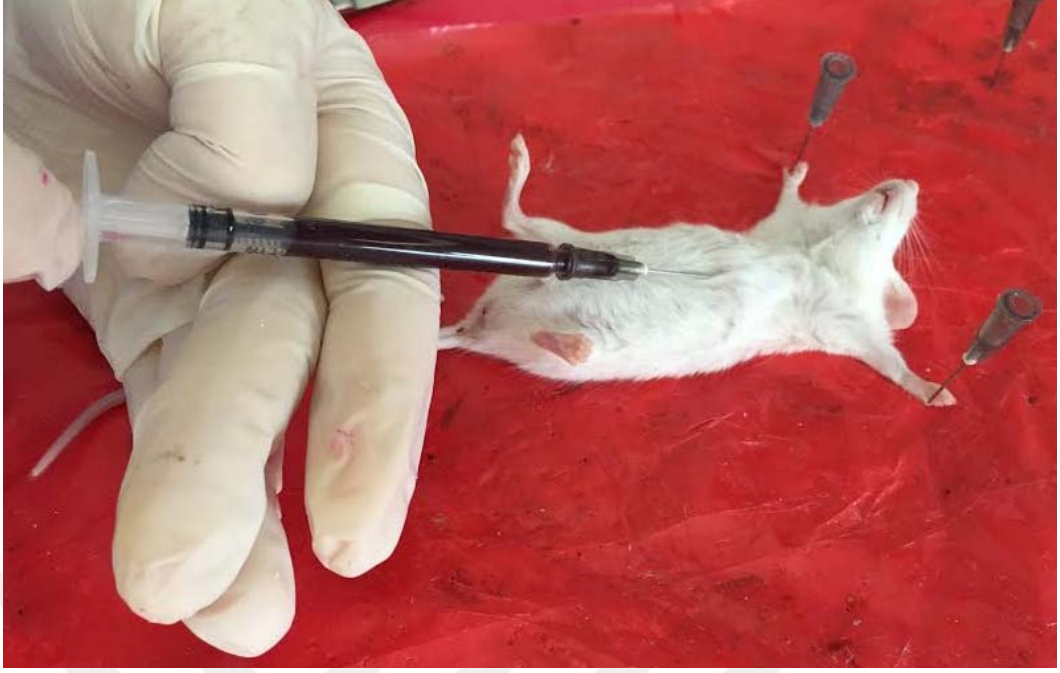
2d. Legalon® grubu (n=3):

Legalon®, silibinin içeren ticari üründür (350 mg/flk). Legalon®'un tek başına karaciğere etkisinin gösterilmesi amacıyla farelere %0.9'luk sodyum klorür ve eş zamanlı olarak silibinin i.p olarak uygulandı. Legalon® enjeksiyonları, 6 saat aralıklı olarak 48 saat boyunca 8 kez tekrarlandı. Fareler, 48 saat boyunca gözlendi ve 48. saatte eter anestezisi altında sakrifiye edildi (Şekil 6).

Saat	0	6	12	18	24	30	36	42	48
Alkol	SF+A	SF	A	SF	A	SF	A	SF	X
DMSO-6s	SF+D	D	D	D	D	D	D	D	X
DMSO-12s	SF+D	SF	D	SF	D	SF	D	SF	X
Legalon	SF+L	L	L	L	L	L	L	L	X

Şekil 6. Deneyde kullanılabilecek çözücülerin ve Legalon®'un karaciğer üzerine etkisinin değerlendirildiği ön çalışma grupları (Serum fizyolojik (SF): %0.9'luk Sodyum klorür, Alkol (A), DMSO(D): Dimetil sülfoksit, Legalon (L).

Tüm enjeksiyonlar, 0.5 mL hacim içerisinde belirtilen saatlerde, i.p yolla uygulandı. Tüm fareler, 48 saat boyunca gözlemlendi. 48 saat sonunda, eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile kurban edilen farelerden kardiyak ponksiyonla 0.3-0.8 mL arasında kan alındı (Şekil 7). Histomorfolojik incelemeler için, median lobdan alınan karaciğer örnekleri formaldehit solusyonuna konuldu. Alınan kanlardan ayrılan serumlardan, AST, ALT, Total Bilirubin ve Direk Bilirubin düzeyleri ölçüldü. (Şekil 8). Karaciğer örnekleri, histomorfolojik olarak skorlandı.



Şekil 7. Fareden kardiyak ponksiyon ile kan alınması



Şekil 8. Fareden karaciğer örneğinin alınması

Karaciğer fonksiyon testleri (AST, ALT), Total Bilirubin ve Direkt Bilirubin düzeyleri, farelerde cinsiyete ve deneyin yapıldığı koşullara göre değişebilmektedir. Bu nedenle kontrol grubuna göre belirtilen değerlerde istatistiksel olarak anlamlı yükselme ve histomorfolojik olarak karaciğer hücrelerinde mononükleer hücre infiltrasyonu, nekroz, apoptozis varlığının gösterilmesi karaciğer toksisite ölçütü olarak kabul edildi.

3.4.2. Deney Protokolü

Çalışmada, fareler randomize olarak 6 gruba ayrıldı. Deney gruplarında, ön çalışmada karaciğer toksisitesi oluşturan α -AMA dozu (1.4 mg/kg) ile karaciğer toksisitesi oluşturuldu ve 6 saat aralıklı olarak aşağıda ayrıntılı şekilde belirtilen tedaviler, i.p yolla uygulandı. (Şekil 9).

Deney Grupları

1. AMA+DMSO grubu (n=12):

Farelere, 1.4 mg/kg α -AMA, DMSO ile eş zamanlı olarak uygulandı. DMSO enjeksiyonları, 12 saat aralıklarla 48 saat boyunca tekrarlandı. Deney gruplarında girişimsel standardizasyonu sağlamak için; 6, 18, 30 ve 42. saatlerde de %0.9'luk sodyum klorür enjeksiyonu uygulandı.

2. AMA+SF grubu (n=16):

Farelere, 1.4 mg/kg α -AMA, %0.9'luk sodyum klorür ile eş zamanlı olarak uygulandı. DMSO enjeksiyonları, 12 saat aralıklarla 48 saat boyunca tekrarlandı. Deney gruplarında girişimsel standardizasyonu sağlamak için, 6 saat aralıklarla %0.9'luk sodyum klorür enjeksiyonu 7 kez tekrarlandı.

3. Eş zamanlı Resveratrol grubu (30 mg/kg, n=10):

Farelere, 1.4 mg/kg α -AMA, resveratrol ile eş zamanlı olarak uygulandı. Resveratrol tedavisi, 12., 24. ve 36. saatlerde 3 kez tekrarlandı. Deney gruplarında girişimsel standardizasyonu sağlamak için; 6, 18, 30 ve 42. saatlerde de %0.9'luk sodyum klorür enjeksiyonu uygulandı.

4. 12S Resveratrol grubu (30 mg/kg, n=13):

Farelere, 1.4 mg/kg α -AMA, %0.9'luk sodyum klorür ile eş zamanlı olarak uygulandı. Resveratrol tedavisi, 12, 24 ve 36. saatlerde 3 kez tekrarlandı. Deney gruplarında girişimsel

standardizasyonu sağlamak için; 6, 18, 30 ve 42. saatlerde de %0.9'luk sodyum klorür enjeksiyonu uygulandı.

5. 24S Resveratrol grubu (30 mg/kg, n=13):

Farelere, 1.4 mg/kg α -AMA, %0.9'luk sodyum klorür ile eş zamanlı olarak uygulandı. %0.9 sodyum klorür enjeksiyonu, 12. saatte de uygulandı. Resveratrol tedavisi, 24. ve 36. saatlerde 2 kez tekrarlandı. Deney gruplarında girişimsel standardizasyonu sağlamak için; 6, 18, 30 ve 42. saatlerde de %0.9'luk sodyum klorür enjeksiyonu uygulandı.

6. Silibinin grubu (5 mg/kg, n=13):

Farelere, 1.4 mg/kg α -AMA, silibinin ile eş zamanlı olarak uygulandı. Silibinin enjeksiyonları, 6, 12, 18, 24, 30, 36 ve 42. saatlerde 7 kez tekrarlandı.

Saat	0	6	12	18	24	30	36	42	48
α -AMA + SF	A+SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	SF	X
α -AMA + DMSO	A+D	SF	D	SF	D	SF	D	SF	X
Eş R	A+R	SF	R	SF	R	SF	R	SF	X
12 R	A+SF	SF	R	SF	R	SF	R	SF	X
24R	A+SF	SF	SF	SF	R	SF	R	SF	X
Sil	A+Sil	Sil	Sil	Sil	Sil	Sil	Sil	Sil	X

Şekil 9. Deney protokolü (A: α -Amanitin, NaCl: %0.9'luk Sodyum klorür, R: Resveratrol, Sil: Silibinin, X: Sakrifikasyon)

Tüm farelerin deney başlangıcında ve 48. saatte sakrifiye edilmeden önce ağırlıkları ölçüldü ve ağırlık farkları ortalamaları değerlendirildi. Fareler, 48. saatte eter anestezisi altında sakrifiye edildi ve kardiyak ponksiyonla yaklaşık olarak 0.3-0.8 mL arasında kan alındı. Karaciğerin median bölgesinden alınan örnekler, histomorfolojik incelemeler için %10 formaldehit solüsyonu içerisine ve elektron mikroskopik incelemeler için gluteraldehit

solüsyonu içine kondu. Karaciğer sağ lobundan alınan örnekler de, soğuk (+4°C) Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ile yıkandı ve oksidatif stres parametrelerinin ölçülebilmesi için önce sıvı azot içerisine konuldu. Analiz yapılincaya kadar -80°C’de saklandı..

3.4.3. Deney Gruplarında Değerlendirme Yöntemleri

3.4.3.1. Histomorfolojik Değerlendirme:

Karaciğer dokusuna ait örnekler %10’luk tamponlu formalinde fikse edildi ve parafine gömüldü. Daha sonra karaciğer dokusu örneklerinden 5 µm’lik kesitler alındı, Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyandı.

Hematoksilen Eozin boyaması;

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 2 saat süreyle 60°C’lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10’ar dakikalık üç farklı ortamdaki ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve % 96’dan % 70’e azalan alkol serilerinden geçirildi. Kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akan suda yıkanan kesitler, 2 dakika Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absolü alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20’şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

Karaciğer doku örnekleri karaciğer hücre hasarı yönünden incelendi. Karaciğer dokusu morfolojisindeki değişimler; konjesyon, nekroz, sitoplazmik vakualizasyon, eozinofili, nükleer piknozis ve inflamatuvar hücre yoğunluğu yönünden, çalışmada yer alan Histolog tarafından kör olarak ışık mikroskopunda (Olympus BX-50, Japonya) değerlendirildi. Değerlendirmede Karaciğer Histolojik Hasar Skoru (KHHS) kullanıldı.

KHHS;

0: Hasar yok ya da minimal hasar,

1: Hafif hasar,

2: Orta hasar,

3: Şiddetli hasar şeklinde derecelendirildi.

3.4.3.2. Apoptozis Varlığının Değerlendirilmesi;

TUNEL protokolü

DNA fragmentasyonu TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate DNA nick-end labelling) kiti ile gösterildi. Bu yöntemde biyotinlenmiş nükleotid, terminal deoksinükleotidil transferase (TdT) enzimini kullanarak DNA'nın 3'-OH ucuna bağlanır. Daha sonra işaretlenmiş streptavidin bu biyotinlenmiş nükleotidlere bağlanır. Bu prosedüre göre fragmente nükleuslar koyu kahverengi olarak boyanır. Bu yöntem DNA kırığının antikör ile terminal uçtan işaretlenmesi esasına dayanır.

Hazır kit solüsyonlarından birinci şişe enzim solüsyonu, ikinci şişe işaretleme (Label) solüsyonudur. Boyamaya başlanmadan önce bu solüsyonlar karıştırılarak TUNEL reaksiyon karışımının hazırlandı. Bunun için ikinci şişeden 100 µl negatif kontrolde kullanılmak üzere ayrıldı. Kalan stok solüsyonun üzerine ilk şişeden 50 µl eklenip vortekslendi. Böylece 500 µl'lik reaksiyon karışımı elde edildi. 400 µl %30'luk stok, Hidrojen peroksit (H₂O₂) 3,6 ml PBS ile karıştırılarak, % 3'lük H₂O₂ hazırlandı. Boyanacak alanın etrafı PapPen ile çizilip, lamlar PBS ile yıkandıktan sonra belirlenen alana % 3'lük H₂O₂ konuldu ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Preparatlar PBS ile yıkandı, belirlenen alanın etrafındaki fazla sıvı alındıktan sonra reaksiyon karışımı dokunun tamamını kapatacak şekilde konuldu ve 60 dakika 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. 3 kez PBS ile yıkayıp fazla sıvısı kurulan lamaların üzerine 50 µl Converted POD (3.şişe) ilave edildi ve 30 dakika 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Bu süre içinde bir sonraki basamakta kullanılacak olan diaminobenzidin (DAB) yarım saat önceden hazırlandı. Bunun için 300 µl DAB substratı 2700 µl DAB dilüsyonu ile karıştırılarak ve karanlık bir yerde bekletildi. Inkübasyon süresi sonunda 3 kez PBS ile yıkayıp fazla suyu alınan lamın üzerine, hazırlanan DAB solüsyonunu koyulup yaklaşık 2 dakika beklenildi. Preparatlar distile suyla yıkandıktan sonra, lamaların üzerine Harris Hematoksilen konulup 10-15 saniye beklenerek zemin boyaması yapıldı. Daha sonra distile suyla yıkandı. Lamalar kurutulmadan alkol ve ksilol serilerinden geçirilip entellan ile kapatıldı.

Aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama yöntemi;

Kesitler 24 saat 60°C etüvde bekletildikten sonra kaspaz-3 boyama yöntemiyle boyandı. Kaspaz-3 immunreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla fare spesifik anti-kaspaz-3 (Neomarkers, Fremont, CA) antikoru kullanıldı. Lizinli kesitler üç değişim ksilol ile deparafinizasyon işlemine tabi tutuldu. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Proteinaz K solüsyonu içinde 37°C etüvde 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika % 3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 1 saat oda sıcaklığında bloklama solüsyonu (İnvitrogen, Histostain- Plus Bulk Kit) ile inkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan anti-kaspaz-3 antikoru ile bir gece +4°C'de inkübe edildi. Ertesi gün fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor (İnvitrogen- Plus Broad Spectrum) ile 30 dakika inkübe edildi. Sekonder antikor enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) (Histostain- Plus Broad Spectrum) ile bağlandıktan sonra antikor-biyotin-avidin-peroksidaz kompleksi %0.02 DAB kullanılarak görünür hale getirildi. Zemin boyaması Mayers hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal skorlamalar için onluk büyütmede birbiriyle örtüşmeyen alanlar rastgele yöntemle seçildi. Pozitif boyanmanın derecesi, yoğunluk ve dağılım açısından 0'den 3'e kadar olan bir gösterge çizelgesi kullanılarak semikantitatif skorlama ile değerlendirildi.

Semikantitatif skorlama

0: İmmunreaktivite yok,

1: İmmunreaktivite hafif,

2: İmmunreaktivite orta,

3: İmmunreaktivite belirgin.

3.4.3.3. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Ölçümler yapıldıktan sonra karaciğer doku homojenat ve supernatantları -80°C'de saklandı. Malonildialdehid (MDA) ve Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri spektrofotometrik

olarak belirlendi. Karaciğer dokusundaki MDA düzeylerinin saptanmasında standart tetramethoksiopropan eğrisi yöntemi ile Bioxytech MDA-586 (Oxis International, USA) ölçüm kit protokolü uygulandı. Süpernatantların SOD aktivitesi, Bioxytech SD-525 (Oxis International, USA) kullanarak saptandı. SOD aktivitesi ölçümü 5,6,6a,11b-tetrahydro-3,9,10-trihydroxybenzo(c)fluorene otooksidasyon hızının 525 nm de ölçülmesi esasına dayanmaktaydı. Homojenatların ve süpernatantların protein konsantrasyonları total protein kiti (Randox labs., Crumlin, U.K.) kullanılarak saptandı. Karaciğerde glutatyon miktarı da kolorimetrik yöntem ile spektrofotometrik olarak kit (Oxis) ile ölçüldü.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri:

Bağımlı Değişken: α -AMA'e bağlı gelişen karaciğer toksisitesi

Bağımsız Değişken: Resveratrol ve silibinin tedavilerinin etkililiği

3.6. Veri Toplama Araçları:

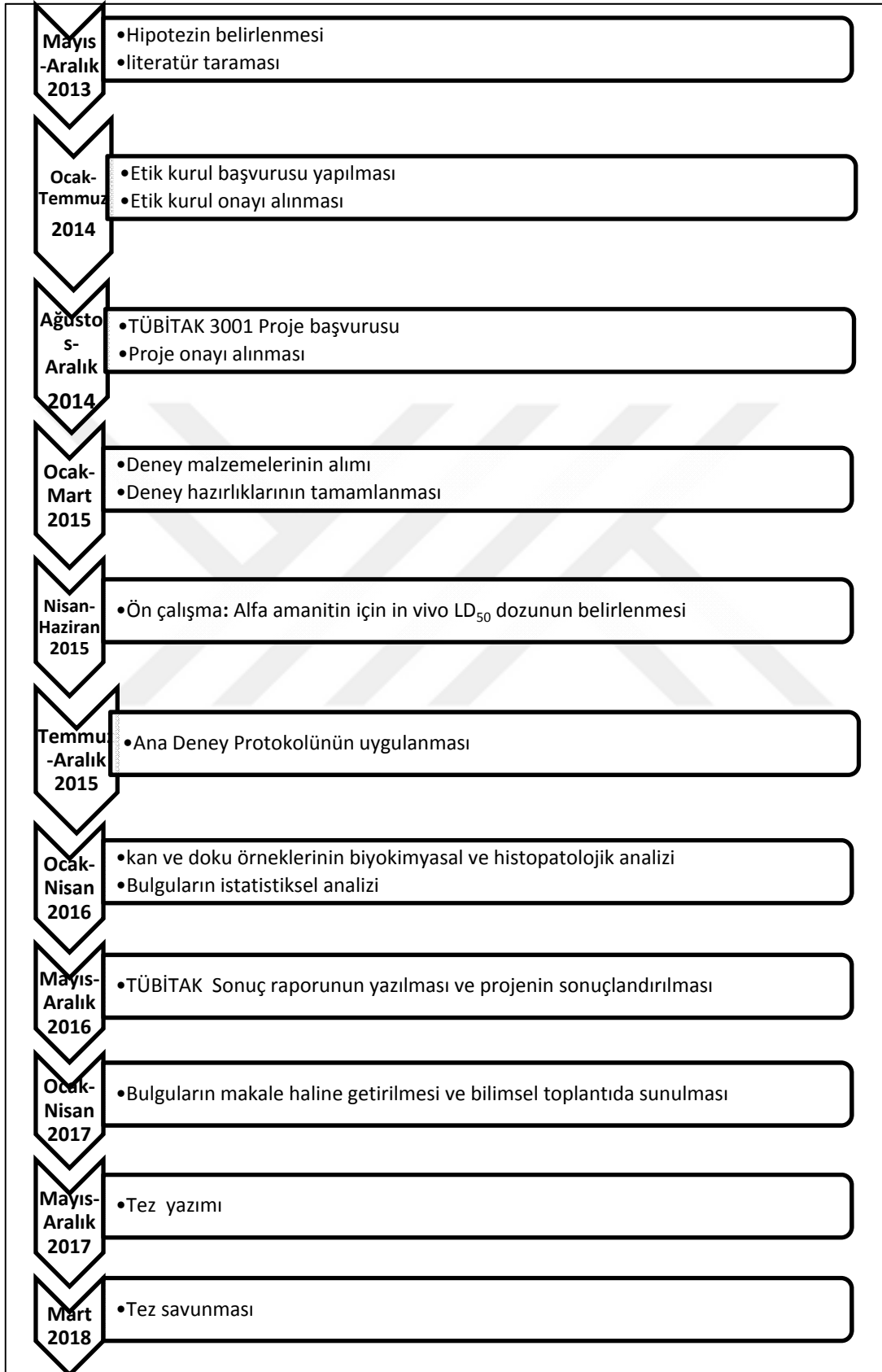
Tablo 5. Çalışmada kullanılan makine, teçhizat bilgisi, bulunduğu yer ve kullanım amaçları (AD: Anabilim Dalı)

Mevcut Altyapı/Ekipman Türü, Modeli (Laboratuvar, Araç, Makine-Teçhizat vb.)	Mevcut Olduğu Anabilim Dalı	Projede Kullanım Amacı
Derin dondurucu (-20°C)	Farmakoloji AD. Laboratuvarları	Kimyasalların saklanması
Vorteks-Manyetik karıştırıcı--Hassas Terazî	Farmakoloji AD. Laboratuvarları	Kimyasalların hazırlanması
Işık mikroskobu (Olympus BH50)	Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları	Histolojik değerlendirmeler.
Mikrotom (RM 2255, Leica)	Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları	Histolojik kesitlerin alınması
Dijital kamera (Olympus DP71)	Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları	Histolojik görüntüleme
Etüv (Dedeoğlu)	Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları	Işık mikroskopik doku takibi
Bilgisayarlı analiz sistemi	Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları	Işık mikroskopik ölçümler ve değerlendirme
Buzdolabı	Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları	Kimyasalların saklanması
Soğuk Oda +4°C	Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları	Kimyasalların saklanması
Parafin Dispanser (Leica-G1120)	Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları	Parafin blok hazırlanması
Santrifüj Sigma1-14	Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarları	Kimyasal solusyonların hazırlanması.
Soğutmalı santrifüj (Hettich 200R)	Fizyoloji AD. Laboratuvarları	Doku homojenatlarının hazırlanması
Vorteks (IKA-Labortechnik)	Fizyoloji AD. Laboratuvarları	Doku homojenatlarının hazırlanması
Homojenizatör (ultrasonik) (Bandelin)	Fizyoloji AD. Laboratuvarları	Doku homojenatlarının hazırlanması
Spektrofotometre (T80+UV/VIS)	Fizyoloji AD. Laboratuvarları	Oksidatif stres parametrelerinin ölçümü
Bandelini Isıtmalı karıştırıcı (Ikamag)	Fizyoloji AD. Laboratuvarları	Oksidatif stres parametrelerinin ölçümü
Derin dondurucu (-20°C)	Fizyoloji AD. Laboratuvarları	Kimyasalların saklanması
Derin dondurucu (-80°C)	Fizyoloji AD. Laboratuvarları	Dokuların saklanması

Tablo 6: Deneyde kullanılan kimyasallar, markaları ve kullanım amaçları (DMSO: dimetil sülfoksit, α -AMA: α -Amanitin)

Deneyde Kullanılan Kimyasallar	Marka	Kullanım Amacı
α -AMA	Sigma A2263	Karaciğer toksisitesi oluşturmak
Resveratrol	Sigma R5010	α -AMA'ye bağlı karaciğer toksisitesinde etkililiğini göstermek
Silibinin	Sigma S0417	α -AMA'ye bağlı karaciğer toksisitesinde etkililiğini göstermek.
DMSO	Sigma D5879	Resveratrol ve silibininin çözücüsü

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi:



3.8.

Verilerin Değerlendirilmesi:

Deney gruplarında ölçülen biyokimyasal ölçümler ve enzim aktivitelerinin istatistiksel analizinde ANOVA, farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı.

Histomorfolojik incelemelerin istatistiksel analizinde, non parametrik testler olan Mann Whitney-U ve Kruskal Wallis testleri kullanıldı. Verilerin analizi, Graphad Instat V2.05a-1994 yardımıyla yapıldı. Tüm veriler Ortalama±Standart hata ortalaması olarak gösterildi. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları:

Deneysel çalışmaların en başta kliniğe uyarlama olmak üzere birçok kısıtlılığı bulunmaktadır. Çalışmamızın temel kısıtlılıkları:

- Farelerden maksimum olarak alınabilecek olan kan miktarı yaklaşık olarak 1 mL'dir (94). Çalışmamızda karaciğer toksisite modeli oluşturmamız nedeniyle, farelerin hemodinamilerinin de bozulması nedeni ile zaten zor olan farelerden kan alma işlemi daha da zorlaştı. Bu nedenle, tüm farelerden kardiyak ponksiyonla, kan alınamadı. Kan alınmayan farelerin karaciğer dokularından alınan örnekler, histomorfolojik olarak skorlandı ve oksidatif stress parametreleri açısından değerlendirildi.
- 3R kuralı gereğince(95), deneylerde kullanılan fare sayısını hayvanı sayısını kısıtlı tutmamız nedeniyle resveratrolün yalnızca 30 mg/kg dozundaki etkililiğini araştırabildik, daha yüksek dozlardaki etkililiğini değerlendiremedik.
- Çalışmamızda, resveratrolün α -AMA'e bağlı gelişen karaciğer toksisitesini iyileştirmede, antioksidan etkili olmadığı sonucuna vardık. Aslında, resveratrol tedavi gruplarında, bir miktar antioksidan etkisi olduğu, sayısal olarak gözlense de istatistiksel anlamlılığa ulaşamadı.
- Antioksidan enzimlerin hiçbir işlem uygulanmamış farelerdeki bazal değerlerini ölçemedik.
- Resveratrolün α -AMA'e bağlı gelişen karaciğer toksisitesini geri iyileştirmede, antiinflamatuvar etkili olduğunu sadece histomorfolojik veriler ile destekleyebildik. Dokulardan ya da serumdan TNF- α , NFkB ve interlökin gibi antiinflamatuvar etkiyi değerlendirmede kullanılan parametreleri ölçemedik.

3.10. Etik Kurul Onayı

Çalışmamız için, DEÜTF Multidisiplin Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı alınmıştır (No: 44/2014).



4. BULGULAR

4.1 Farelerde karaciğer fonksiyon testlerinin ve Direkt ve İndirek Bilirubin bazal değerlerinin belirlenmesi

Deneyde karaciğer toksisitesi ölçütü olarak kullanacağımız AST, ALT, Total Bilirubin ve Direkt Bilirubin düzeylerinin bazal değerlerini belirlemek amacıyla 15 fareden alınan kanlardan yapılan ölçümler değerlendirildiğinde; 6, 9 ve 11 numaralı farelerde kardiyak ponksiyon ile kan alındığında en uygun sonuçların elde edildiği ve kardiyak ponksiyonla kan almada başarılı olunamayıp göğüs kafesi açılarak torakotomi ile kan alındığında, değerlerin yüksek olduğu sonucuna varıldı. Bu üç farenin biyokimyasal parametrelerinin ortalaması bizim deneysel koşullarımızda bazal değerler olarak kabul edildi (Tablo 7).

Tablo7. Erkek Balb/c farelerin bazal biyokimyasal değerleri (AST: Aspartat aminotransferaz, ALT: Alanin aminotransferaz)

	AST (U/L)	ALT (U/L)	Total bilirubin (mg/dL)	Direk bilirubin (mg/dL)
Fare No				
1	318.0	284.0	0.1	
2	124.0	116.0		
3	Kan alımında başarılı olunamadı			
4				
5				
6	88.0	78.0	0.25	0.12
7	Kan alımında başarılı olunamadı			
8	139.0	127.0	0.2	0.1
9	82.0	76.0	0.21	0.12
10	238.0	216.0	0.2	0.1
11	56.0	50.0	0.3	0.15
12	136.0	124.0	0.26	0.1
13	Kan alımında başarılı olunamadı			
14				
15				
Ortalama (6, 9, 11 numaralar)	75.3±9.8	68.0±9.0	0.3±0.02	0.1±0.01

Ön çalışma

Alfa-amanitin (α -AMA)'in karaciğerde toksisite oluşturan dozunun belirlenmesi

Literatürde α -AMA'nın LD₅₀'si olarak bildirilmiş olan, 0.6 mg/kg'lık doz, 4 adet Balb/c fareye intraperitoneal olarak uygulandı. Yeterli karaciğer hasarı oluşmaması ve 48 saatlik izlem sonunda farelerde ölüm olmaması nedeniyle, logaritmik doz artışıyla (0.25, 0.5 ve 1 log artışlarla), farelere sırasıyla 1.08 mg/kg (n=10), 1.4 mg/kg (n=10) ve 1.92 mg/kg (n=8) α -AMA uygulandı. Böylelikle artan dozlarda α -AMA'nın karaciğer üzerinde etkisi bir doz-cevap eğrisi ile değerlendirildi.

Tablo 8. Logaritmik olarak artırılan α -AMA'nın, farelerin deney başlangıcı ve sonrasında ölçülen ağırlık ve ağırlık farkı ortalamaları

α -AMA dozu	Deney başlangıcı (g)	Deney sonu (g)	Ağırlık farkı (%)
0.6 mg/kg (n=4)	25.3±0.4	24.7±0.5	2.4±0.9
1.08 mg/kg (n=10)	23.3±0.6	21.8±0.5	7.9±1.2
1.4 mg/kg (n=10)	24.1±0.7	23.4±0.6	7.3±1.7
1.92 mg/kg (n=8)	25.0±0.3	22.8±0.4	7.4±1.8

α -AMA doz-cevap eğrisi gruplarında, farelerin bazal ağırlık ortalamaları arasında, farklılık yoktu. Farelerin, 48. saatte, eter anestezisi ile sakrifiye edilmeden önce ölçülen ağırlıkları ile başlangıç ağırlıkları arasındaki farklar da değerlendirildiğinde, doz-cevap eğrisi çalışma grupları arasında farklılık saptanmadı (Tablo 8).

Logaritmik olarak artırılan α -AMA'nın biyokimyasal parametreler ve karaciğer histomorfolojisi üzerine etkileri

0.6 mg/kg α -AMA grubu (n=4):

Farelerin AST, ALT, T. Bilirubin ve D. Bilirubin değerleri sırasıyla; 656.8±243.5 U/L, 624.5±214.6 U/L, 0.3±0.03 mg/dL ve 0.1±0.02 mg/dL olarak ölçüldü. Ölçülen bu değerler,

kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı oranda yükseklik saptanmadı. Karaciğer dokusunda yapılan histomorfolojik incelemede oluşan karaciğer hasarı skoru ortalaması ise 1.5 ± 0.3 idi. Bu gruba ait farelerin karaciğerlerinin histomorfolojik incelemesinde karaciğer dokusunun bütünlüğünün korunduğu, bazı alanlarda periportal mononükleer hücre (MNH) infiltrasyonları, nadir fokal nekroz ve bazı alanlarda sinüzoidal dilatasyon olduğu gözlemlendi. Literatürde farelerin yarısında ölüme neden olan bu dozda, bizim deneysel koşullarımızda 48 saatlik izlemde farelerin hepsi yaşadı (Tablo 9, Şekil 10, 11, 12A).

1.08 mg/kg α -AMA grubu (n=10):

Farelerin AST, ALT, T. Bilirubin ve D. Bilirubin değerleri sırasıyla; 3523.0 ± 1513.0 U/L, 2712.0 ± 988.6 U/L, 0.5 ± 0.1 mg/dL ve 0.3 ± 0.08 mg/dL idi. Karaciğer dokusunda yapılan histomorfolojik incelemede oluşan karaciğer hasar skoru ortalaması ise 1.6 ± 0.3 idi. Bu gruba ait farelerin karaciğerlerinin histomorfolojik incelemesinde, karaciğer dokusunun bütünlüğünün korunduğu, bazı alanlarda nadir hemoraji, bazı kesitlerde periportal MNH infiltrasyonları, nadir fokal nekroz ve bazı alanlarda sinüsoidal dilatasyon gözlemlendi. 48 saatlik izlemde farelerin hepsi yaşadı (Tablo 9, Şekil 10, 11, 12B).

1.4 mg/kg α -AMA grubu (n=10):

Farelerin AST, ALT, T. Bilirubin ve D. Bilirubin değerleri sırasıyla; 5267.0 ± 1201.0 U/L, 4513.0 ± 1171.0 U/L, 1.1 ± 0.4 mg/dL ve 0.5 ± 0.2 mg/dL idi. AST ve ALT değerlerinde, kontrol kabul ettiğimiz grup ile karşılaştırıldığında anlamlı oranda yükseklik saptandı ($p < 0.05$). Karaciğer dokusunda yapılan histomorfolojik incelemede oluşan karaciğer hasarı skoru ortalaması ise 1.7 ± 0.3 idi. Bu gruba ait farelerin karaciğerlerinin histomorfolojik incelemesinde, karaciğer dokusunda bazı alanlarda hepatosit hasarı, bazı alanlarda periportal MNH infiltrasyonları, fokal nekroz ve bazı alanlarda sinüzoidal dilatasyonla birlikte hemorajik alanlar gözlemlendi. 48 saatlik izlemde 4 fare öldü (Tablo 9, Şekil 10, 11, 12C).

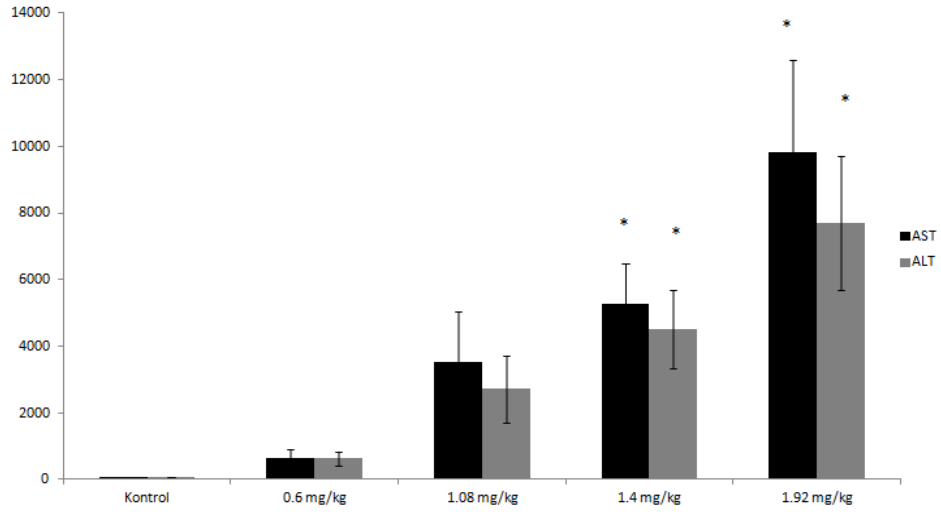
1.92 mg/kg α -AMA grubu (n=8):

Farelerin AST, ALT, T. Bilirubin ve D. Bilirubin değerleri sırasıyla; 9834.0 ± 2759.0 U/L, 7700.0 ± 2014.0 U/L, 0.8 ± 0.2 mg/dL ve 0.6 ± 0.2 mg/dL idi. AST ve ALT değerlerinde, kontrol kabul ettiğimiz grup ile karşılaştırıldığında anlamlı oranda yükseklik saptandı ($p < 0.05$). Karaciğer dokusunda yapılan histomorfolojik incelemede oluşan karaciğer hasarı

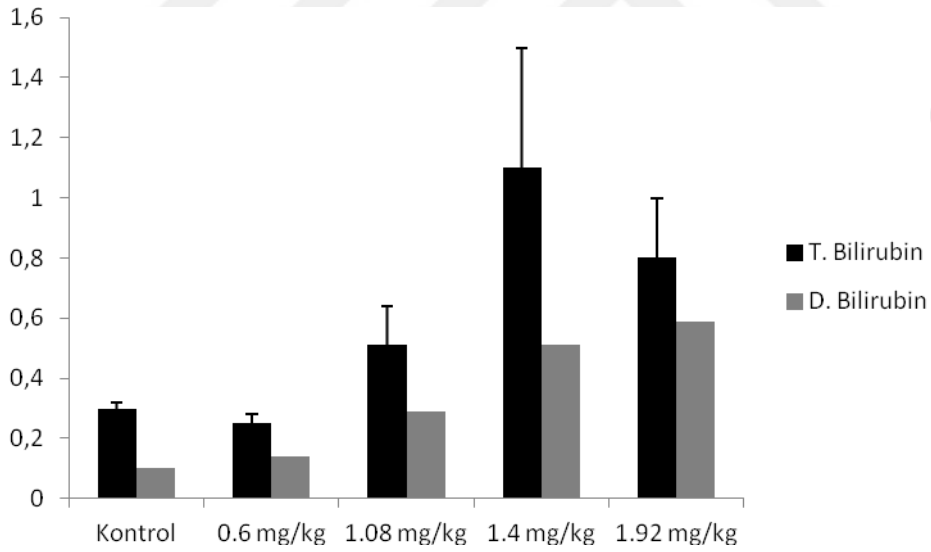
skoru ortalaması ise 2.4 ± 0.3 idi. Bu gruba ait farelerin karaciğerlerinin histomorfolojik incelemesinde karaciğer dokusunda yaygın hepatosit hasarı, yoğun periportal MNH infiltrasyonları, fokal nekroz ve sinüzoidal dilatasyonla birlikte hemorajik alanlar gözlemlendi. 48 saatlik izlemde 3 fare öldü (Tablo 9, Şekil 10, 11, 12D).

Tablo 9. Logaritmik olarak artırılan α -AMA'nın biyokimyasal parametreler ve histomorfolojik hasar skoruna etkisi

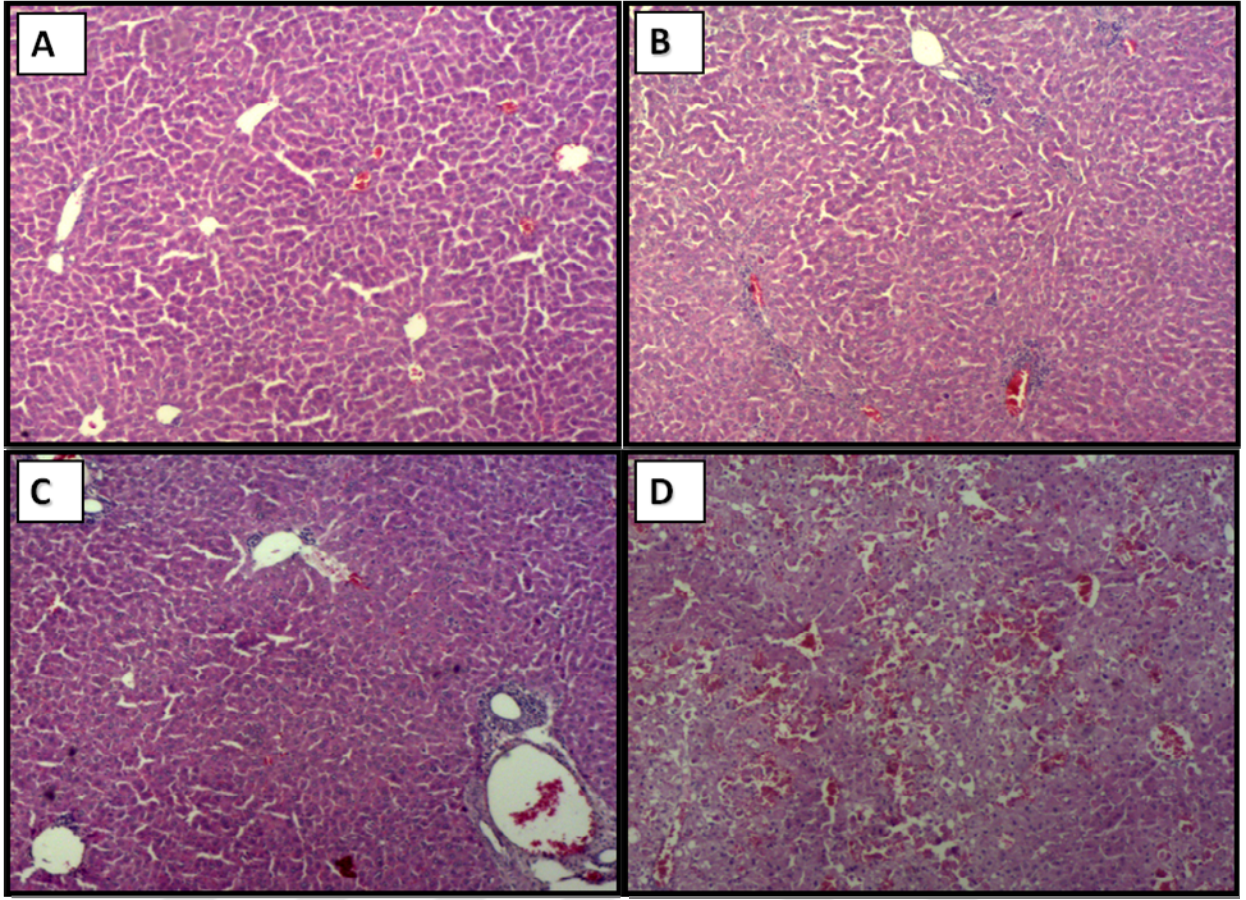
	Kontrol (n=3)	0.6 mg/kg (n=4)	1.08 mg/kg (n=10)	1.4 mg/kg (n=10)	1.92 mg/kg (n=8)
Ölçümlerin yapıldığı fare sayısı	3	4	8	7	6
AST (U/L)	75.3 $\pm$ 9.8	656.8 $\pm$ 243.5	3523.0 $\pm$ 1513.0	5267.0 $\pm$ 1201.0	9834.0 $\pm$ 2759.0
ALT (U/L)	68.0 $\pm$ 9.0	624.5 $\pm$ 214.6	2712.0 $\pm$ 988.6	4513.0 $\pm$ 1171.0	7700.0 $\pm$ 2014.0
T. bilirubin (mg/dL)	0.3 $\pm$ 0.02	0.3 $\pm$ 0.03	0.5 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.2
D. bilirubin (mg/dL)	0.1 $\pm$ 0.01	0.1 $\pm$ 0.02	0.3 $\pm$ 0.08	0.5 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.2
Histomorfolojik hasar skoru	0	1.5 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.3



Şekil 10. Logaritmik olarak artırılan α -AMA'nın AST (U/L) ve ALT (U/L) değerlerine etkisi (*), $p < 0.05$, kontrole göre anlamlılığı gösteriyor.



Şekil 11. Logaritmik olarak artırılan α -AMA'nın Total Bilirubin (mg/dL) ve Direkt Bilirubin (mg/dl) değerlerine etkisi



Şekil 12. Logaritmik olarak artırılan α -AMA'nın karaciğer histomorfolojisine etkileri)(A. 0.6 mg/kg α -AMA, B. 1.08 mg/kg α -AMA, C. 1.4 mg/kg α -AMA ve D. 1.92 mg/kg α -AMA).-

4.1.2. Çözücülerin ve Legalon®'un karaciğer üzerine etkilerinin değerlendirilmesi

Resveratrol ve silibininin çözücüsü olan DMSO, resveratrolün diğer bir çözücüsü alkol ve Legalon® gruplarında, farelerin bazal ağırlık ortalamaları arasında, farklılık yoktu. Farelerin, 48. saatte, eter anestezisi ile sakrifiye edilmeden önce ölçülen ağırlıkları ile başlangıç ağırlıkları arasındaki farklar da değerlendirildiğinde, deney grupları arasında farklılık saptanmadı. (Tablo 10).

Tablo 10. Çözücü (6 saat ve 12 saat aralıklı DMSO (Dimetil sülfoksit) ve Alkol) ve Legalon® gruplarında farelerin deney başlangıcı ve sonrasında ölçülen ağırlık ve ağırlık farkı ortalamaları

Gruplar	Deney başlangıcı (g)	Deney sonu (g)	Ağırlık farkı (%)
DMSO- 6 saat aralıklı (n=5)	24.2±0.9	24.4±0.9	3.1±1.5
DMSO- 12 saat aralıklı (n=3)	22.8±0.8	23.5±0.8	3.1±0.3
Alkol (n=3)	24.9±0.5	24.8±0.6	1.1±0.5
Legalon (n=3)	25.6±0.9	25.4±1.2	2.4±0.6

6 saat aralıklı DMSO grubu (n=5):

Farelerin AST, ALT, T. Bilirubin ve D. Bilirubin değerleri sırasıyla; 1746.0±350.0 U/L, 440.0±172.0 U/L, 0.04±0.01 mg/dL ve 0.03±0.001 mg/dL olarak ölçüldü. Karaciğer histomorfolojik skor ortalaması ise 2.2±0.4 olarak saptandı. Karaciğerlerin histomorfolojik incelemesinde, karaciğer dokusunda yaygın hepatosit hasarı, periportal MNH infiltrasyonları, bazı alanlarda fokal nekroz ve sinüzoidal dilatasyonla birlikte hemorajik alanlar gözlemlendi(Tablo 11, Şekil 13 A).

Alkol grubu (n=3):

Farelerin AST, ALT, T. Bilirubin ve D. Bilirubin değerleri sırasıyla; 2827.0±2052.0 U/L, 2072.0±1228.0 U/L, 0.4±0.6 mg/dL ve 0.2±0.07 mg/dL idi. Karaciğer histomorfolojik skor ortalaması ise 1.0±0.0 olarak saptandı. Karaciğerin histomorfolojik incelemesinde ise karaciğer dokusunda bazı kesit alanlarında periportal ve doku içinde MNH infiltrasyonları, nadir alanlarda hepatosit hasarı ve fokal nekroz ile bazı alanlarda sinüzoidal dilatasyonlar gözlemlendi (Tablo 11, Şekil 13 C).

12 saat aralıklı DMSO grubu (n=3):

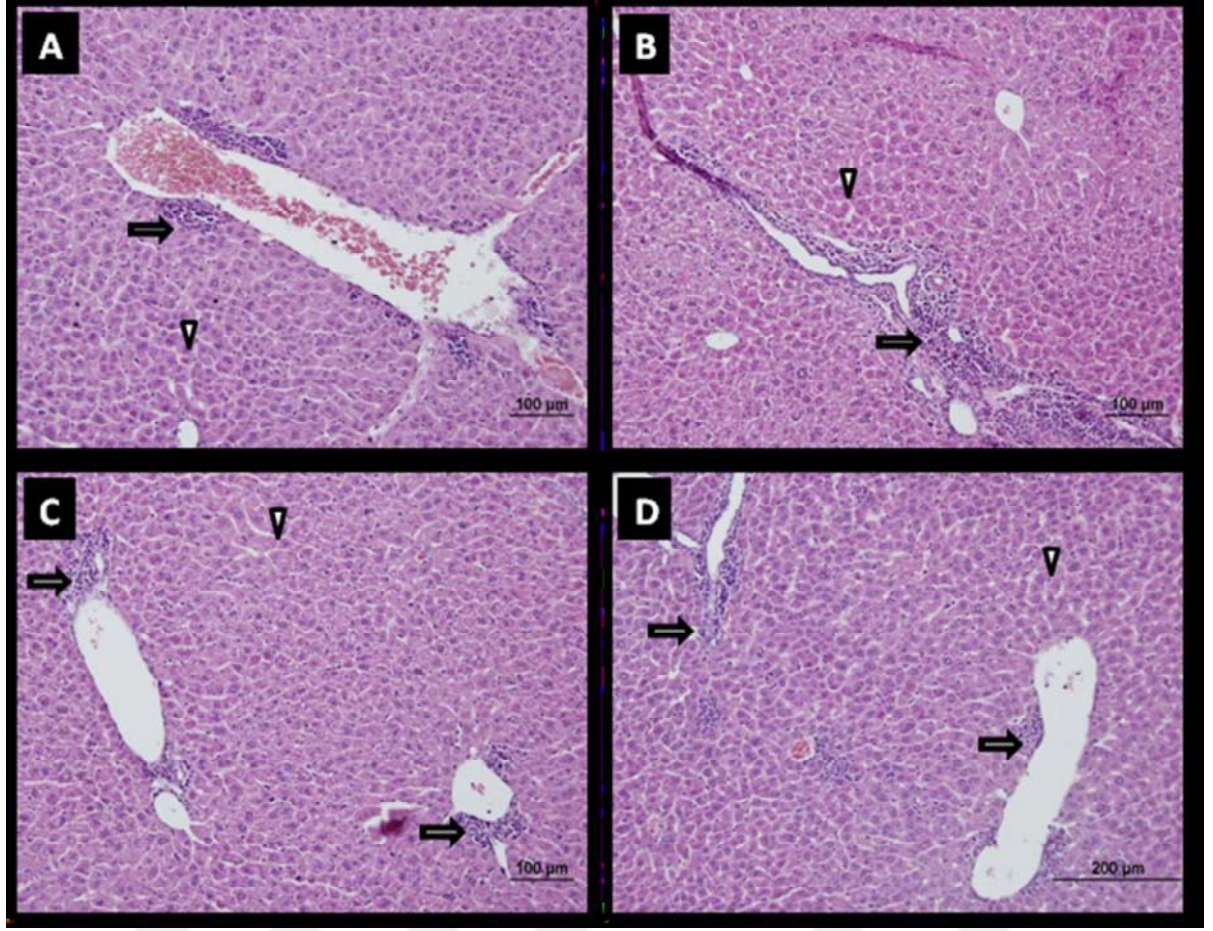
Farelerin AST, ALT, T. Bilirubin ve D. Bilirubin değerleri sırasıyla; 943.0 ± 224.0 U/L, 758.3 ± 355.1 U/L, 0.9 ± 0.3 mg/dL ve 0.2 ± 0.04 mg/dL olarak idi. Karaciğer histomorfolojik hasar skor ortalaması ise 0.7 ± 0.3 olarak saptandı. Karaciğerin histomorfolojik incelemesinde ise karaciğer dokusunda nadir alanlarda hepatosit hasarı, periportal MNH infiltrasyonları, nadir fokal nekroz ve bazı alanlarda sinüzoidal dilatasyonlar gözlemlendi (Tablo 11, Şekil 13 B).

Legalon® grubu (n=3):

Farelerin AST, ALT, T. Bilirubin ve D. Bilirubin değerleri sırasıyla; 2320.0 ± 1173.0 U/L, 1312.0 ± 832.0 U/L, 1.8 ± 0.5 mg/dL ve 0.3 ± 0.06 mg/dL olarak ölçüldü. Karaciğer histomorfolojik hasar skor ortalaması 0.7 ± 0.3 olarak saptandı. Karaciğer örnekleri histomorfolojik olarak incelendiğinde nadir alanlarda hepatosit hasarı, periportal MNH infiltrasyonları, nadir fokal nekroz ve bazı alanlarda sinüzoidal dilatasyonlar saptandı (Tablo 11, Şekil 13 D).

Tablo 1. Çözücü (6 saat ve 12 saat aralıklı DMSO (Dimetil sülfoksit) ve Alkol) ve Legalon® gruplarının biyokimyasal parametreler ve histomorfolojik hasar skoruna etkisi

	DMSO 6 saat aralıklı (n=5)	DMSO 12 saat aralıklı (n=3)	Alkol (n=3)	Legalon (n=3)
Ölçümlerinyapıldığı fare sayısı	2	3	3	3
AST (U/L)	1746.0 ± 350.0	943.0 ± 224.0	2827.0 ± 2052.0	2320.0 ± 1173.0
ALT (U/L)	440.0 ± 172.0	758.3 ± 355.1	2072.0 ± 1228.0	1312.0 ± 832.0
T. bilirubin (mg/dL)	0.05 ± 0.02	0.9 ± 0.3	0.4 ± 0.6	1.8 ± 0.5
D. bilirubin (mg/dL)	0.04 ± 0.01	0.2 ± 0.04	0.2 ± 0.07	0.3 ± 0.06
Histomorfolojik hasar skoru	2.2 ± 0.4	0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.0	0.7 ± 0.3



Şekil 13. Çözücü (6 saat ve 12 saat aralıklı DMSO (Dimetil sülfoksit) ve Alkol) ve Legalon® gruplarının histomorfolojik hasar skoruna etkisi

A: DMSO (Dimetil sülfoksit) 6 saat, B: DMSO 12 saat, C: Alkol, D: Legalon grubunda

karaciğerin histomorfolojik görüntüleri. ➡: Periportal Mononükleer Hücre infiltrasyonu,

▽: Sinüzoidal genişleme

4.2. Sonuçlar

Deney Grupları

Farelerin Ağırlık Ortalamaları

Deney gruplarında, farelerin bazal ağırlık ortalamaları arasında, farklılık yoktu. Farelerin, 48. saatte, eter anestezisi altında sakrifiye edilmeden önce ölçülen ağırlıkları ile başlangıç ağırlıkları arasındaki farklar da değeriendirildiğinde, deney grupları arasında farklılık saptanmadı. (Tablo 12).

Tablo 12. Deney gruplarında farelerin deney başlangıcı ve sonrasında ölçülen ağırlık ve ağırlık farkı ortalamaları

Deney Grupları	Deney başlangıcı (g)	Deney sonu (g)	Ağırlık farkı (%)
AMA+SF (n=16)	25.1±1.2	23.4±1.2	4.4±0.6
AMA+DMSO (n=12)	25.8±0.9	24.1±0.9	6.5±0.9
Eş Resveratrol (n=10)	25.3±0.8	22.9±0.8	8.1±2.3
12S Resveratrol (n=13)	26.8±1.0	25.3±1.2	5.3±1.0
24S Resveratrol (n=13)	26.4±0.9	25.1±0.9	5.3±1.3
Silibinin (n=13)	26.6±0.9	25.3±1.0	5.4±0.9

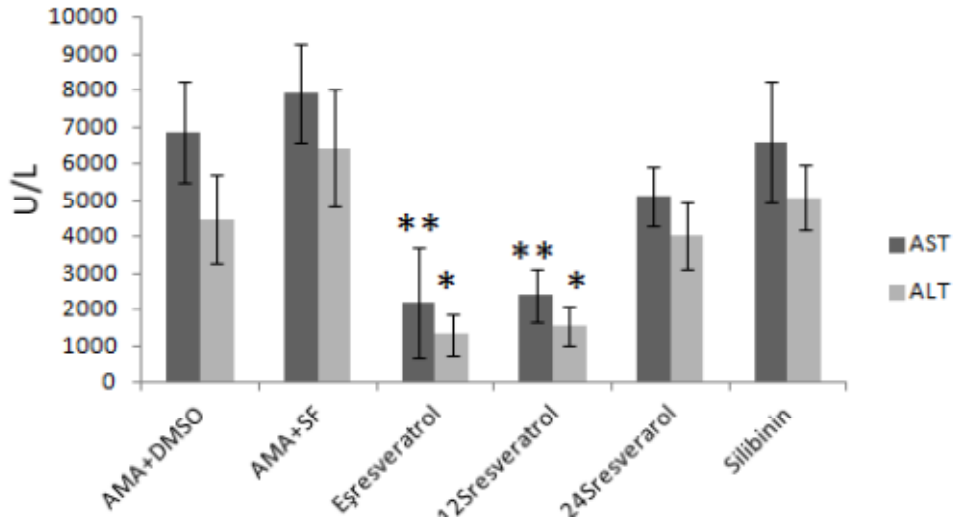
Deney Gruplarında Karaciğer Fonksiyon Testleri (AST, ALT), Total Bilirubin ve Direkt Bilirubin Değerleri Sonuçları

AST ve ALT değeri; Eş resveratrol grubunda (2191 ±281.2 U/L, 1335.0 ±570.4 U/L) ve resveratrolün α-AMA uygulamasından 12 saat sonra başlatıldığı 12S resveratrol grubunda (2403 ±726.1 U/L, 1542.0 ±537.3 U/L); α-AMA+SF grubuna (7947.0 ±1335.0 U/L, 6454.0 ±1604.0 U/L) göre anlamlı oranda azaldı (p<0.01, p<0.05 ve p<0.01, p<0.05). Silibinin

grubunda, AST 6974.0±1295.0 U/L ve ALT 5098.0±909.3 U/L olarak ölçüldü. Ölçülen bu değerler, AMA+SF grubuna göre anlamlı oranda farklılık göstermedi (Tablo 12, şekil 14).

Tablo 13. Deney gruplarında, AST ve ALT değerleri U/L (α -AMA: α -Amanitin, DMSO: Dimetil Sülfoksit, SF: %0.9 serum fizyolojik, 12S :12 saat, 24S: 24 saat)

Deney Grupları	Ölçümlerin yapıldığı fare sayısı	AST (U/L)	ALT (U/L)
α -AMA+SF (n=16)	9	7947.0±1335.0	6454.0±1604.0
α -AMA+DMSO (n=12)	7	6881.0±1375.0	4491.0±1208.0
α -AMA Eş Resveratrol (n=10)	8	2191.0±281.2	1335.0±570.4
α -AMA 12S Resveratrol (n=13)	8	2403.0±726.1	1542.0±537.3
α -AMA 24S Resveratrol (n=13)	9	5113.0±802.5	4054.0±908.9
α -AMA Silibinin (n=13)	9	6974.0±1295.0	5098.0±909.3



Şekil 14. Deney gruplarında karaciğer fonksiyon testleri AST (U/L) ve ALT (U/L) (AMA: α -Amanitin, DMSO: Dimetil Sülfoksit, SF: %0.9 serum fizyolojik, 12S :12 saat, 24S: 24 saat)

(*), (**), sırasıyla, $p < 0.05$, $p < 0.01$, AMA+SF grubuna göre anlamlılığı gösteriyor

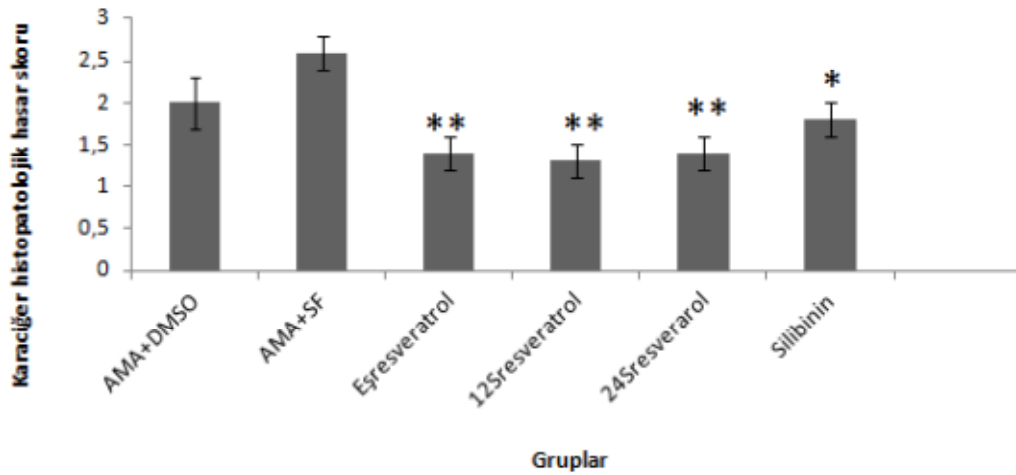
Deney gruplarında, Total bilirubin ve Direkt bilirubin düzeylerinde gruplar arasında farklılık saptanmadı (Tablo 14).

Tablo 14. Deney gruplarında, Total bilirubin (mg/dL) ve Direkt bilirubin değerleri (mg/dL) (α -AMA: α -Amanitin, DMSO: Dimetil Sülfoksit, SF: %0.9 serum fizyolojik, 12S :12 saat, 24S: 24 saat)

Deney Grupları	Ölçümlerin yapıldığı fare sayısı	Total bilirubin (mg/dL)	Direk bilirubin (mg/dL)
α -AMA +SF (n=16)	9	0.7 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.1
α -AMA +DMSO (n=12)	7	0.7 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.1
α -AMA Eş Resveratrol (n=10)	5	0.4 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.05
α -AMA 12S Resveratrol (n=13)	8	0.4 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.04
α -AMA 24S Resveratrol (n=13)	8	1.0 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.2
α -AMA Silibinin (n=13)	8	0.6 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1

4.2.1. Deney Gruplarında, Karaciğer Histomorfolojik Hasar Skoru ve Karaciğer Histomorfolojisi

Karaciğer histomorfolojik hasar skoru, eş resveratrol (1.4 $\pm$ 0.2), resveratrolün α -AMA uygulamasından 12 saat sonra başlandığı 12S resveratrol (1.3 $\pm$ 0.2), 24 saat sonra başlandığı 24S resveratrol (1.4 $\pm$ 0.2) ve silibinin (1.8 $\pm$ 0.2), gruplarında; AMA+SF grubuna (2.6 $\pm$ 0.2) göre anlamlı oranda azaldı (p<0.01, p<0.01, p<0.01 ve p<0.05) (Şekil 15).



Şekil 15. Deney gruplarında karaciğer histomorfolojik hasar skoru (α -AMA: α -Amanitin, DMSO: Dimetil sülfoksit, SF: %0.9 serum fizyolojik)

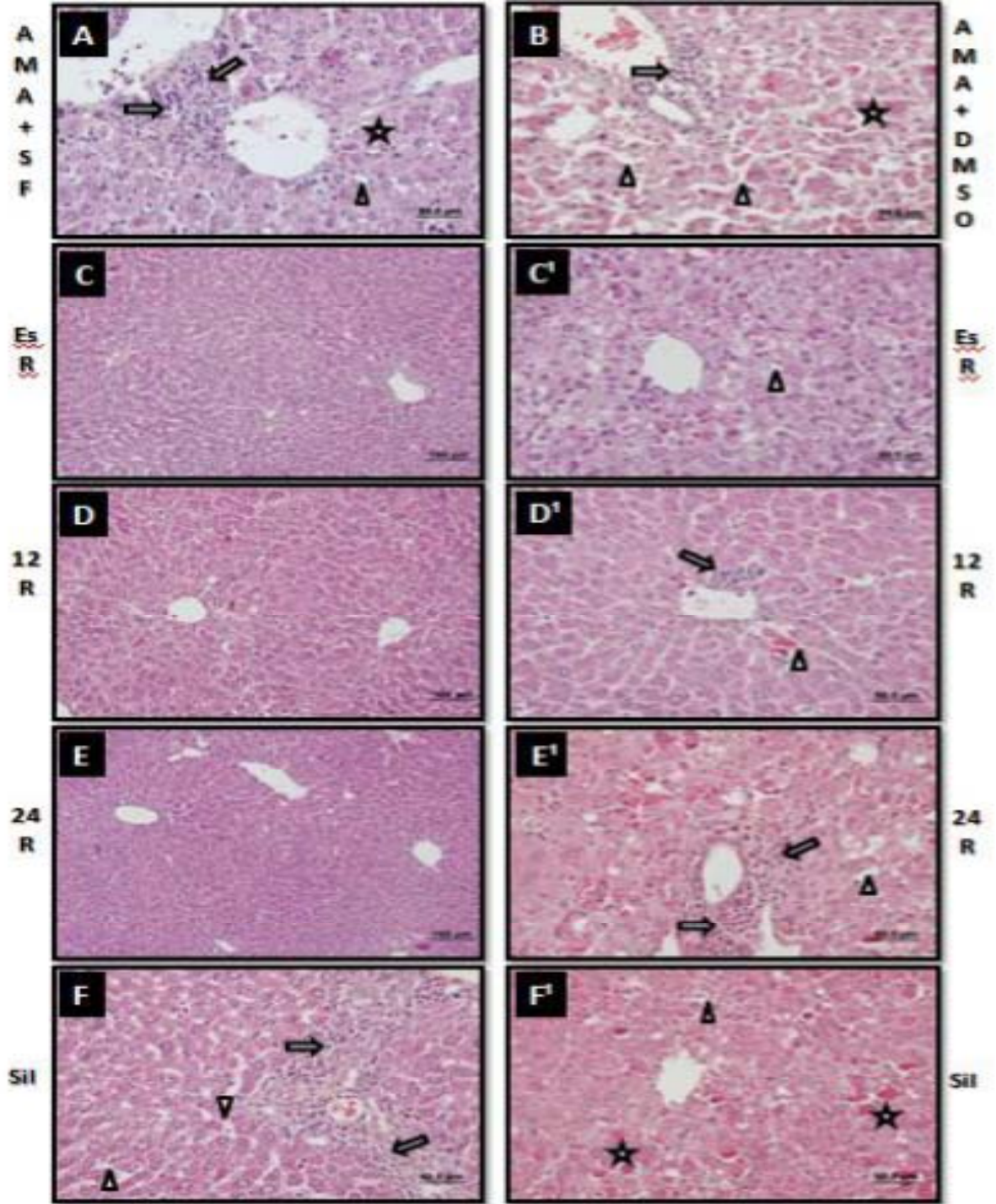
(*), (**), sırasıyla, $p < 0.05$, $p < 0.01$, α -AMA +SF grubuna göre anlamlılığı gösteriyor.

4.2.2. Deney Gruplarında Karaciğer Örneklerinin Histomorfolojik Görünümü

α -AMA+SF ve α -AMA+DMSO gruplarında, karaciğer hücre hasarı, periportal MNH infiltrasyonu, fokal nekroz, bazı farelerin karaciğer örneklerinde de yaygın karaciğer hücre nekrozu ve sinüzoidal genişlemeler gözlemlendi (Şekil 16 A, B).

Resveratrol tedavi gruplarında ise; karaciğer histomorfolojik hasar skoru ile uyumlu olarak ışık mikroskopik incelemede, karaciğer hücre hasarı, periportal MNH infiltrasyonu, fokal nekroz ve sinüzoidal genişlemeler daha azdı. Resveratrol tedavisinin 24. saatte başlatıldığı 24S Resveratrol grubunda birkaç farenin karaciğer doku örneklerinde histomorfolojik düzelme; resveratrol tedavisinin α -AMA uygulaması ile eş zamanlı olarak başlatıldığı Eş Resveratrol ve 12 saat sonra başlatıldığı 12S Resveratrol gruplarına oranla daha azdı (Şekil 16 C, C1, D, D1, E, E1).

Silibinin tedavi grubunun histomorfolojik incelemesinde ise, Resveratrol tedavi gruplarına göre, karaciğer hücre hasarı, periportal MNL hücre infiltrasyonu, fokal nekroz, sinüzoidal genişlemelerin daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 15 F, F1).



Şekil 16. Deney gruplarında karaciğer Hemotoksilen eozin boyaması ile histomorfolojik görünüm. Gruplar: A: α -AMA +SF, B: α -AMA +DMSO, C,C' :EşR, D,D' : 12R, E,E' : 24R, F,F' : Sil. $\Rightarrow$: Periportal MNL infiltrasyonu, * : hepatosit hasarı, ∇ : Sinüzoidal genişleme (α -AMA: α -Amanitin, DMSO: Dimetil sülfoksit, SF: %0.9 serum fizyolojik, R: Resveratrol, Sil: Silibinin).

4.2.3. Deney Gruplarında Antioksidan Enzim Düzeyleri

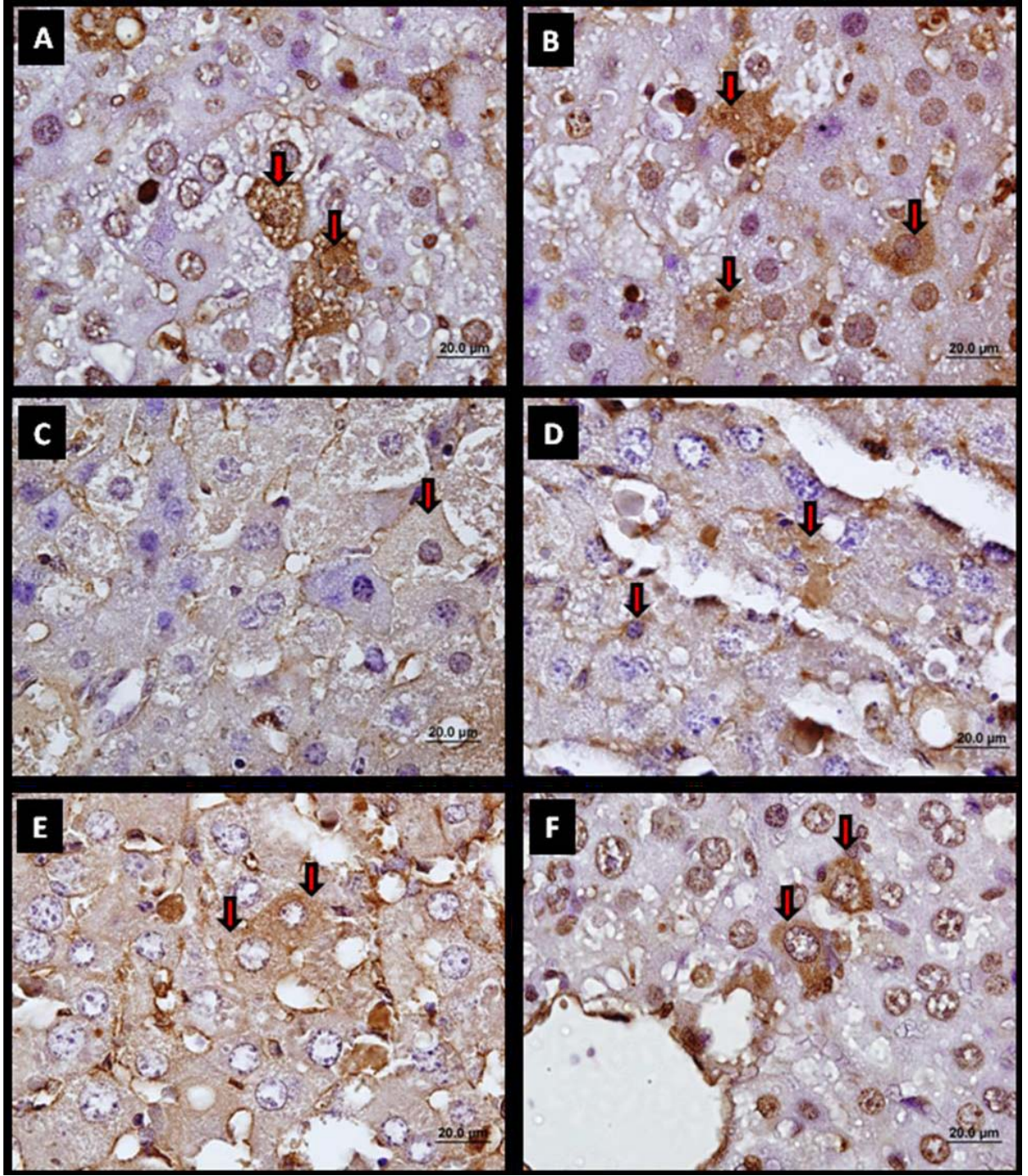
Deney gruplarında, ölçülen Malonildialdehit (MDA), Süperoksit dismutaz (SOD) ve Glutasyon değerleri arasında anlamlı farklılık yoktu. α -AMA +SF grubunda, SOD değerleri diğer deney gruplarına oranla biraz daha yüksekti ancak bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildi. (Tablo 15).

Tablo 15. Deney gruplarında antioksidan enzim düzeyleri (α -AMA: α -Amanitin, DMSO: Dimetil sülfoksit, SF: %0.9 Serum Fizyolojik, MDA: Malonildialdehit, SOD: Süperoksit dismutaz)

Deney Grupları	MDA	SOD	Glutasyon
α -AMA +SF (n=16)	0.440 $\pm$ 0.05	86.8 $\pm$ 13.2	521.8 $\pm$ 34.6
α -AMA +DMSO (n=12)	0.437 $\pm$ 0.03	50.0 $\pm$ 8.0	592.7 $\pm$ 29.5
α -AMA+Eş Resveratrol (n=10)	0.474 $\pm$ 0.04	43.5 $\pm$ 18.1	403.2 $\pm$ 55.6
α -AMA+12 S Resveratrol (n=13)	0.438 $\pm$ 0.04	54.6 $\pm$ 11.2	477.8 $\pm$ 40.8
α -AMA+24 S Resveratrol (n=13)	0.446 $\pm$ 0.04	36.5 $\pm$ 10.9	532.6 $\pm$ 34.6
α -AMA+Silibinin (n=13)	0.453 $\pm$ 0.05	42.7 $\pm$ 7.1	578.0 $\pm$ 16.2

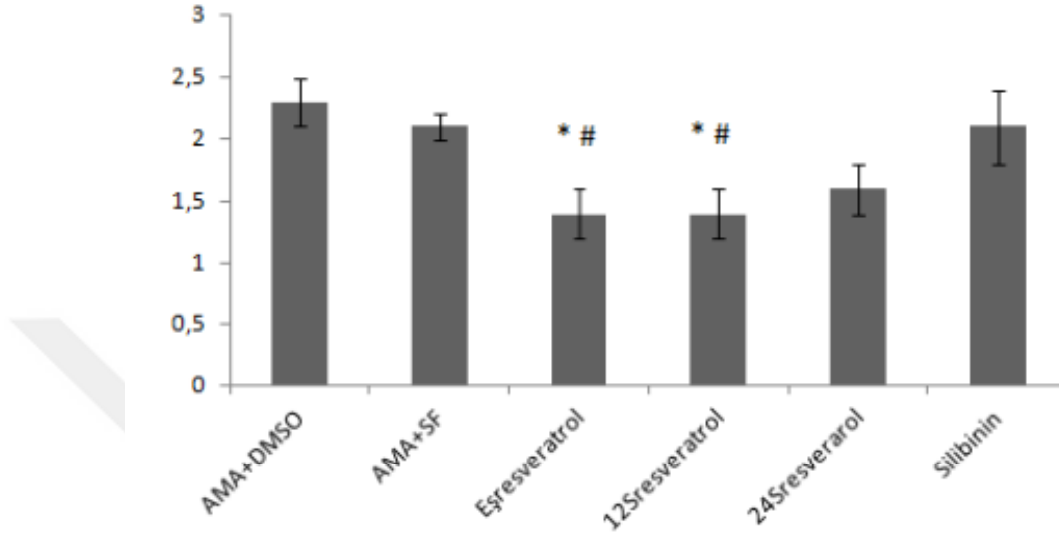
4.2.4. Deney Gruplarında İmmunhistokimyasal Değerlendirmeler

α -AMA+SF ve AMA+DMSO gruplarında perinükleer ve sitoplazmik aktif kaspaz-3 immunpozitifliği artmıştı. Resveratrol tedavi gruplarında aktif kaspaz-3 immunpozitifliğinin azaldığı, silibinin grubunda ise AMA+SF ve AMA+DMSO grubuna benzer olduğu gözlemlendi (Şekil 17, Şekil 17).



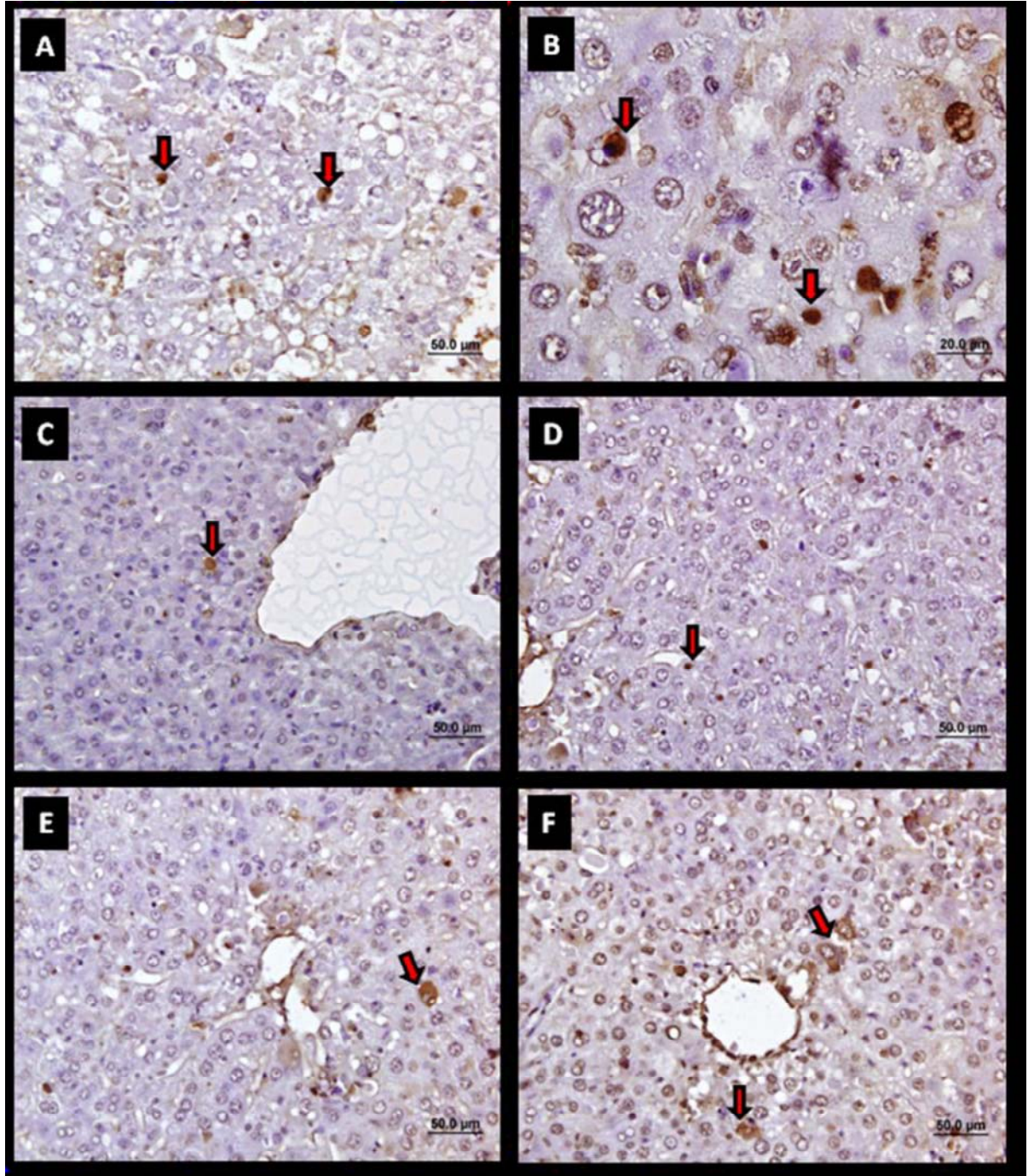
Şekil 17. Deney gruplarında, karaciğer dokusuna ait aktif kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama örnekleri. Gruplar: A: AMA+SF, B: AMA+DMSO, C: EşR, D: 12R, E: 24R, F: Sil. $\Rightarrow$: perinükleer ve sitoplazmik aktif kaspaz-3 immünopozitif tutulumu göstermektedir (α -AMA: α -Amanitin, DMSO: Dimetil sülfoksit, SF: %0.9 serum fizyolojik, R: Resveratrol, Sil: Silibinin).

Aktif kaspaz-3'ün immunohistokimyasal boyamasında, karaciğer dokusunda α -AMA +DMSO ve α -AMA+SF gruplarında immunpozitif boyanma güçlüydü. Aktif kaspaz-3 immunpozitifliği, α -AMA+DMSO (2.3 ± 0.2) grubunda, eş Resveratrol (1.4 ± 0.2) ve 12S (1.4 ± 0.2) resveratrol gruplarına göre anlamlı oranda artmıştı ($p < 0.05$) (Şekil 17, Şekil 18).



Şekil 18. Deney gruplarında, aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama skoru ortalaması (α -AMA: α -AMA, DMSO: Dimetil sülfoksit, SF: %0.9 serum fizyolojik, 12S : 12 saat, 24S: 24 saat) (*), (#), sırasıyla, $p < 0.05$, $p < 0.05$, α -AMA +SF ve α -AMA +DMSO grubuna göre anlamlılığı gösteriyor.

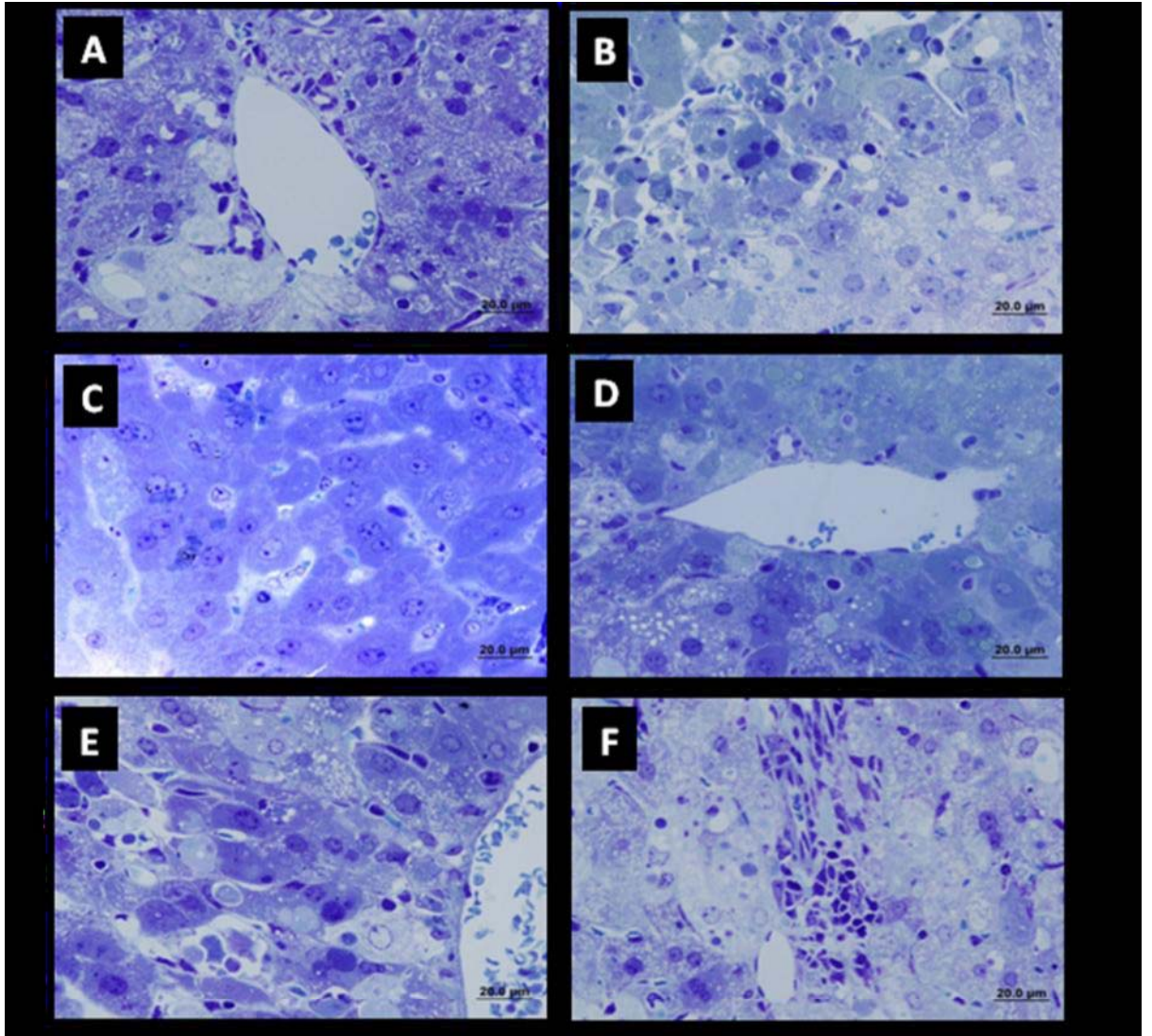
TUNEL boyamasında da benzer şekilde α -AMA +SF grubunda TUNEL pozitif hücreler artarken, resveratrol tedavi gruplarında azalmıştı. Silibinin grubunda TUNEL pozitifliği ise α -AMA +SF ve α -AMA +DMSO grubundan farklı değildi (Şekil 19).



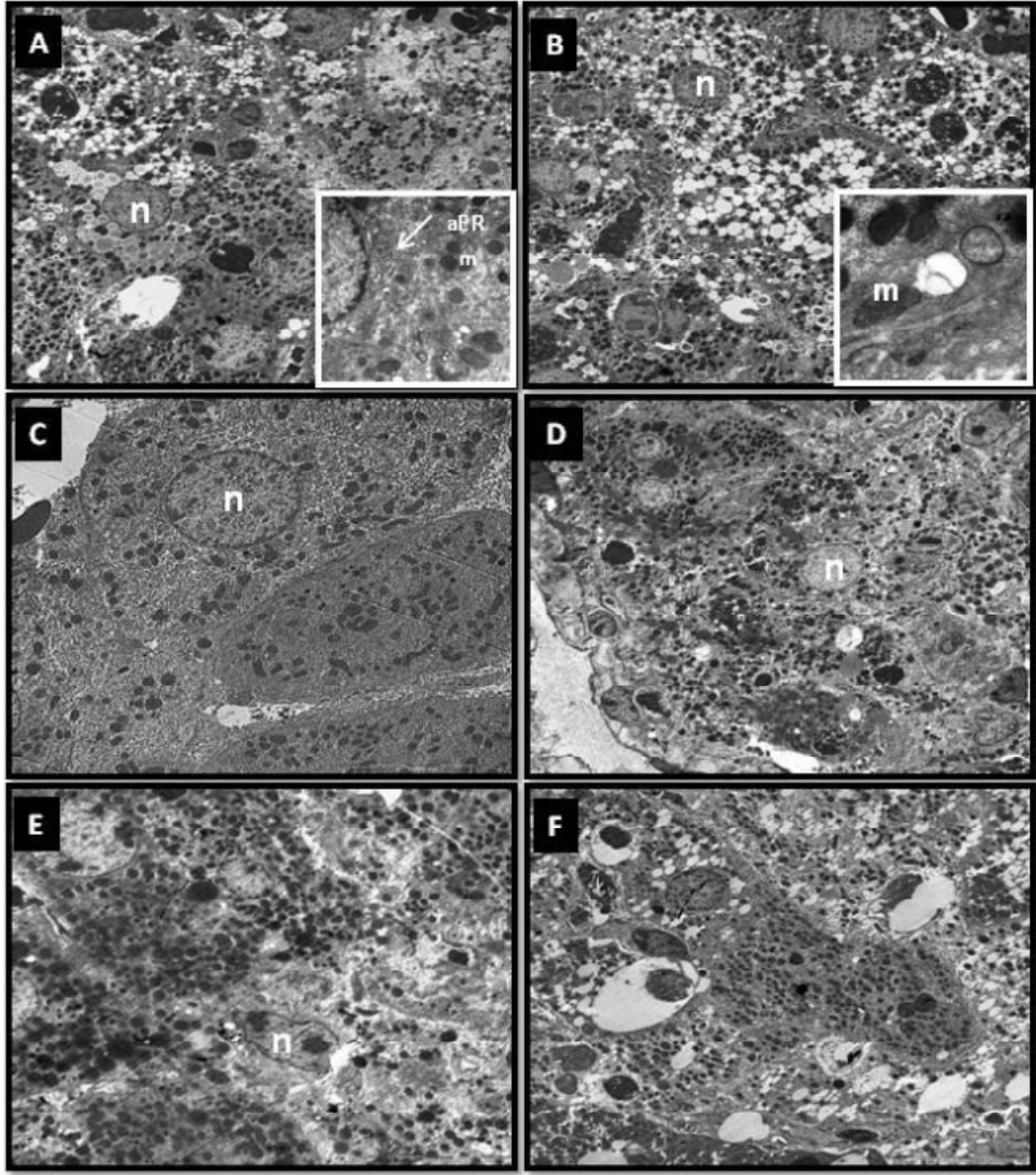
Şekil 19. Deney gruplarında, karaciğer dokusuna ait TUNEL boyama örnekleri. Gruplar: A: α -AMA +SF, B: α -AMA +DMSO, C: EşR, D: 12R, E: 24R, F: Sil. □:nükleer TUNEL tutulumunu göstermektedir (α -AMA: alfa amanitin, DMSO: Dimetilsülfoksit, SF: %0.9 serum fizyolojik, R: Resveratrol, Sil: Silibinin).

4.2.5. Deney Gruplarında Elektron Mikroskopik İncelemeler

Elektron mikroskopik incelemelerde, α -AMA+SF ve AMA+DMSO gruplarında mitokondriyal şişme ve agranüler endoplazmik retikulumda disintegrasyon ve dilatasyon, hepatosit hasarı gözlenirken, resveratrol tedavi gruplarında gözlenen bu değişikliklerin düzeldiği ve elektron mikroskopik görüntülerin silibinin grubunda ise α -AMA +SF ve α -AMA +DMSO grubuna benzer olduğu gözlemlendi (Şekil 20, 21).



Şekil 20. Elektron mikroskopik inceleme için karaciğer yarı ince kesitleri (toluidin mavisi)Gruplar: A: α -AMA +SF, B: α -AMA +DMSO, C : α -AMA+EşR, D: α -AMA+12R, E: α -AMA+24R , F: α -AMA+Sil. (α -AMA: Alfa amanitin, DMSO: Dimetilsülfoksit, SF: %0.9 serum fizyolojik, R: Resveratrol, Sil: Silibinin).



Şekil 21: Karaciğer dokusuna ait elektron mikroskop resim örnekleri. Gruplar : **A:** α -AMA +SF, **B:** α -AMA +DMSO, **C:** α -AMA+EşR, **D:** α -AMA+12R, **E:** α -AMA+24R , **F:** α -AMA+Sil. Hepatosit çekirdekleri (n), agranüler endoplazmik retikulum (aER), golgi aygıtı, ribozom, mitokondri (m), glikojen partikülleri ve lizozomlar (AMA: Alfa amanitin, DMSO: Dimetilsülfoksit, SF: %0.9 serum fizyolojik, R: Resveratrol, Sil: Silibinin).

5. TARTIŞMA

Ölümle sonlanan ciddi zehirlenmelere neden olan *Amanita phalloides* türü mantarların içeriğindeki Alfa Amanitin (α -AMA), gastrointestinal sistem epitel hücreleri, böbrek proksimal tubul hücrelerini de etkilese de ana hedefi karaciğer hücreleridir ve bu tür mantarlara bağlı gelişen karaciğer toksisitesi morbidite ve mortaliteden sorumludur (23). Çalışmamızda, α -AMA ile oluşan karaciğer toksisitesi üzerinde resveratrolün *in vivo* karaciğer toksisite modelinde etkileri incelenmiş ve klinikte antidot olarak kullanılan silibinin ile karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda, farelerde α -AMA ile karaciğer toksisite modeli oluşturulmuş ve resveratrolün farelerde α -AMA ile gelişen karaciğer toksisitesini azalttığı sonucuna varılmıştır. Klinik olarak, α -AMA ile zehirlenmelerde gelişen karaciğer toksisitesinde, antidot olarak kullanılan silibinin ise karaciğer dokusunda histomorfolojik olarak bir miktar iyileşme yapmasına karşın, gözlenen iyileşme biyokimyasal parametrelere yansımamıştır.

Deneyisel toksisite modelimiz, literatürde daha önce uygulanmış deneySEL protokoller kaynak alınarak oluşturuldu(41). Öncelikle, literatürde α -AMA uygulanan farelerin yarısında ölüme neden olduğu bildirilen LD₅₀ (0.6 mg/kg) intraperitonel (i.p.) yolla 4 fareye uygulandı. Ancak bizim deneySEL koşullarımızda, bu dozda ölüm gözlenmedi ve bir tedavinin etkililiğini değerlendirmek için yeterli oranda karaciğer toksisitesi oluşmadı. Bunun üzerine literatürde α -AMA için bildirilen LD₅₀ logaritmik olarak artırıldı. Karaciğer hasarının göstergesi olarak kabul ettiğimiz karaciğer fonksiyon testleri (AST, ALT), logaritmik olarak artırarak uyguladığımız α -AMA dozlarıyla orantılı olarak yükseldi. Total Bilirubin ve Direkt Bilirubin değerlerinde de yükselme olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık saptanmadı. Logaritmik olarak artırdığımız dozlarda da LD₅₀ bulunamadı. Deneyde kullanılacak fare sayısını artırmamak için de daha yüksek dozlarda deneme yapılmadı ve kontrol grubuna göre anlamlı oranda AST ve ALT yüksekliğine neden olan 1.4 mg/kg (i.p.) α -AMA deney gruplarımızda karaciğer toksisitesi oluşturmak için kullanıldı.

Klinik pratikte serum aminotransaminaz düzeylerinde progresif artış karaciğer toksisitesi tanısı koymada ve şiddetini göstermede en sık kullanılan parametrelerdir (76). Karaciğer nekrozunu değerlendirmede kullanılan en geçerli yöntemler de öncelikle AST ve ALT değerlerinde, sonra da safra sentezinin de bozulması nedeni ile Total bilirubin ve Direk bilirubin değerlerinde yükselmedir. Çalışmamızda, AST ve ALT değerlerinde yükselme gözlemledik. Ancak bilirubin değerlerinde kontrole göre ılımlı yükselme olsa da anlamlılık saptamadık. Bunun nedeni olarak deney protokolümüzün 48 saat olması ve bilirubin artışının hepatosit hasarına sekonder olarak daha geç dönemde yükselmeye başlaması gösterilebilir (96-98). Ek olarak, çalışmamızda, AST ve ALT yüksekliği dışında histomorfolojik olarak da karaciğer hasar skorunda anlamlı yükselme gözlememiz ve karaciğer nekrozunu göstermemiz, α -AMA'nın karaciğer toksisitesi oluşturduğunun güçlü kanıtlarıdır. Nekroz, canlı organizmalarda hücre ölümünün göstergesidir. Toksik maddeler de, nekroz gelişimine neden olan etkenler arasındadır. Biz de çalışmamızda, α -AMA'nın doz ile orantılı şekilde nekroza neden olduğunu dolayısı ile ciddi oranda karaciğer toksisitesi oluşturduğunu gösterdik (99). Bir tedavinin etkililiğini değerlendirebilmek için biyokimyasal olarak AST ve ALT değerlerinde yükselme ve histomorfolojik olarak da yeterli oranda karaciğer hasarı yaptığını doğruladığımız, 1.4 mg/kg'lık α -AMA dozunu deney gruplarımızda kullandık.

LD₅₀'nin, bizim koşullarımızda literatürle uyumlu olmaması, deney hayvanları arasındaki farklılıklar, mevsim, kullanılan yem gibi farklı nedenlere bağlı olabilir.

Dündar ve arkadaşları, *in vivo* çalışmalarında, 0.2 mg/kg, 0.6 mg/kg ve 1 mg/kg dozlarda α -AMA uygulaması ile dozla artan oranda, histomorfolojik hasar ve katalaz, glutatyon peroksidaz, malonildialdehit (MDA) gibi oksidatif stres parametrelerinde bozulma gözlemişlerdir (53). Ergin ve arkadaşlarının α -AMA'nın böbrek üzerine etkilerini değerlendirdikleri çalışmada da, farelerde artan dozlarda α -AMA uygulaması ile 48. saatte hiçbir dozda ölüm gözlememeleri de farklı koşullarda LD₅₀'nin değişebileceğini göstermektedir (100).

α -AMA'nın temel olarak etkilediği organ karaciğerdir. α -AMA, karaciğer hücrelerinin sinuzoidal membranında yer alan organik anyon transporter peptid (OATP)1B3 adı verilen taşıyıcı proteinlerle hücre içine girdikten sonra toksisite ve hücre ölümüne neden olur (25). Toksisite gelişiminde, bilinen en temel mekanizma, α -AMA'nın karaciğer hücre nükleusunda yer alan RNA polimeraz II'yi inhibe edip mRNA sentezlenmesini engelleyerek DNA

transkripsiyonunu önlemesi ve protein sentezini durdurarak karaciğer hücre nekrozuna yol açmasıdır (26). α -AMA'nın TNF- α 'ya sinerjistik etkisi ile apoptozisi indüklemesi ve serbest oksijen radikallerini (SOR) artırarak oksidatif hasar oluşturmaya da geçerli diğer mekanizmalardır (52, 54). α -AMA'nın süperoksit dismutaz (SOD) ve Malondialdehiti (MDA) artırıp katalaz düzeyini azaltmasına bağlı oksidatif hasarı indükleyebileceği de bildirilmektedir (54). Bu nedenle α -AMA'ye bağlı karaciğer toksisitesinin tedavisinde etkili antidot geliştirmek için yapılan çalışmalarda temel olarak iki amaç vardır:

- Birincisi, α -AMA'nın karaciğer hücrelerine girişini engellemek
- İkincisi, α -AMA'nın oluşturduğu patofizyolojik değişiklikleri önleyerek karaciğer hücrelerinin canlılığını koruyabilmektir.

Biz çalışmamızda, α -AMA'ye bağlı karaciğer toksisitesi gelişiminde patofizyolojik değişiklikleri geri döndürebileceğini düşündüğümüz resveratrolü kullandık.

Deney gruplarında kullanacağımız resveratrol ve resveratrolün etkisini karşılaştırdığımız karaciğer toksisitesinde antidot olarak kullanılan silibininin ortak çözücüsü Dimetil sülfoksit (DMSO) olduğundan öncelikle, 5 farede 6 saat aralıklarla tek başına DMSO uyguladık. 6 saat aralıklı olarak 48 saat boyunca uygulanan DMSO, bu grupta fare sayısı düşük olduğu için istatistiksel değerlendirme yapılamamış olsa da AST ve ALT değerlerini kontrol kabul ettiğimiz herhangi bir müdahale yapılmamış farelerin AST ve ALT değerlerine göre yükseltti. Histomorfolojik olarak da çok az da olsa karaciğer hasarı gösterildi. Bunun üzerine, B planımızda da belirttiğimiz gibi deney gruplarında, resveratrolü etil alkolde çözmeyi düşünerek, etik kuruldan ek fare talep ederek, 48 saat boyunca 12 saat aralıklarla etil alkol uyguladık. Ancak alkol, yine gruptaki fare sayısı düşük olduğu için istatistiksel olarak analizi yapılamamış olsa da, 6 saat aralıklarla 48 saat boyunca uygulanan DMSO'dan daha fazla karaciğer hasarına neden oldu. Diğer bir deney grubumuzda da DMSO, 12 saat aralıklı olarak 48 saat boyunca uyguladığında ise karaciğer hasarının 6 saat aralıklı DMSO uygulamasına göre daha az olduğunu gözlemledik.

DMSO, pek çok maddenin çözünmesinde kullanılan renksiz ve sıvı özellikli önemli bir polar çözücüdür. SOR bağlayıcı kapasitesi nedeniyle aynı zamanda antiinflamatuvar özellikleri de vardır (101-104). Parasetamol, karbontetraklorür (CCl_4), kloroform gibi etkenlere bağlı gelişen karaciğer toksisitesinde koruyucu özellikleri gösterilmiş olsa da karaciğer üzerine

toksik olduğuna dair yayınlar da bulunmaktadır (105-107). Sıçanlarda, DMSO'in dozla artan oranda karaciğerde histomorfolojik hasar oluşturduğu gösterilmiştir (108). İnsan ve sıçan karaciğer hücre kültürlerinde de, karaciğer üzerinde hafif toksik bulgulara neden olabileceği bildirilmiştir (109). Biz de benzer şekilde resveratrol ve silibinin çözücüsü olarak kullanmayı planladığımız DMSO'in artan sıklıkta uygulanması ile karaciğer üzerinde hasarı artırdığını gözlemledik. Bunun üzerine, insanlarda α -AMA'e bağlı zehirlenmelerde antidot olarak kullanılan ve içeriğinde silibinin olan ticari preparat Legalon'u silibinin yerine kullanmayı düşündük. Legalon'un 6 saatlik aralıklı uygulamalarının karaciğer üzerine etkisini değerlendirdiğimiz 3 farelik grupta da tek başına Legalon'un da karaciğer üzerine 6 saat aralıklı uygulanan DMSO'ya yakın hasara neden olduğunu gözlemledik. Literatürde daha önce Legalon'un deneysel modellerde tek başına karaciğer üzerinde etkisinin ya da karaciğer toksisitesi üzerine etkisinin değerlendirildiği çalışmalara rastlamasak da Legalon®'un zaten α -AMA'e bağlı gelişen karaciğer toksisitesinde tedavi etkililiğinin kanıt değerinin de düşük olduğu bildirilmektedir (40).

Tüm bu sonuçlarımız göz önünde bulundurulduğunda, 12 saat aralıklarla uygulanan DMSO, 6 saat aralıklı uygulanan DMSO'den daha az oranda karaciğer hasarı oluşturduğu için biz de deney gruplarımıza α -AMA uygulamasından sonra 12 saat aralıklı olarak uygulanan DMSO grubunu ekledik. Bu grubu eklememizin gerekçesi, α -AMA uygulaması sonrası aralıklı olarak uygulanan DMSO'in karaciğer üzerine etkisini değerlendirmektir. Aslında deney gruplarımızda Resveratrol tedavisini, α -AMA ile eş zamanlı, α -AMA uygulaması sonrası 12. saatte ve α -AMA uygulaması sonrası 24. saatte uyguladığımız üç farklı tedavi grubu bulunmaktaydı. Silibinin uygulamaları ise 6 saat aralıklarla toplam 7 kez tekrarlanmıştı.

Çalışmamızda, pek çok karaciğer toksisite modelinde gelişen toksik etkileri geri döndürmede etkili olduğu gösterilen resveratrolün α -AMA'e bağlı karaciğer toksisitesi üzerinde etkisi değerlendirildi. Karaciğer toksisitesini önlemede etkili olduğu pek çok çalışmada bildirilen, 30 mg/kg'lık resveratrol dozu 12 saat aralıklarla uygulandı. Resveratrol ne kadar erken uygulanmaya başlarsa, karaciğer toksisitesini tedavi edici etkisinin o kadar iyi olduğu, yükselen karaciğer fonksiyon testleri (KCFT)'nin ve histomorfolojik karaciğer hasar skorunun kontrol grubuna göre anlamlı oranda azalması ile gösterildi.

Resveratrol tedavisinin α -AMA uygulaması ile eş zamanlı olduğu ve 12 saat sonra uygulandığı gruplarda, hem KCFT hem de histomorfolojik hasar skoru, kontrol grubuna göre düşük bulundu. Literatürde, resveratrolün; aralarında parasetamol, CCl₄ ve alkolün de aralarında olduğu pek çok *in vivo* deneysel modelde gelişen karaciğer toksisite modelinde koruyucu etkili olduğu gösterilmiştir. Resveratrolün deneysel modellerde oluşturduğu karaciğer üzerindeki koruyucu etkiliğinin ise antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi ile gerçekleştirdiği bildirilmektedir (6, 74-76, 78).

Unstabil özellikli serbest radikallerin oksijen türevlerine SOR ya da oksidan maddeler denilir. Bu maddeler, hücre membranında yer alan lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın yapısını, hedef moleküllerden elektron alma özellikleri ile bozarak etkiler ve hücre hasarına neden olur. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve katalaz gibi enzimler; oksidan maddelere bağlı gelişen oksidatif stres dengelemeye çalışır. Seruloplazmin, transferrin, indirgenmiş glutatyon (GSH), askorbik asit (vitamin C) ve alfa-tokoferol ise antioksidan maddeler arasında yer alır. Oksidatif stres, oksidan ve antioksidan dengenin oksidan lehine kayması sonucu hücre hasarının oluşmasıdır (110, 111). Dolayısıyla bu parametrelerin hem *in vivo* hem de *in vitro* düzeyde ölçümü, hastalıkların patofizyolojisini tanımlama ile tedavi yaklaşımını belirlemede önemli bir role sahiptir. Biz de çalışmamızda deney gruplarında, karaciğer doku homojenatlarından antioksidan enzimlerden SOD, antioksidan maddelerden GSH ve lipid peroksidasyonu ürünlerinden MDA düzeylerini ölçtük. Resveratrolün, karaciğer hasarına bağlı yükselen oksidatif stres parametrelerinde, kontrol grubuna göre değişikliğe neden olmadığını gösterdik. MDA düzeyinde gruplar arasında birbirine yakın sonuçlar elde ettik. Bununla birlikte, resveratrol ile tedavi edilen gruplarda SOD düzeyleri α -AMA grubuna kıyasla azalma eğilimi göstermesine rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ayrıca, resveratrol grubunda, resveratrolün uygulanma süresiyle orantılı olarak, AMA+SF grubuna kıyasla, glutatyon düzeylerinde bir düşüş gözlemledik fakat bu sonuç da istatistiksel olarak anlamlı değildi. Aslında yapılmış olan pek çok çalışmada, resveratrolün pek çok toksisite modelinde antioksidan etkileri olduğu bildirilmektedir. Ancak bu modellerde ya uzun süreli resveratrol uygulamaları ya da resveratrolün toksik madde verilmeden önce uygulanması söz konusudur (75, 112, 113). Bizim ise iki günlük deney protokolümüz sürecinde uyguladığımız total resveratrol dozu düşüktür.

Çalışmamızda, kontrol grubuna göre, resveratrolün α -AMA uygulanmış farelerde, antioksidan enzim düzeylerinde değişikliğe neden olmamış olması, bizim deneysel modelimizde α -AMA'ye bağlı karaciğer toksisitesini önlemede antioksidan etki göstermediğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda histomorfolojik olarak, α -AMA+SF ve α -AMA+DMSO gruplarında, karaciğer hücre hasarı, periportal mononükleer hücre (MNH) infiltrasyonu, fokal nekroz, bazı farelerin karaciğer örneklerinde de yaygın karaciğer hücre nekrozu ve sinüzoidal genişlemeler gözlemlendi. Resveratrol tedavi gruplarında ise karaciğer hücre hasarı, periportal MNH infiltrasyonu, fokal nekroz ve sinüzoidal genişlemeler daha azdı. Dolayısı ile resveratrol tedavisi α -AMA'ye bağlı karaciğerde gözlenen histomorfolojik hasarı azalttı.

Nekroz, apoptozis gibi, canlı organizmalarda hücre ölümüne neden olan bir süreçtir. Klasik hücre ölümü olan nekrozda, hipoksi ya da çeşitli toksik etkenlere bağlı olarak hücrelerin şişerek parçalanması sonucu etrafa saçılan lizozomal enzimler inflamatuvar süreçleri başlatır. Resveratrolün, CCl_4 'e bağlı gelişen karaciğer fibrozisinde, Akt/NFkB'yi indükleyerek antiinflamatuvar etkili olduğu, ayrıca nonalkolik karaciğer hastalığında ve sıçanlarda yağlı karaciğerde de antiinflamatuvar etkili olduğu bildirilmiştir (113-115). Ayrıca resveratrolün hücre kültürü çalışmalarında, hemorajik şokta karaciğer hücre kültüründe, hipoksiye bağlı gelişen nekrozda, NF-kB' ve p53 supresyonu yaparak antiinflamatuvar etkili olduğu da bildirilmiştir (116). Dolayısı ile resveratrolün pek çok hücrede olduğu gibi karaciğer hücresinde gelişen patolojilerle de antiinflamatuvar etkisi vardır. Histomorfolojik olarak resveratrol tedavi gruplarında, MNH infiltrasyonunda azalma gözlenmesi, α -AMA'ye bağlı karaciğer toksisitesinde resveratrolün antiinflamatuvar mekanizma ile etki gösterdiğini düşündürmektedir. Biz çalışmamızda, serum NF-kB ya da inflamasyonu doğrulayabilecek İnterlökin (IL-1, IL-6) seviyelerinde ölçüm yapmadık. Ancak resveratrolün antiinflamatuvar etkisini, α -AMA'ye bağlı gelişen karaciğer dokusunda MNH infiltrasyonunun azaltmış olmasıyla gösterdik.

Resveratrol tedavisi, aktif kaspaz-3 immunopozitifliğinde, eş resveratrol ve 12S resveratrol gruplarında, α -AMA+DMSO grubuna göre anlamlı oranda azalmaya neden oldu. Kaspaz-3 immunopozitifliği AMA+SF grubunda da α -AMA+DMSO grubuna yakın olsa da, bu grupta resveratrol tedavi grubuna göre istatistiksel anlamlılığa rastlanmadı.

Apoptozis, çeşitli fizyolojik ve patolojik etkenlere bağlı olarak gen ve enzimlerin aktivasyonuna neden olan bir süreçtir. Bcl-2 onkoproteininin ve p53 proteininin apoptozis gelişimine katkısı bulunmaktadır. Enerji gerektiren ve hücre ölümüne neden olan fizyolojik bir mekanizma olan apoptoziste, belirli hücreler etkilenir. DNA; DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanır. Bunun dışında, Ces-1 ve Ces-2 gibi spesifik genler de apoptozisi uyarır. Elektron mikroskopi ve TUNEL tekniği, hücrede apoptozisi belirlemede kullanılan yöntemlerdir. Ayrıca, apoptoziste görülen değişiklikler, kaspazların aktivasyonu ile de belirlenir. Kaspaz-3, apoptotik etkilerden sorumludur ve hücrelerde en sık bulunan kaspazdır. Çalışmamızda, α -AMA'nın apoptozise neden olduğunu ve resveratrol tedavisinin de α -AMA ile eş zamanlı uygulandığında ve α -AMA sonrası 12 saat sonra uygulandığında apoptozisi engellediğini elektron mikroskopik olarak ve immunhistokimyasal boyamalar ile gösterdik. Dolayısıyla α -AMA, karaciğer hücresinde apoptozisi artırdı ve resveratrol tedavisi ise α -AMA'ye bağlı karaciğer hücresinde gelişen apoptozisi azalttı. Deneysel çalışmalarda da, resveratrolün, antiapoptotik etkileri bildirilmiştir. Resveratrolün, streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanların karaciğerinde apoptozisi önlediği ve diyabete bağlı yükselmiş Bax ve p53 biyobelirteçlerini azalttığı gösterilmiştir. Roy ve arkadaşları da CCl₄ ile gelişen karaciğer toksisitesinde resveratrolün, apoptozisi önlediğini bildirmişlerdir (117, 118). Primer köpek karaciğer hücre kültürlerinde de 12 saat boyunca α -AMA maruziyetinin, α -AMA konsantrasyonu ve maruz kalınan süre ile orantılı şekilde hücre canlılığında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Bir başka çalışmada da insan karaciğer hücre kültüründe, apoptozisin α -AMA'ye bağlı karaciğer toksisitesinde rolü olduğu ve apoptozisin programlı hücre ölümünde önemli rolü olan ve apoptotik belirteç olarak kabul edilen kaspaz enzimlerinden kaspaz-3 bağımlı olduğu da gösterilmiştir (119). Apoptozisin özellikle 6 saatlik maruziyet sonrasında belirgin olduğu bildirilse de, köpek karaciğer hücre kültürlerinde apoptozis ve nekrozun eş zamanlı olarak α -AMA'ye maruz kalınan süre ile konsantrasyon ile orantılı şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu nedenle hem α -AMA'nın oluşturduğu apoptozisin mekanizması ve hem de resveratrolün bu etkiyi hangi mekanizma ile geri döndürdüğünün araştırıldığı çalışmalar gereklidir.

Silibinin, *Amanita phalloides*'e bağlı gelişen karaciğer toksisitesinde antidot olarak kullanılan bir maddedir. Biz çalışmamızda silibininin, α -AMA'ye bağlı olarak histomorfolojik olarak gelişen karaciğer toksisitesi üzerine etkili olduğunu ancak bu etkinin biyokimyasal değerlere yansımadığını gözledik. Histomorfolojik olarak da, silibinin grubunda, resveratrol

tedavi gruplarına göre, karaciğer hücre hasarı, periportal MNL hücre infiltrasyonu, fokal nekroz, sinüzoidal genişlemeler daha fazla olarak bulundu. Tong ve arkadaşları da farelerde gelişen α -AMA'e bağlı karaciğer toksisitesinde, simetidin, benzilpenisilin ve tiotik asit gibi silibininin de etkili olmadığını göstermişlerdir (41). Ancak Vogel ve arkadaşları, beagle cinsi köpeklerde oluşturdukları karaciğer toksisitesinde; toksisite oluşturulmasını takiben 5-24 saat sonra 50 mg/kg silibinin uygulamasının biyokimyasal enzimleri düzelttiği ve karaciğerde nekrozu azalttığını ve silibinin grubunda ölüm olmadığını bildirmişlerdir (93).

Retrospektif bir çalışmada, 18 hastalık bir seride, *Amanita phalloides* türü mantarlarla zehirlenmelerde, mantarın yenmesi ile silibinin uygulanması arasında geçen zamanın uzunluğu ile korele şekilde karaciğer toksisitesi gelişimi bildirilmiştir. Ancak bu retrospektif çalışmada, hastaların maruz kaldıkları toksin miktarları standart değildir ve retrospektif çalışmaların sonuçları bir tedavinin etkililiğini değerlendirme açısından kanıt olarak sunulamaz (120). Bir başka çalışmada, *Amanita phalloides* türü mantar zehirlenmelerinde, silibinin tek başına ve penisilin G ile kombine olarak uygulanması durumunda etkililiği karşılaştırılmış. Çalışmada yer alan hastalardan 118 tanesi monoterapi olarak silibinin alırken 249 tanesi penisilin G ile kombine terapi almıştır. Regresyon analizi sonucunda ise mortalite ve transplantasyon oranı monoterapide %5.1, kombine terapide ise %8.8 olarak bulunmuştur. Her ne kadar etkili olduğuna dair yayınlar bulunsa da %100 etkinliği bulunmamaktadır (121).

Silibinin halen *Amanita phalloides* türü mantarlarla zehirlenmelerde, antidot olarak kullanılmaktadır. Ancak biz çalışmamızda oluşturduğumuz toksisite modelinde silibinin biyokimyasal parametreler üzerinde etkili bulmadık. Gerek deneysel çalışmalar olsun, gerek insan verilerinin değerlendirildiği çalışmalar olsun zehirlenmelerde silibininin etkililiği ile ilgili yeterli kanıtlar yoktur. Bu nedenle bu tür mantarlarla zehirlenmelerde, yeni antidotlara gereksinim vardır.

Son yıllarda α -AMA'e bağlı karaciğer toksisitesine karşı antidotal tedavi geliştirmek amacıyla yapılan birkaç çalışma literatürde yerini almıştır. Bunlardan birincisi Garcia ve arkadaşlarının polimiksin B ile yaptığı deneysel çalışmadır (122). Hem *in silico* hem de *in vivo* protokolleri içeren bu araştırmanın sonucuna göre polimiksin B'nin α -AMA'e bağlı karaciğer toksisitesine bağlı karaciğer yetmezliğinden koruyucu olduğu ve farelerin hayatta kalma oranlarını artırdığı sonucuna varılmıştır. Fakat çalışmada bir takım kısıtlılıklar bulunmaktadır. Bizim araştırmamızla karşılaştırıldığında; deney protokollerinde kullandıkları

α -AMA dozu, deneyimizde kullandığımız dozun yaklaşık dörtte biri kadardır. Biz çalışmamızda, literatüre göre oldukça yüksek doz α -AMA ile karaciğer toksisitesi oluşturmamıza rağmen, resveratrolü α -AMA'e bağlı gelişen karaciğer toksisitesini iyileştirmede etkili bulduk. Dolayısıyla daha düşük dozda α -AMA ile toksisite oluşturulması durumunda, daha da iyi sonuçlar elde edilebileceğimizi düşünmekteyiz. Bu çalışmanın diğer bir kısıtlılığı da, Polimiksin B'nin α -AMA uygulaması sonrası, sadece 4 saat sonraki etkilerinin değerlendirilmiş olması ve insanlarda gözlenen zehirlenmelere uyarlanabilecek şekilde daha geç dönemde uygulanmamış olmasıdır.

α -AMA'e bağlı karaciğer toksisitesinde yeni tedavilerin araştırılması ile ilgili yapılan bir diğer çalışma ise Kaya ve arkadaşlarının çalışmasıdır (123). Bu çalışmada, farelerde α -AMA ile oluşturulmuş *in vivo* karaciğer toksisitesi modelinde, erdosteinin karaciğer toksisitesini iyileştirici etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada da, deney protokollerinde uygulanan α -AMA dozu kullandığımız dozun üçte biri kadar olup ve erdostein toksin maruziyetinden yaklaşık 3 saat sonra uygulanmaya başlanmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada da erdosteinin α -AMA'e bağlı karaciğer toksisitesinde geç dönem iyileştirici etkisi incelenmemiştir. Bununla birlikte resveratrol, deney protokolümüzde α -AMA verilmesinden 12 saat sonra uygulandığında bile hem aminotransferazlarda hem de histomorfolojik hasar skorlarında istatistiksel olarak anlamlı iyileşme sağlamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, farelerde α -AMA ile oluşturulan karaciğer toksisite modelinde resveratrolün;

- α -AMA ile eş zamanlı ya da 12 saat sonra uygulanmasının tek başına α -AMA (α -AMA+SF) uygulanan gruba göre biyokimyasal olarak ölçülen AST ve ALT değerlerinde düzelmeye neden olduğu,
- α -AMA ile eş zamanlı ya da 12 ve 24 saat sonra uygulanmasının tek başına α -AMA (α -AMA+SF) uygulanan gruba göre karaciğer histomorfolojik hasar skorunu iyileştirdiği,
- α -AMA ile eş zamanlı ya da 12 ve 24 saat sonra uygulanmasının, α -AMA'e bağlı gelişen karaciğer hücre hasarı, periportal MNH infiltrasyonu, fokal nekroz, bazı farelerin karaciğer örneklerinde de gelişen yaygın karaciğer hücre nekrozu ve sinüzoidal genişlemeleri azalttığı,
- Antioksidan enzim düzeylerinde tek başına α -AMA (AMA+SF) uygulanan gruba göre farklılığa neden olmadığı
- Kaspaz-3, TUNEL boyamalarında uygulanma zamanı ile orantılı azalmaya neden olduğunu gösterdik.

Silibinin ise, α -AMA ile oluşturulan karaciğer toksisitesinde, α -AMA+SF grubuna göre sadece histomorfolojik olarak karaciğer dokusunda kontrole göre iyileşmeye neden oldu.

Çalışmamızda, resveratrolün ne kadar erken uygulanırsa, o kadar etkili bir şekilde karaciğer toksisitesini iyileştirdiğini, karaciğer toksisitesini iyileştirmede antiinflamatuvar etkisinin belirgin olduğunu ve α -AMA'e bağlı gelişen apoptozisi de önlediğini gösterdik.

Çalışmamızda, resveratrolü DMSO içerisinde çözdük ve 12 saatlik aralıklarla uyguladık. DMSO'in tek başına 12 saat aralıklarla uygulanması durumunda KCFT'de ılımlı da olsa yükselmeye neden olduğunu gördük. Özellikle DMSO'in de KCFT üzerinde ılımlı bir toksik etkisi olduğunun gösterilmiş olmasına karşın resveratrol tedavi gruplarında α -AMA+SF grubuna göre anlamlı oranda KCFT'de düşme ve histomorfolojik olarak da karaciğer hasarında azalma saptanması, resveratrolün α -AMA'e bağlı karaciğer toksisitesinin

iyileştirilmesinde umut vaat eden bir antidot adayı olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle, resveratrolün α -AMA'e bağı karaciğer toksisitesinde antidot olarak geliştirilmesine yönelik hedefe yönelik formülasyonlara gerek vardır.

Sonuç olarak; resveratrol, farelerde oluşturulan α -AMA'ya bağı karaciğer toksisitesinde hem histomorfolojik hem de biyokimyasal parametrelerde düzelme oluşturarak etkili oldu. Bu nedenle resveratrol, *Amanita phalloides* türü mantarlarla zehirlenmelerde yeni bir antidot adayıdır. Antidot olarak geliştirilmesine yönelik çalışmalar planlanmalıdır.



7. KAYNAKLAR

1. Jo WS, Hossain MA, Park SC. Toxicological profiles of poisonous, edible, and medicinal mushrooms. *Mycobiology*. 2014;42(3):215-20.
2. Lima AD, Costa Fortes R, Carvalho Garbi Novaes MR, Percario S. Poisonous mushrooms: a review of the most common intoxications. *Nutr Hosp*. 2012;27(2):402-8.
3. Hoffman R, Howland MA, Lewin N, Nelson L, Goldfrank L. Goldfrank's Toxicologic Emergencies, Tenth Edition: McGraw-Hill Education; 2014.
4. Alves A, Gouveia Ferreira M, Paulo J, Franca A, Carvalho A. Mushroom poisoning with *Amanita phalloides* - a report of four cases. *Eur J Intern Med*. 2001;12(1):64-6.
5. Garcia J, Costa VM, Carvalho A, Baptista P, de Pinho PG, de Lourdes Bastos M, et al. *Amanita phalloides* poisoning: Mechanisms of toxicity and treatment. *Food Chem Toxicol*. 2015;86:41-55.
6. Chan CK, Lam HC, Chiu SW, Tse ML, Lau FL. Mushroom poisoning in Hong Kong: a ten-year review. *Hong Kong Med J*. 2016;22(2):124-30.
7. Mowry JB, Spyker DA, Brooks DE, Zimmerman A, Schauben JL. 2015 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers' National Poison Data System (NPDS): 33rd Annual Report. *Clin Toxicol (Phila)*. 2016;54(10):924-1109.
8. Erguven M, Yilmaz O, Deveci M, Aksu N, Dursun F, Pelit M, et al. Mushroom poisoning. *Indian J Pediatr*. 2007;74(9):847-52.
9. Yildiztepe EA, N.H.; Demir, O.; Arici, A.; Oransay, K.; Evcim, S.; Kalkan, S.; Tuncok, Y. Analysis of 2007 Data from Dokuz Eylul University Drug and Poison Information Center. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2010;30(5):1622-30.
10. Mengs U, Pohl RT, Mitchell T. Legalon(R) SIL: the antidote of choice in patients with acute hepatotoxicity from amatoxin poisoning. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(10):1964-70.
11. Nelson LS, Lewin NA, Howland MA, Hoffman RS, Goldfrank LR, Flomenbaum NE. Goldfrank's Toxicologic Emergencies, Ninth Edition: McGraw-Hill Education; 2010.
12. Bonnet MS, Basson PW. The toxicology of *Amanita phalloides*. *Homeopathy*. 2002;91(4):249-54.
13. Himmelmann A, Mang G, Schnorf-Huber S. Lethal ingestion of stored *Amanita phalloides* mushrooms. *Swiss Med Wkly*. 2001;131(41-42):616-7.
14. Olson KR, Pond SM, Seward J, Healey K, Woo OF, Becker CE. *Amanita phalloides*-type mushroom poisoning. *West J Med*. 1982;137(4):282-9.
15. Vetter J. Toxins of *Amanita phalloides*. *Toxicon*. 1998;36(1):13-24.
16. Wieland T, Faulstich H. Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. *CRC Crit Rev Biochem*. 1978;5(3):185-260.

17. Meier-Abt F, Faulstich H, Hagenbuch B. Identification of phalloidin uptake systems of rat and human liver. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1664(1):64-9.
18. Loranger A, Tuchweber B, Gicquaud C, St-Pierre S, Cote MG. Toxicity of peptides of *Amanita virosa* mushrooms in mice. *Fundam Appl Toxicol*. 1985;5(6 Pt 1):1144-52.
19. Faulstich H, Talas A, Wellhoner HH. Toxicokinetics of labeled amatoxins in the dog. *Arch Toxicol*. 1985;56(3):190-4.
20. 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.
21. Faulstich H. New aspects of amanita poisoning. *Klin Wochenschr*. 1979;57(21):1143-52.
22. Karlson-Stiber C, Persson H. Cytotoxic fungi--an overview. *Toxicon*. 2003;42(4):339-49.
23. Ward J, Kapadia K, Brush E, Salhanick SD. Amatoxin poisoning: case reports and review of current therapies. *J Emerg Med*. 2013;44(1):116-21.
24. Magdalan J, Ostrowska A, Piotrowska A, Izykowska I, Nowak M, Gomulkiewicz A, et al. alpha-Amanitin induced apoptosis in primary cultured dog hepatocytes. *Folia Histochem Cytobiol*. 2010;48(1):58-62.
25. Letschert K, Faulstich H, Keller D, Keppler D. Molecular characterization and inhibition of amanitin uptake into human hepatocytes. *Toxicol Sci*. 2006;91(1):140-9.
26. Lindell TJ, Weinberg F, Morris PW, Roeder RG, Rutter WJ. Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by alpha-amanitin. *Science*. 1970;170(3956):447-9.
27. Graeme KA. Mycetism: a review of the recent literature. *J Med Toxicol*. 2014;10(2):173-89.
28. Yardan T, Baydin A, Eden AO, Akdemir HU, Aygun D, Acar E, et al. Wild mushroom poisonings in the Middle Black Sea region in Turkey: analyses of 6 years. *Hum Exp Toxicol*. 2010;29(9):767-71.
29. Giannini L, Vannacci A, Missanelli A, Mastroianni R, Mannaioni PF, Moroni F, et al. Amatoxin poisoning: a 15-year retrospective analysis and follow-up evaluation of 105 patients. *Clin Toxicol (Phila)*. 2007;45(5):539-42.
30. Liente C, Sorodoc L, Simionescu V. Successful treatment of an adult with *Amanita phalloides*-induced fulminant liver failure with molecular adsorbent recirculating system (MARS). *Rom J Gastroenterol*. 2005;14(3):267-71.
31. Rentsch KM. Laboratory diagnostics in acute poisoning: critical overview. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(10):1381-7.
32. Zhang S, Zhao Y, Li H, Zhou S, Chen D, Zhang Y, et al. A Simple and High-Throughput Analysis of Amatoxins and Phallotoxins in Human Plasma, Serum and Urine Using UPLC-MS/MS Combined with PRiME HLB muElution Platform. *Toxins (Basel)*. 2016;8(5).
33. Wills BK, Haller NA, Peter D, White LJ. Use of amifostine, a novel cytoprotective, in alpha-amanitin poisoning. *Clin Toxicol (Phila)*. 2005;43(4):261-7.

34. Magdalan J, Ostrowska A, Piotrowska A, Gomulkiewicz A, Podhorska-Okolow M, Patrzalek D, et al. Benzylpenicillin, acetylcysteine and silibinin as antidotes in human hepatocytes intoxicated with alpha-amanitin. *Exp Toxicol Pathol*. 2010;62(4):367-73.
35. Magdalan J, Ostrowska A, Piotrowska A, Gomulkiewicz A, Szelag A, Dziedziel P. Comparative antidotal efficacy of benzylpenicillin, ceftazidime and rifamycin in cultured human hepatocytes intoxicated with alpha-amanitin. *Arch Toxicol*. 2009;83(12):1091-6.
36. Poucheret P, Fons F, Dore JC, Michelot D, Rapior S. Amatoxin poisoning treatment decision-making: pharmaco-therapeutic clinical strategy assessment using multidimensional multivariate statistic analysis. *Toxicon*. 2010;55(7):1338-45.
37. Rainone F. Milk thistle. *Am Fam Physician*. 2005;72(7):1285-8.
38. Saller R, Brignoli R, Melzer J, Meier R. An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin. *Forsch Komplementmed*. 2008;15(1):9-20.
39. Berger KJ, Guss DA. Mycotoxins revisited: Part I. *J Emerg Med*. 2005;28(1):53-62.
40. POISINDEX® Database 2017 Truven Health Analytics Inc. MICROMEDEX(R) Healthcare Series 2017 [cited expires 3/2017].
41. Tong TC, Hernandez M, Richardson WH, 3rd, Betten DP, Favata M, Riffenburgh RH, et al. Comparative treatment of alpha-amanitin poisoning with N-acetylcysteine, benzylpenicillin, cimetidine, thiocetic acid, and silybin in a murine model. *Ann Emerg Med*. 2007;50(3):282-8.
42. Lopez AM, Hendrickson RG. Toxin-induced hepatic injury. *Emerg Med Clin North Am*. 2014;32(1):103-25.
43. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci*. 2002;65(2):166-76.
44. Navarro VJ, Senior JR. Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med*. 2006;354(7):731-9.
45. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9-19.
46. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011;283(2-3):65-87.
47. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.
48. Kelly FJ, Mudway IS. Protein oxidation at the air-lung interface. *Amino Acids*. 2003;25(3-4):375-96.
49. Dean RT, Roberts CR, Jessup W. Fragmentation of extracellular and intracellular polypeptides by free radicals. *Prog Clin Biol Res*. 1985;180:341-50.
50. Poli G, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem*. 2004;11(9):1163-82.

51. Jackson AL, Chen R, Loeb LA. Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(21):12468-73.
52. Leist M, Gantner F, Naumann H, Bluethmann H, Vogt K, Brigelius-Flohe R, et al. Tumor necrosis factor-induced apoptosis during the poisoning of mice with hepatotoxins. *Gastroenterology*. 1997;112(3):923-34.
53. Dundar ZD, Ergin M, Kilinc I, Colak T, Oltulu P, Cander B. The role of oxidative stress in alpha-amanitin-induced hepatotoxicity in an experimental mouse model. *Turk J Med Sci*. 2017;47(1):318-25.
54. Zheleva A, Tolekova A, Zhelev M, Uzunova V, Platikanova M, Gadzheva V. Free radical reactions might contribute to severe alpha amanitin hepatotoxicity--a hypothesis. *Med Hypotheses*. 2007;69(2):361-7.
55. Magdalan J, Ostrowska A, Podhorska-Okolow M, Piotrowska A, Izykowska I, Nowak M, et al. Early morphological and functional alterations in canine hepatocytes due to alpha-amanitin, a major toxin of *Amanita phalloides*. *Arch Toxicol*. 2009;83(1):55-60.
56. Magdalan J, Piotrowska A, Gomulkiewicz A, Sozanski T, Podhorska-Okolow M, Szelag A, et al. Benzylpenicillin and acetylcysteine protection from alpha-amanitin-induced apoptosis in human hepatocyte cultures. *Exp Toxicol Pathol*. 2011;63(4):311-5.
57. Bonnefont-Rousselot D. Resveratrol and Cardiovascular Diseases. *Nutrients*. 2016;8(5).
58. Rubiolo JA, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against necrosis induced by reactive oxygen species. *Biomed Pharmacother*. 2008;62(9):606-12.
59. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem*. 1997;30(2):91-113.
60. Lancon A, Hanet N, Jannin B, Delmas D, Heydel JM, Lizard G, et al. Resveratrol in human hepatoma HepG2 cells: metabolism and inducibility of detoxifying enzymes. *Drug Metab Dispos*. 2007;35(5):699-703.
61. Renaud S, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*. 1992;339(8808):1523-6.
62. Catalgol B, Batirel S, Taga Y, Ozer NK. Resveratrol: French paradox revisited. *Front Pharmacol*. 2012;3:141.
63. Colin D, Gimazane A, Lizard G, Izard JC, Solary E, Latruffe N, et al. Effects of resveratrol analogs on cell cycle progression, cell cycle associated proteins and 5fluoro-uracil sensitivity in human derived colon cancer cells. *Int J Cancer*. 2009;124(12):2780-8.
64. Gambini J, Ingles M, Olaso G, Lopez-Grueso R, Bonet-Costa V, Gimeno-Mallench L, et al. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:837042.
65. Delmas D, Aires V, Limagne E, Dutartre P, Mazue F, Ghiringhelli F, et al. Transport, stability, and biological activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1215:48-59.

66. Urpi-Sarda M, Zamora-Ros R, Lamuela-Raventos R, Cherubini A, Jauregui O, de la Torre R, et al. HPLC-tandem mass spectrometric method to characterize resveratrol metabolism in humans. *Clin Chem*. 2007;53(2):292-9.
67. Urpi-Sarda M, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Jaeger W, Miksits M, Covas MI, et al. Uptake of diet resveratrol into the human low-density lipoprotein. Identification and quantification of resveratrol metabolites by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal Chem*. 2005;77(10):3149-55.
68. Jannin B, Menzel M, Berlot JP, Delmas D, Lancon A, Latruffe N. Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem Pharmacol*. 2004;68(6):1113-8.
69. Wang LX, Heredia A, Song H, Zhang Z, Yu B, Davis C, et al. Resveratrol glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans: characterization, synthesis, and anti-HIV activity. *J Pharm Sci*. 2004;93(10):2448-57.
70. Lin HS, Ho PC. Preclinical pharmacokinetic evaluation of resveratrol trimethyl ether in sprague-dawley rats: the impacts of aqueous solubility, dose escalation, food and repeated dosing on oral bioavailability. *J Pharm Sci*. 2011;100(10):4491-500.
71. Sharan S, Iwuchukwu OF, Canney DJ, Zimmerman CL, Nagar S. In vivo-formed versus preformed metabolite kinetics of trans-resveratrol-3-sulfate and trans-resveratrol-3-glucuronide. *Drug Metab Dispos*. 2012;40(10):1993-2001.
72. Williams LD, Burdock GA, Edwards JA, Beck M, Bausch J. Safety studies conducted on high-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food Chem Toxicol*. 2009;47(9):2170-82.
73. Edwards JA, Beck M, Riegger C, Bausch J. Safety of resveratrol with examples for high purity, trans-resveratrol, resVida((R)). *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1215:131-7.
74. Wang Y, Jiang Y, Fan X, Tan H, Zeng H, Wang Y, et al. Hepato-protective effect of resveratrol against acetaminophen-induced liver injury is associated with inhibition of CYP-mediated bioactivation and regulation of SIRT1-p53 signaling pathways. *Toxicol Lett*. 2015;236(2):82-9.
75. Sener G, Toklu HZ, Sehirli AO, Velioglu-Ogunc A, Cetinel S, Gedik N. Protective effects of resveratrol against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Hepatol Res*. 2006;35(1):62-8.
76. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol*. 2003;33(2):105-36.
77. Chan CC, Lee KC, Huang YH, Chou CK, Lin HC, Lee FY. Regulation by resveratrol of the cellular factors mediating liver damage and regeneration after acute toxic liver injury. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014;29(3):603-13.
78. Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, El May M, Gharbi N, et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci*. 2007;80(11):1033-9.
79. Raal A, Pokk P, Arend A, Aunapuu M, Jogi J, Okva K, et al. Trans-resveratrol alone and hydroxystilbenes of rhubarb (*Rheum raphanticum* L.) root reduce liver damage

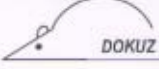
- induced by chronic ethanol administration: a comparative study in mice. *Phytother Res.* 2009;23(4):525-32.
80. McGill MR, Du K, Weemhoff JL, Jaeschke H. Critical review of resveratrol in xenobiotic-induced hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol.* 2015;86:309-18.
 81. Nicoletti NF, Rodrigues-Junior V, Santos AA, Jr., Leite CE, Dias AC, Batista EL, Jr., et al. Protective effects of resveratrol on hepatotoxicity induced by isoniazid and rifampicin via SIRT1 modulation. *J Nat Prod.* 2014;77(10):2190-5.
 82. Al Maruf A, O'Brien P. Flutamide-induced cytotoxicity and oxidative stress in an in vitro rat hepatocyte system. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:398285.
 83. Dalaklioglu S, Genc GE, Aksoy NH, Akcıt F, Gumuslu S. Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. *Hum Exp Toxicol.* 2013;32(6):662-71.
 84. Bedada SK, Neerati P. Resveratrol Pretreatment Affects CYP2E1 Activity of Chlorzoxazone in Healthy Human Volunteers. *Phytother Res.* 2016;30(3):463-8.
 85. Sehirli O, Tozan A, Omurtag GZ, Cetinel S, Contuk G, Gedik N, et al. Protective effect of resveratrol against naphthalene-induced oxidative stress in mice. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2008;71(1):301-8.
 86. Zhang W, Xue J, Ge M, Yu M, Liu L, Zhang Z. Resveratrol attenuates hepatotoxicity of rats exposed to arsenic trioxide. *Food Chem Toxicol.* 2013;51:87-92.
 87. Schadewaldt H. [The history of Silymarin. Contribution to the history of liver therapy]. *Med Welt.* 1969;20(15):902-14.
 88. Federico A, Dallio M, Loguercio C. Silymarin/Silybin and Chronic Liver Disease: A Marriage of Many Years. *Molecules.* 2017;22(2).
 89. Kroll DJ, Shaw HS, Oberlies NH. Milk thistle nomenclature: why it matters in cancer research and pharmacokinetic studies. *Integr Cancer Ther.* 2007;6(2):110-9.
 90. Polyak SJ, Morishima C, Lohmann V, Pal S, Lee DY, Liu Y, et al. Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(13):5995-9.
 91. Flora K, Hahn M, Rosen H, Benner K. Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *Am J Gastroenterol.* 1998;93(2):139-43.
 92. Frascini F, Demartini G, Esposti D. Pharmacology of silymarin. *Clinical drug investigation.* 2002;22(1):51-65.
 93. Vogel G, Tuchweber B, Trost W, Mengs U. Protection by silibinin against *Amanita phalloides* intoxication in beagles. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1984;73(3):355-62.
 94. Parasuraman S, Raveendran R, Kesavan R. Blood sample collection in small laboratory animals. *J Pharmacol Pharmacother.* 2010;1(2):87-93.
 95. Fenwick N, Griffin G, Gauthier C. The welfare of animals used in science: how the "Three Rs" ethic guides improvements. *Can Vet J.* 2009;50(5):523-30.
 96. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. II. Recommendations for use of laboratory tests in screening, diagnosis, and monitoring. *Clin Chem.* 2000;46(12):2050-68.

97. Goldfrank LR, Flomenbaum N. Goldfrank's Toxicologic Emergencies: McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2006.
98. Treinen-Moslen M. Toxic responses of liver. In: Klaassen CD, editor. Casarett and Doull's Toxicology 2001.
99. Altunkaynak BÖ, E. Programlanmış hücre ölümü apoptoz nedir? Tıp Araştırmaları Dergisi. 2008;6(2):93-104.
100. Ergin M, Dundar ZD, Kilinc I, Colak T, Oltulu P, Girisgin AS. Alpha-Amanitin Poisoning, Nephrotoxicity and Oxidative Stress: An Experimental Mouse Model. Iran Red Crescent Med J. 2015;17(8):e28068.
101. Parkin J, Shea C, Sant GR. Intravesical dimethyl sulfoxide (DMSO) for interstitial cystitis--a practical approach. Urology. 1997;49(5A Suppl):105-7.
102. de la Torre JC, Nelson N, Sutherland RJ, Pappas BA. Reversal of ischemic-induced chronic memory dysfunction in aging rats with a free radical scavenger-glycolytic intermediate combination. Brain Res. 1998;779(1-2):285-8.
103. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. Biochem Pharmacol. 2003;65(7):1035-41.
104. Essani NA, Fisher MA, Jaeschke H. Inhibition of NF-kappa B activation by dimethyl sulfoxide correlates with suppression of TNF-alpha formation, reduced ICAM-1 gene transcription, and protection against endotoxin-induced liver injury. Shock. 1997;7(2):90-6.
105. Yoon MY, Kim SJ, Lee BH, Chung JH, Kim YC. Effects of dimethylsulfoxide on metabolism and toxicity of acetaminophen in mice. Biol Pharm Bull. 2006;29(8):1618-24.
106. Kim SJ, Jung YS, Yoon MY, Kim YC. Comparative effects of dimethylsulfoxide on metabolism and toxicity of carbon tetrachloride and dichloromethane. J Appl Toxicol. 2007;27(1):25-31.
107. Lind RC, Gandolfi AJ. Hepatoprotection by dimethyl sulfoxide. II. Characterization of optimal dose and the latest time of administration for effective protection against chloroform and bromobenzene induced injury. Exp Toxicol Pathol. 1999;51(6):537-43.
108. Mathew T, Karunanithy R, Yee MH, Natarajan PN. Hepatotoxicity of dimethylformamide and dimethylsulfoxide at and above the levels used in some aflatoxin studies. Lab Invest. 1980;42(2):257-62.
109. Sumida K, Igarashi Y, Toritsuka N, Matsushita T, Abe-Tomizawa K, Aoki M, et al. Effects of DMSO on gene expression in human and rat hepatocytes. Hum Exp Toxicol. 2011;30(10):1701-9.
110. Palmieri B, Sblendorio V. Oxidative stress tests: overview on reliability and use. Part I. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2007;11(5):309-42.
111. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44-84.

112. Rivera H, Shibayama M, Tsutsumi V, Perez-Alvarez V, Muriel P. Resveratrol and trimethylated resveratrol protect from acute liver damage induced by CCl₄ in the rat. *J Appl Toxicol*. 2008;28(2):147-55.
113. Faghihzadeh F, Adibi P, Hekmatdoost A. The effects of resveratrol supplementation on cardiovascular risk factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr*. 2015;114(5):796-803.
114. Zhang H, Sun Q, Xu T, Hong L, Fu R, Wu J, et al. Resveratrol attenuates the progress of liver fibrosis via the Akt/nuclear factor-kappaB pathways. *Mol Med Rep*. 2016;13(1):224-30.
115. Pan QR, Ren YL, Liu WX, Hu YJ, Zheng JS, Xu Y, et al. Resveratrol prevents hepatic steatosis and endoplasmic reticulum stress and regulates the expression of genes involved in lipid metabolism, insulin resistance, and inflammation in rats. *Nutr Res*. 2015;35(7):576-84.
116. Powell RD, Swet JH, Kennedy KL, Huynh TT, McKillop IH, Evans SL. Resveratrol attenuates hypoxic injury in a primary hepatocyte model of hemorrhagic shock and resuscitation. *J Trauma Acute Care Surg*. 2014;76(2):409-17.
117. Pektas MB, Sadi G, Koca HB, Yuksel Y, Vurmaz A, Koca T, et al. Resveratrol Ameliorates the Components of Hepatic Inflammation and Apoptosis in a Rat Model of Streptozotocin-Induced Diabetes. *Drug Dev Res*. 2016;77(1):12-9.
118. Roy S, Sannigrahi S, Majumdar S, Ghosh B, Sarkar B. Resveratrol regulates antioxidant status, inhibits cytokine expression and restricts apoptosis in carbon tetrachloride induced rat hepatic injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2011;2011:703676.
119. Magdalan J, Piotrowska A, Gomulkiewicz A, Sozanski T, Szlag A, Dziegiel P. Influence of commonly used clinical antidotes on antioxidant systems in human hepatocyte culture intoxicated with alpha-amanitin. *Hum Exp Toxicol*. 2011;30(1):38-43.
120. Hruby K, Csomos G, Fuhrmann M, Thaler H. Chemotherapy of *Amanita phalloides* poisoning with intravenous silibinin. *Hum Toxicol*. 1983;2(2):183-95.
121. Ganzert M, Felgenhauer N, Schuster T, Eyer F, Gourdin C, Zilker T. [Amanita poisoning--comparison of silibinin with a combination of silibinin and penicillin]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2008;133(44):2261-7.
122. Garcia J, Costa VM, Carvalho AT, Silvestre R, Duarte JA, Dourado DF, et al. A breakthrough on *Amanita phalloides* poisoning: an effective antidotal effect by polymyxin B. *Arch Toxicol*. 2015;89(12):2305-23.
123. Kaya E, Yilmaz, I., Admis, O., Oktay, M., Bayram, R., Bakirci, S.,Yaykasli, K.O., Kandis, H., Saritas, A., Katirci, Y., Colakoglu, S. Effects of erdosteine on alpha amanitin-induced hepatotoxicity in mice. *Toxin Reviews*. 2016.

8. EKLER

8.1 Etik Kurul

 **DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

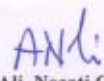
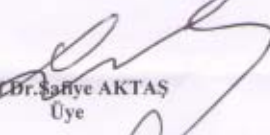
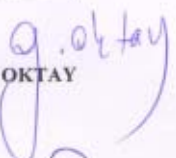
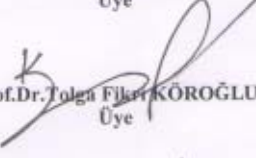
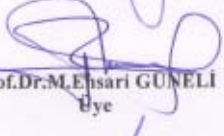
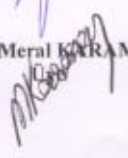
35340, Inciraltı, İzmir-232 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 03/13/2014
Toplantı Tarihi : 01 Temmuz 2014

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanlığına

44/2014 Protokol No'lu; Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Doç.Dr.M.Aylin ARICI'nın yürütücüsü olduğu "Alfa-Amanitine bağlı karaciğer toksisitesinin önlenmesinde silibinin ile resveratrolün etkinliğinin karşılaştırılması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

 Prof.Dr.Osman YILMAZ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı	 Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN Başkan Vekili
 Prof.Dr.Turna İLKNUR Üye	Prof.Dr.Ayşe GELAL Üye (topl.katılamadı)
Prof.Dr.Alper SOYLU Üye (Topl.Katılamadı)	Prof.Dr.A.Hüseyin BASKIN Üye(Topl.Katılamadı)
Prof.Dr.Hüsnü Alper BAĞRIYANIK Üye (Topl.Katılamadı)	 Prof.Dr.Saniye AKTAŞ Üye
 Prof.Dr.Gülgün OKTAY Üye	 Prof.Dr.Tolga Filiz KÖROĞLU Üye
 Prof.Dr.M.Ehsari GÜNELİ Üye	Doç.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU Üye
Doç.Dr.Türkan ERTAY Üye	Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS Üye
 Doç.Dr.Meral KIRAMAN Üye	Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMCI Üye
Zehra KINAM Üye (Topl.Katılamadı)	Vet.Hekim Adnan SERPEN Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

8.2 Özgeçmiş

Aynur ŞAHİN

TC Kimlik No:	46201375424
Doğum Yılı/ Yeri:	1982 / İSTANBUL
Yazışma Adresi :	KTÜ TIP FAKÜLTESİ FARABİ ACİL TIP AD KALKINMA MAHALLESİ- TRABZON
Telefon :	05062403190
E-posta :	dr-aynursahin@hotmail.com
Yabancı Dil ve Seviyesi:	İngilizce - 2015 YDS 72

EĞİTİM BİLGİLERİ

Mezuniyet Yılı	Okul Adı	Şehir	Öğrenim Alanı	Derece
2013-	DEÜ TIP FAKÜLTESİ	İZMİR	TOKSİKOLOJİ DOKTORA	Doktora
2007-2012	KTÜ TIP FAKÜLTESİ	TRABZON	ACİL TIP ABD	Doktora
2001-2007	KTÜ TIP FAKÜLTESİ	TRABZON	-	Lisans+ yüksek lisans

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
KTÜ TIP FAKÜLTESİ	TR	TRABZON	ACİL TIP ABD	ÖĞRETİM ÜYESİ	2015-
DR.LÜTFİ KIRDAR KARTAL EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ	TR	İSTANBUL	ACİL TIP	UZMAN	2014-2015
DR. FARUK İLKER BERGAMA DEVLET HASTANESİ	TR	İZMİR	ACİL SERVİS	UZMAN	2012-2014
GEORGIA POISON CENTRE-EMORY UNIVERSITY	ABD	ATLANTA	TOXICOLOGY	OBSERVER	2012 (1-30 MART)
KTÜ TIP FAKÜLTESİ	TR	TRABZON	ACİL TIP ABD	ARŞ.GÖR.	2007-2012

YAYINLAR

A. Uluslararası SCI/SCI Expanded hakemli dergilerde yayımlanan özgün araştırma makaleleri :

A1. Sahin A, Arici MA, Yılmaz Y, Kalkan S, Durmus N, Ergur BU, Aksu İ, Atabey N, Tuncok Y. A Comparison of the Effectiveness of Silibinin and Resveratrol in Preventing Alpha-Amanitin-Induced Hepatotoxicity. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2017 Dec 29. doi: 10.1111/bcpt.12954.

A2. Sahin A, Arıcı MA, Hocaoglu Aksay N, Kalkan S, Tunçok Y. Antivenom use in cases of bites and stings presenting to a public hospital. Ulus Travma Acil Cerrahi Dergisi.BaskıdakiMakaleler:UTD99692DOI:10.5505/tjtes.2017.99692 |

A3. Karaca Y, Cicek M, Tatli O, **Sahin A**, Pasli S, Beser MF, Turedi S. The potential use of unmanned aircraft systems (drones) in mountain search and rescue operations. Am J Emerg Med. 2017 Sep 15. doi: 10.1016/j.ajem.2017.09.025.

A4. Tatli, O. Bekar, O. Imamoglu, M. Gonenc Cekic, O. Aygun, A. Eryigit, U. Karaca, Y. **Sahin, A.** Turkmen, S. Turedi, S. Cerebral Oximetry as an Auxiliary Diagnostic Tool in the Diagnosis of Brain Death. Transplantation Proceedings Volume 49, Issue 8, October 2017, Pages 1702-1707. DOI: 10.1016/j.transproceed.2017.06.027

A5. Eryigit U, Altunayoglu Cakmak V, **Sahin A**, Tatli O, Pasli S, Gazioglu G, Karaca Y. The diagnostic value of the neutrophil-lymphocyte ratio in distinguishing between subarachnoid hemorrhage and migraine. Am J Emerg Med. 2017 Sep;35(9):1276-1280. doi: 10.1016/j.ajem.2017.03.063.

A6. Imamoglu M, Aygun A, Bekar O, Erdem E, Cicek M, Tatli O, Karaca Y, **Sahin A**, Turkmen S, Turedi S. A retrospective analysis of nebulized versus intravenous fentanyl for renal colic. Am J Emerg Med. 2017 May;35(5):757-763. doi: 10.1016/j.ajem.2017.01.026.

A7. Tatli O, Kurt NB, Karaca Y, **Sahin A**, Aygün A, Sahin E, Katipoglu B, Eryigit U, Turkmen S. The diagnostic value of serum pentraxin 3 levels in pulmonary contusion. Am J Emerg Med. 2017 Mar;35(3):425-428. doi: 10.1016/j.ajem.2016.11.030.

A8. Tatli, O., Karaca, Y., Turkmen, S., Gulgen, G., **Sahin, A.**, Eryigit, U., Fazli, O., Karaguzel, E., Mentese, A., Orem, A., Cansu, A., Turedi, S., Gunduz, A. The effect of mad honey on testosterone levels of male rats. Bratisl Med J 2016; 117 (11) DOI: 10.4149/BLL_2016_130

A9. Karaca Y, Turkmen S, Cansu A, Baki ME, Eroglu O, Tatli O, Gunaydin M, Beyhun E, Gunduz A, Eryigit U, Baydin A, Güzel M, Özşahin F, Bilir Ö, **Şahin A**, Taşın V, Kalay A, Gül O, Turedi S. A study to develop clinical decision rules for the use of radiography in wrist trauma: Karadeniz wrist rules. Am J Emerg Med.2016Nov;34(11):2074.2078.doi:10.1016/j.ajem.2016.07.013

A10. Turedi S, Erdem E, Karaca Y, Tatli O, **Sahin A**, Turkmen S, Gunduz A. The High Risk of Contrast-induced Nephropathy in Patients with Suspected Pulmonary Embolism Despite Three Different Prophylaxis: A Randomized Controlled Trial. Acad Emerg Med. 2016 Oct;23(10):1136-1145. doi: 10.1111/acem.13051

A11. Turkmen S, Cekic Gonenc O, Karaca Y, Mentese A, Demir S, Beyhun E, **Sahin A**, Gunduz A, Yulug E, Turedi S. The effect of ethyl pyruvate and N-acetylcysteine on ischemia-reperfusion injury in an experimental model of ischemic stroke. Am J Emerg Med. 2016 Sep;34(9):1804-7. doi: 10.1016/j.ajem.2016.06.003.

A12. Suha T, Asli M, **Aynur S**, Yunus K, Ahmet M, Selim D, Esin Y, Ozgur T, Ari NS, Süleyman T. Effects of N-acetylcysteine and ethyl pyruvate on ischemia-reperfusion injury in experimental electrical burn model. Am J Emerg Med. 2016 Jul;34(7):1217-24. doi: 10.1016/j.ajem.2016.03.032.

A13. Turkmen S, **Sahin A**, Gunaydin M, Sahin S, Mentese A, Turedi S, Karahan SC, Ozsu S, Gunduz A. The value of signal peptide-CUB-EGF domain-containing protein-1 (SCUBE1) in the diagnosis of pulmonary embolism: a preliminary study. Acad Emerg Med. 2015 Aug;22(8):922-6. doi: 10.1111/acem.12721.

A14. Günaydin, M. Türkmen, S. **Sahin, A.** Sümer, A. Menteşe, A. Türedi, S. Gündüz, A. Karahan, S.C. The diagnostic value of SCUBE1 levels in acute ischemic stroke. Turk J Biochem 2014; 39 (1) ; 107–112doi: 10.5505/tjb.2014.43534

A15. Türkmen S, Cansu A, Türedi S, Eryigit U, **Sahin A**, Gündüz A, Shavit I. Age-dependent structural and radiological changes in the larynx. Clin Radiol. 2012 Nov;67(11):e22-6. doi: 10.1016/j.crad.2012.07.006.

A16. Turedi S, Gunduz A, Mentese A, Dasdibi B, Karahan SC, **Sahin A**, Tuten G, Kopuz M, Alver A. Investigation of the possibility of using ischemia-modified albumin as a novel and early prognostic marker in cardiac arrest patients after cardiopulmonary resuscitation. Resuscitation. 2009 Sep;80(9):994-9. doi: 10.1016/j.resuscitation.2009.06.007.

B. Diğer uluslararası hakemli dergilerde yayınlanmış tam makale

B1. Sahin A, Cicek M, Gonenc Cekic O, Gunaydin M, Saglam Aykut D, Tatli O, Karaca Y, Arici MA. A retrospective analysis of cases with neuroleptic malignant syndrome and an evaluation of risk factors for mortality Turkish Journal of Emergency Medicine 17 (2017) 141e145, DOI: 10.1016/j.tjem.2017.10.001

B2. Aygun A, **Sahin A**, Karaca Y, Turkmen S, Turedi S, Ahn SY, Kim S, Gunduz A. Grayanotoxin levels in blood, urine and honey and their association with clinical status in patients with mad honey intoxication. Turkish Journal of Emergency Medicine xxx (2017) 1e5. DOI: 10.1016/j.tjem.2017.05.001

B3. Karaca Y, Tatlı Ö, Eryiğit U, Aksüt N, **Şahin A**, Menteşe A, Altay D, Beşlioğlu N, Karataş M, Örem A. Diagnostic Value of Cyclophilin A in Acute Ischemic Stroke. Eurasian J Emerg Med 2017; 16: 54-56) DOI: 10.5152/eajem.2017.3511016/j.tjem.2017.05.001.

**C. Ulakbim Tarafından Taranan Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanmış Yazarın
1. İsim Olduğu Özgün araştırma Makaleleri:**

C1. **Şahin A**, Özer V, Tatlı Ö, Karaca Y, Yaman S, Karahan SC. Acil servise izole baş ağrısı şikayetiyle başvuran hastaların ayırıcı tanısında iskemi modifiye albumin seviyesinin değeri. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2018;20.DOI: 10.24938/kutfd.336249

C2. Arıcı MA, **Şahin A**, Çolak Oray N, Bayram B, Tunçok Y. Antipsychotic Exposures in an Emergency Department. J Basic Clin Health Sci 2017; 2: 41-46. DOI: 10.5152/jbachs.2017.121

C3. Tatlı Ö, Karaca Y, Alver A, Menteşe A, Yuluğ E, Günaydın M, **Şahin A**, Eryiğit U, Vahdadi SS, Aygün A. “Examination of Oxidative Stress Parameters İn Experimental Mesenteric Ischemia Model. ” Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2017; 19(1): 21-29. DOI: 10.24938/kutfd.292279

D. SSCI, SCI, SCI-Expanded Veya ESCI Kapsamındaki Dergilerde Yayınlanmış Vaka Takdimleri:

D1. Türkmen S., **Sahin A**., Gunaydın M., Tatli O., Karaca Y., Turedi S., Gunduz A. “A wild wolf attack and its unfortunate outcome: rabies and death.” Wilderness Environ Med. 23(3):248-50 (2012).

D2. Türkmen S, Eryigit U, **Sahin A**, Yeniocak S, Turedi S. Carbon monoxide poisoning associated with water pipe smoking. Clinical Toxicology (2011), 49, 697–698.

D2. **Sahin A**, Ozer V, Akkaya F, Sahin S. Successful resuscitation of prolonged cardiac arrest occurring in association with ‘skunk’ and toluene toxicity. Accepted by Turkish journal of Emergency Medicine.

ULUSLARARASI BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN VE BİLDİRİ KİTAPLARINDA (PROCEEDINGS) BASILAN BİLDİRİLER

1. Karaca Y, Çiçek M, Tatlı Ö, **Şahin A**, Paslı S, Beşer MF, Türedi S. Dağ arama kurtarma operasyonlarında insansız hava araçlarının (Dronlar) potansiyel kullanımı., 1. Ortadoğu Afet ve Hastane Öncesi Yönetim Kongresi. 8-11 Ekim 2017, İstanbul/Türkiye

2. İmamoğlu M, Aygün A, Bekar Ö, Erdem E, Çiçek M, Tatlı Ö, Karaca Y, **Şahin A**, Türkmen S, Türedi S. A Retrospective Analysis of Nebulized Versus Intravenous Fentanyl for Renal Colic. S-059. 9th Asian Conference on Emergency Medicine, 13. Turkish Emergency Medicine Congress. November 22-25, 2017. Antalya / Turkey

3. **Şahin A**, Altay D, Demir S, Yuluğ E, Menteşe A, Tatlı Ö, Karaca Y, Gündüz A, Türedi S. Deneysel Akut Mezenter Iskemi Modelinde Plasma Vascular Adhezyon Protein -1 (VAP-1) Düzeyinin Tanısal Değerinin Araştırılması Ve Plasma I-FABP Düzeyi ile Karşılaştırılması. S-140. 9th Asian Conference on Emergency Medicine, 13. Turkish Emergency Medicine Congress. November 22-25, 2017. Antalya / Turkey

4. **Şahin A**, Özer V, Tatlı Ö, Akkaya F, Kaplan Ş. Toluene ve Skunk Toksikitesine Bağlı Gelişen Uzamış Kardiyak Arrestin Başarılı Resüsitasyonu. SS-083. 13. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 4th intercontinental Emergency Medicine Congress, May 18-21 2017. Antalya/TURKEY.

5. **Şahin A**, Arıcı MA, Aksay N, Kalkan Ş, Tunçok Y. Bir Devlet Hastanesine Başvuran Isırma ve Sokma Olgularında Antivenom Kullanımı. SS-081.13. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 4th intercontinental Emergency Medicine Congress, May 18-21 2017. Antalya/TURKEY.

6. Tatlı Ö. Keha Kurt NB, Karaca Y, **Şahin A**, Aygün A, Katipoğlu B, Türkmen S. The diagnostic value of serum pentraxin 3 levels in pulmonary contusion. 5th Eurasian Congress on Emergency Medicine & 12th Turkish Emergency Medicine Congress. November 10 – 13, 2016, Antalya / Turkey.

7. Karaca Y,Ö Keha Kurt NB, **Şahin A**, Tatlı Ö, Türedi S,Gündüz A. Evaluating the Predictive Value of Senescence Marker Protein 30 and peroxiredoxin1 Suspected with Pulmonary Embolism. 5th Eurasian Congress on Emergency Medicine & 12th Turkish Emergency Medicine Congress. November 10 – 13, 2016, Antalya / Turkey.

8. Türedi S, Erdem E, Karaca Y, Tatlı Ö, **Şahin A**, Türkmen S, Gündüz A. The High Risk of Contrast Induced Nephropathy in Patients with Suspected Pulmonary Embolism despite Three Different Prophylaxis A Randomized Controlled Trial. 5th Eurasian Congress on Emergency Medicine & 12th Turkish Emergency Medicine Congress. November 10 – 13, 2016, Antalya / Turkey.

9. Eryiğit U, Türedi S, Altunayoğlu V, **Şahin A**, Karaca Y, Tatlı Ö,Paslı S, Gündüz A. Acil Servise Baş ağrısı ile Başvuran Hastalarda Nötrofil Lenfosit Değerinin Migren ve Subaraknoid Kanama Ayırıcı Tanısındaki Rolü. 12.Ulusal Acil Tıp Kongresi, 3rd Intercontinental Emergency Medicine Congress, 3rd International Critical Care and Emergency Medicine Congress. May 19-22 2016. Antalya/TURKEY.

10. Türkmen S,Mutlu A, **Şahin A**, Karaca Y, Menteşe A, Demir S, Yuluğ E, Tatlı Ö, Arı N, Türedi S. Deneysel elektrik yanığı modelinde N asetilsistein ve Etil pirüvatın iskemi reperfüzyon hasarı üzerine etkileri. 12.Ulusal Acil Tıp Kongresi, 3rd Intercontinental Emergency Medicine Congress, 3rd International Critical Care and Emergency Medicine Congress. May 19-22 2016. Antalya/TURKEY.

11. Türkmen S, Gönenç Ö, Karaca Y, Menteşe A, Demir S, Beyhun NE, **Şahin A**, Türedi S, Yuluğ E, Gündüz A. The Effect of Ethyl Pyruvate and N Acetylcysteine on Ischemia Reperfusion Injury in an Experimental Model of Ischemic Stroke. 12.Ulusal Acil Tıp Kongresi, 3rd Intercontinental Emergency Medicine Congress, 3rd International Critical Care and Emergency Medicine Congress. May 19-22 2016. Antalya/TURKEY.

12. **Şahin A**, Kesici O, Tunçok Y, Kalkan Ş, Ergür BU, Aksu İ, Arıcı MA. Alfa Amanitine Bağlı Karaciğer Toksisitesinin Önlenmesinde Silibinin ile Resveratrolün Etkililiğinin Karşılaştırılması. 12.Ulusal Acil Tıp Kongresi, 3rd Intercontinental Emergency

Medicine Congress, 3rd International Critical Care and Emergency Medicine Congress. May 19-22 2016. Antalya/TURKEY.

13. Türkmen S, Cansu A, Karaca Y, Baki ME, Eroğlu O, Tatlı Ö, Günaydın M, Beyhun E, Gündüz A, Türedi, Eryiğit U, Baydın A, Güzel M, Özşahin F, Bilir Ö, **Şahin A**, Taşın V, Kalay A, Gül O. El bilek travmalarında radyografi kullanımı; Karadeniz el bilek kuralları için ikinci adım. 11. TÜRKİYE ACİL TIP KONGRESİ

26 – 29 Ekim 2015, KKTC.

14. Karaca Y, Türkmen S, **Şahin A**, Eryiğit U, Tatlı Ö, Türedi S, Menteşe A, Gündüz A. The sexual performance enhancing power of mad honey. 11. TÜRKİYE ACİL TIP KONGRESİ, 26 – 29 Ekim 2015, KKTC.

15. Aygün A, **Şahin A**, Karaca Y, Türkmen S, Türedi S, Ayaz FA, Yurtsever S, Ahn S, Kim S, Gündüz A. Do grayanotoxin levels in blood, urine and honey affect clinical overview? A descriptive study. 11. TÜRKİYE ACİL TIP KONGRESİ, 26 – 29 Ekim 2015, KKTC.

ULUSLARARASI HAKEMLİ TOPLANTILARDA POSTER BİLDİRİ

1. Yadigaroglu M, İmamoğlu M, Çoban K, Küpçük O, **Şahin A**, Karaca Y. Femoral arter kateterizasyonu sonrası görülen ölümcül bir komplikasyon: Pseudoanevrizma Ruptürü., 13. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 4th Intercontinental Emergency Medicine Congress, 4th International Critical Care and Emergency Medicine Congress May 19-22 2017. Antalya/TURKEY.

2. Yadigaroglu M, Çoban K, Dilaver E, İpek A, Karaca Y, **Şahin A**. Acil Bir Endoskopi Vakası: Ekmek İçerisinde Toplu İğne., 13. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 4th Intercontinental Emergency Medicine Congress, 4th International Critical Care and Emergency Medicine Congress May 19-22 2017. Antalya/TURKEY.

3. Yadigaroglu M, İmamoğlu M, Beşer F, Altay D, Tatlı Ö, **Şahin A**, Karaca Y. Pulsatil Ekzoftalmus., 13. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 4th Intercontinental Emergency

Medicine Congress, 4th International Critical Care and Emergency Medicine Congress. May 19-22 2017. Antalya/TURKEY.

4. Çekiç Ö, Tamer S, Özer V, Sağlam B, Karaca Y, **Şahin A**. Buzdağının Görülmeyen Kısmı Blast Yaralanma., 9. Asian Conference on Emergency Medicine, 13. Turkish Emergency Medicine Congress November 22-25, 2017. Antalya / Turkey

5. Cicek M, Paslı S, Sağlam B, Yadigaroglu M, **Şahin A**, Karaca Y. Nadir görülen bir klinik tablo: malign karsinoid sendrom., 9. Asian Conference on Emergency Medicine, 13. Turkish Emergency Medicine Congress

6. Altay D, Sağlam B, Uzundurukan A, Yıldız İ, **Şahin A**, Tatlı Ö, Gündüz A. Bochdalek hernisi: Olgu Sunumu, 4rd Intercontinental Emergency Medicine Congress May 19-22 2017. Antalya/TURKEY.

7. Yadigaroglu M, Altay D, Sağlam B, Çiçek M, Tatlı Ö, **Şahin A**. Spinal Spontan Epidural Hematom Vaka Serisi. 13. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 4th Intercontinental Emergency Medicine Congress, 4th International Critical Care and Emergency Medicine Congress May 19-22 2017. Antalya/TURKEY.

8. Yadigaroglu M, İmamoğlu M, Kızılay E, Özgenç E, **Şahin A**, Gündüz A. Koroner anjiyografi esnasında oluşan görme kaybı: Periprosedürel Stroke. 13. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 4th Intercontinental Emergency Medicine Congress, 4th International Critical Care and Emergency Medicine Congress May 19-22 2017. Antalya/TURKEY.

9. Özer V, Sağlam B, Küpçük O, Şişman M, **Şahin A**, Tatlı Ö. Biperidene Bağlı Gelişen Kardiyotoksisite. 13. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 4th Intercontinental Emergency Medicine Congress, 4th International Critical Care and Emergency Medicine Congress May 19-22 2017. Antalya/TURKEY.

10. Altay D, Sertbaş İ, Özer V, Şişman M, **Şahin A**, Gündüz A. Os Trigonum. 13. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 4th Intercontinental Emergency Medicine Congress, 4th

International Critical Care and Emergency Medicine Congress May 19-22 2017. Antalya/TURKEY.

11. Beşer F, Özer V, Genç E, Dilaver E, Tatlı Ö, **Şahin A**. Torakal Spinal Bölgede Yabancı Cisim. 13. Ulusal Acil Tıp Kongresi, 4th Intercontinental Emergency Medicine Congress, 4th International Critical Care and Emergency Medicine Congress May 19-22 2017. Antalya/TURKEY.

12. Altay D, Imamoğlu M, Özer V, Özgenç E, Uzundurukan A, **Şahin A**, Karaca Y. Ülkemizde Nadir Görülen bir Yaralanma: Ayı Saldırısı. 9. Asian Conference on Emergency Medicine, 13. Turkish Emergency Medicine Congress November 22-25, 2017. Antalya / Turkey.

13. Cicek M, Paslı S, Özer V, Sağlam B, Karaca Y, **Şahin A**, Tatlı Ö. İskemik İnmede Nadir bir Klinik Bulgu: Pin-Point Pupil. 9. Asian Conference on Emergency Medicine, 13. Turkish Emergency Medicine Congress November 22-25, 2017. Antalya / Turkey.

14. Çiçek M, Gönenç Ö, Sağlam B, Yıldız İ, İpek A, **Şahin A**, Tatlı Ö. İnme ile karışan nadir bir vaka spontan spinal epidural hematoma. 5th Eurasian Congress on Emergency Medicine & 12th Turkish Emergency Medicine Congress. November 10 – 13, 2016, Antalya / Turkey.

15. Özer V, Küpçük O, Çoban K, Özgenç E, Kızılay E, **Şahin A**, Karaca Y. Dokuz yaşında bir van neck-odelberg sendromu. 5th Eurasian Congress on Emergency Medicine & 12th Turkish Emergency Medicine Congress. November 10 – 13, 2016, Antalya / Turkey.

16. Cicek M, Cekic Ö, Sağlam B, Yıldız I, Ipek A, **Şahin A**, Tatlı O. İnme ile karışan nadir bir vaka; spontan spinal epidural hematoma. 5th Eurasian Congress on Emergency Medicine & 12th Turkish Emergency Medicine Congress. November 10 – 13, 2016, Antalya / Turkey.

17. Karaca Y, Tatlı Ö, Eryiğit U, **Şahin A**, Aksüt N, Menteşe A, Altay D, Beşlioğlu N, Karataş M, Örem A. The diagnostic value of cyclophilin a in acute ischemic stroke. 11. TÜRKİYE ACİL TIP KONGRESİ, 26 – 29 Ekim 2015, KKTC.

18. **Şahin A**, Karaca Y, Aşık O, Arslan S, Türedi S. The possibility of ichthyotoxicity from whiting fish: diagnostic challenge, case report. 11. TÜRKİYE ACİL TIP KONGRESİ, 26 – 29 Ekim 2015, KKTC.

19. İmamoğlu M, Vuran HS, **Şahin A**, Taşın V, Türedi S. Spontan araknoid kist rüptürü. 11. TÜRKİYE ACİL TIP KONGRESİ, 26 – 29 Ekim 2015, KKTC.

20. İmamoğlu M, Aşık O, Tatlı Ö, **Şahin A**, Gündüz A. Nadir bir senkop nedeni: iliak arter anevrizma rüptürü. 11. TÜRKİYE ACİL TIP KONGRESİ, 26 – 29 Ekim 2015, KKTC.

21. Çekiç Ö, Sağlam B, Bayrak S, **Şahin A**, Türedi S. Baş Ağrısı Şikayetiyle Gelen Geniş İskemik Enfarkt. 11. Ulusal Acil Tıp Kongresi & 2nd Intercontinental Emergency Medicine Congress. April 16-19, 2015 Antalya / Turkey.

22. Bayrak S, Erdem E, Çiçek M, Yadigaroglu M, **Şahin A**. Posterior Reversible Ensefalopati Sendromu. 11. Ulusal Acil Tıp Kongresi & 2nd Intercontinental Emergency Medicine Congress. April 16-19, 2015 Antalya / Turkey.

23. Çebi N, Keha Kurt NB, Bayrak S, Eryiğit U, **Şahin A**. Dev Karaciğer Absesi. 11. Ulusal Acil Tıp Kongresi & 2nd Intercontinental Emergency Medicine Congress. April 16-19, 2015 Antalya / Turkey.

ULUSAL/ULUSLARARASI KİTAPLAR VEYA KİTAPLARDAKİ BÖLÜMLER:

1. Management of stroke in emergency department (2017)., Ala Alireza,EYÜBOĞLU İLKER,KARACA YUNUS,Shams Vahdat Samad,TÜREDİ SÜLEYMAN,ŞAHİN AYNUR,TATLI ÖZGÜR,Alikhah Hossein, Shervin Medical Publication, Basım sayısı:1, İngilizce(Bilimsel Kitap), (Yayın No: 3486210)

Yurtdışı Görevlendirmeler:

1. Emory University, Georgia Poison Centre Atlanta/USA, 1-30 Mart 2012 (observer)

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

Türkiye Acil Tıp Derneği (Üye)

Acil Tıp Uzmanları Derneği (Üye)

MENATOX-Middle East North African Toxicology Association (Üye)

Ödüller:

1. En iyi ikinci sözlü bildiri ödülü: Türkmen, S., Cansu A., **Karaca Y.**, Baki M.E., Eroğlu O., Tatlı Ö., Günaydın M., Beyhun E., Gündüz A., Türedi S., Eryiğit U., Baydın A., Güzel M., Özşahin F., Bilir Ö., Şahin A., Kalay A., Gül O. “El bilek travmalarında radyografi kullanımı; Karadeniz el bilek kuralları için ikinci adım”, *11. Türkiye Acil Tıp Kongresi*, GİRNE, KKTC, (2015).
2. En iyi ikinci poster bildiri ödülü: **Karaca Y.**, Tatlı Ö., Eryiğit U., Şahin A., Aksüt N., Menteşe A., Us Altay D., Beşlioğlu N., Karataş M., Örem A. “The Diagnostic Value of Cyclophilin A in Acute Ischemic Stroke”, *11. Türkiye Acil Tıp Kongresi*, GİRNE, KKTC, (2015).
3. En iyi sözlü bildiri ödülü: Türedi S., Erdem E., **Karaca Y.**, Tatlı Ö., Şahin A., Türkmen S., Gündüz A. “The High Risk of Contrast Induced Nephropathy in Patients with Suspected Pulmonary Embolism Despite Three Different Prophylaxis: A Randomized Controlled Trial”, *5.Eurasian Congress on Emergency Medicine and 12. Turkish Emergency Medicine Congress*, Antalya, (2016).
4. Best Presentation Special Prize “Alfa Amanitine Bağlı Karaciğer Toksisitesinin Önlenmesinde Silibinin ile Resveratrolün Etkililiğinin Karşılaştırılması.” *12.Ulusal Acil Tıp Kongresi, 3rd Intercontinental Emergency Medicine Congress, 3rd International Critical Care and Emergency Medicine Congress*, Antalya
5. Sözlü Bildiri Birincilik Ödülü “Dağ arama kurtarma operasyonlarında insansız hava araçlarının (Dronlar) potansiyel kullanımı” *Ortadoğu Afet ve Hastane Öncesi Yönetim Kongresi. 8-11 Ekim 2017, İstanbul*

8.3 Tez Sonuçlarının Uluslararası Kongrede Sözlü Bildiri Özeti

**12. ULUSAL
ACİL TIP KONGRESİ**
SUENO DELUXE OTEL / ANTALYA / 19-22 MAYIS 2016

**3rd Intercontinental
Emergency Medicine Congress
International**
Critical Care and Emergency Medicine Congress

www.acil2016.org

BİLDİRİ KİTABI

BİLİMSEL SEKRETARYA
ATUDER
Acil Tıp Uzmanları Derneği
ACİL TIP UZMANLARI DERNEĞİ
Yukarı Ayrancı, Gülleryüz Sk. No: 26/19 Çankaya / Ankara
T: +90 312 426 12 14 F: +90 312 426 12 44
info@atuder.org.tr / www.atuder.org.tr

ORGANİZASYON SEKRETARYASI
GENX
KONGRE VE ORGANİZASYON
İcadiye Cad. No: 3 Kuzguncuk 34674 İstanbul T: +90 216 310 11 00
F: +90 216 310 06 00 info@genx.com.tr / www.genx.com.tr
facebook.com/GENXKONGRE twitter.com/GENX_KONGRE

SS-0021 Toxicology

Alfa-Amanitine Bağlı Karaciğer Toksisitesinin Önlenmesinde Silibinin ile Resveratrolün Etkililiğinin Karşılaştırılması

Aynur Şahin¹, Oktay Kesici², Yeşim Tunçok², Şule Kalkan², Bekir Uğur Ergür³, İlkay Aksu⁴, Mualla Aylin Arıcı²

¹Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Acil Tıp Ana Bilim Dalı

²Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı

³Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı

⁴Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı

GİRİŞ: Amanita phalloides türü mantarların içeriğindeki alfa-amanitin (α -AMA) hepatotoksisite ve ölüm ile sonlanan zehirlenmelere neden olmaktadır. α -AMA ile zehirlenme tedavisinde silibinin, yüksek dozda kristalize penisilin-G, simetidin ve N-asetilsistein gibi antidotlar kullanılmasına karşın, özellikle karaciğer yetmezliğine bağlı morbidite ve mortalite oranı yüksektir. Çalışmamızın amacı, α -AMA'nın neden olduğu hepatotoksitenin tedavisinde antioksidan ve hepatoprotektif olduğu bilinen resveratrolün (R) etkililiğini araştırmak ve silibinin (Sil) ile karşılaştırmaktır.

YÖNTEM: Balb/c farelerde, α -AMA'nın karaciğer fonksiyon testlerini (AST ve ALT) yükselten ve histopatolojik olarak karaciğer hasarı oluşturan akut hepatotoksik dozu 1.4 mg/kg (intraperitoneal, i.p.) olarak bulundu. Deney gruplarımız, sırasıyla: 1. Kontrol: α -AMA (n=12), 2. α -AMA+Dimetilsülfoksit (DMSO, R ve Sil çözücüsü, n=8), 3. α -AMA+ EşR (α -AMA ile eş zamanlı 30 mg/kg R i.p. n=8), 4. α -AMA+ 12R (α -AMA uygulamasından 12 saat sonra 30 mg/kg R, n=10), 5. α -AMA+ 24R (α -AMA uygulamasından 24 saat sonra 30 mg/kg R, n=10), 6. α -AMA+Sil (α -AMA ile eş zamanlı 5 mg/kg Sil, n=10). Deney gruplarında, 48 saat boyunca R 12 saat aralıklarla ve Sil ise 6 saat aralıklarla uygulandı. Fareler 48 saatlik gözlemden sonra eter anestezisi altında sakrifiye edildi. Kalpten ponsiyonla alınan kan örneklerinden karaciğer fonksiyon testleri ölçüldü. Alınan karaciğer örnekleri histopatolojik olarak değerlendirildi. İstatistiksel analizde, ANOVA, farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak için Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testleri kullanıldı. P<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR: AST değerleri, EşR (2191.0 $\pm$ 281.2 U/L) ve 12R (2403.0 $\pm$ 726.1 U/L) gruplarında kontrol grubuna (7947.0 $\pm$ 1335.0 U/L) göre anlamlı oranda düşük bulundu (p<0.01 ve p<0.01). ALT değerleri de benzer şekilde EşR (1335.0 $\pm$ 570.4 U/L) ve 12R (1542.0 $\pm$ 537.3 U/L) gruplarında kontrol grubuna (6454.0 $\pm$ 1604.0 U/L) göre düşük bulundu (p<0.05). (p>0.05). Karaciğer histopatolojik hasar skoru, EşR (1.4 $\pm$ 0.2), 12R (1.3 $\pm$ 0.2), ve 24R (1.4 $\pm$ 0.2), gruplarında kontrol grubuna göre (2.6 $\pm$ 0.2), göre anlamlı oranda azaldı (sırasıyla p<0.01, p<0.001, p<0.001). Sil grubunda histopatolojik hasar skoru 1.8 $\pm$ 0.2 idi. R ve Sil grupları arasında AST ve ALT değerleri ve histopatolojik hasar skoru bakımından anlamlı farklılık yoktu.

SONUÇ: Deneyel fare zehirlenme modelinde erken veya geç dönemde uygulanan resveratrolün, α -AMA'ne bağlı hepatotoksitenin önleme ve iyileştirmede etkili olduğu saptanmıştır. Geleneksel antidot olarak kullanılan silibinin ise hepatotoksitenin geri döndürmede başarılı olmamıştır. Bu nedenle resveratrol α -AMA'ya bağlı hepatotoksitenin önlenmesi ve tedavisinde umut verici bir antidot adaydır.

Bu çalışma TÜBİTAK Başlangıç AR-GE projelerini destekleme programı tarafından desteklenmiştir (114S927).

ANAHTAR KELİMELEER: α -AMA, resveratrol, hepatotoksitenin, silibinin

8.4. Uluslararası Kongrede Alınan Sözlü Bildiri Özel Ödülü

