



T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALFA AMANİTİNİN SIÇANLARDA TOKSİKOKİNETİĞİ

Selim KARAHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul KAYA

DÜZCE 2012



DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALFA AMANİTİNİN SIÇANLARDA TOKSİKOKİNETİĞİ

Selim KARAHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul KAYA

DÜZCE 2012

KABUL VE ONAY

Tbbi Farmakoloji AbD. Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan “Alfa amanitinin Sıçanlarda Toksikokinetiğı” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 11/07/2012

TEZ SINAV JÜRİSİ



Prof.Dr. S. Oktay ARSLAN

Düzce Üniversitesi

Başkan

Yrd.Doç.Dr. Ertuğrul KAYA

Düzce Üniversitesi

Üye



Yrd.Doç.Dr. Ali PARLAR

Düzce Üniversitesi

Üye



Yukarıdaki Tez, Ynetim Kurulunun 12 /07/2012 tarih ve 38 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Yrd.Doç.Dr. Talat BAHÇEBAŞI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

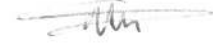


BEYAN

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

11/07/2012

Selim KARAHAN



TEŞEKKÜR

Tıbbı Farmakoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimim süresince, yanında çalışma olanağı bulduğum, bu süre içerisinde eğitimimde değerli katkılarını gördüğüm hocalarım; ilgi, yardım ve hoşgörüsünü eksik etmeyen Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. S. Oktay Arslan'a, bilim sevgisi ve kişiliğinden çok etkilendiğim, eğitimim süresince bana her zaman yardımcı olan, bilgisi, enerjisi ve hoşgörüsü ile çalışma şevki veren, yakın ilgi ve sabır gösteren Sayın Yrd.Doç.Dr. Ertuğrul Kaya'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından DÜ BAYBP-2011.04.HD.019 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Bu çalışmayı yüksek lisans öğrenimim süresince sabır ve desteklerini esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER:

TEZ ONAYI.....	
BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGE VE KISALTMALAR.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER VE RESİMLER LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ.....	3
1.1. Türkiye’deki Zehirlenme Vakaları.....	4
1.2. <i>Amanita phalloides</i> Türü.....	5
1.2.1. <i>Amanita phalloides</i> türünün taksonomisi.....	5
1.2.2. <i>Amanita phalloides</i> türünün Morfolojisi.....	7
1.2.3. <i>Amanita phalloides</i> türünün Yaygınlığı.....	8
1.3. <i>Amanita phalloides</i> Türünün İçerdiği Toksik Maddeler.....	9
1.3.1. Amatoksinler.....	10
1.3.2. Phallotoksinler.....	12
1.3.3. Virotoksinler.....	13
1.4. α -amanitin.....	14
1.4.1. α -amanitin molekülünün metabolizmadaki etkisi.....	15
1.4.1.1. RNA polimeraz II enzimi.....	16
1.4.2. α -amanitin molekülünün toksikokinetiği.....	16
1.5. <i>Amanita phalloides</i> Zehirlenmelerinin Klinik Seyri.....	18
1.5.1. Semptomlar.....	18
1.5.1.1. Birinci evre.....	18
1.5.1.2. İkinci evre.....	18
1.5.1.3. Üçüncü evre.....	18
1.5.1.4. Dördüncü evre.....	18

1.5.2. Tedavi süreçleri.....	19
1.5.2.1. Stabilizasyon.....	19
1.5.2.2. Dekontaminasyon.....	20
1.5.2.3. Eliminasyonu artırma.....	20
1.5.2.4. Antidot tedavisi.....	20
1.6. Farmakokinetik ve Toksikokinetik.....	22
1.6.1. Farmakokinetik ve Toksikokinetik tanımlar.....	22
1.6.1.1. Klirens.....	22
1.6.1.2. Dağılım hacmi.....	23
1.6.1.3. Yarılanma ömrü.....	24
1.6.1.4. Biyoyararlanım.....	24
1.6.2. Absorbsiyon kinetiği.....	25
1.6.2.1. Birinci derece kinetiği.....	25
1.6.2.2. Sıfırıncı derece kinetiği.....	25
1.6.3. Farmakokinetik ve Toksikokinetik modeller.....	26
1.6.3.1. Tek-kompartman modeli.....	26
1.6.3.2. İki-kompartmanlı model.....	26
1.7. α -amanitin molekülünün analiz yöntemleri.....	27
1.7.1. Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC).....	28
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
2.1. Gereç.....	30
2.1.1. Etik kurul izin belgesi.....	30
2.1.2. Standart ve kitler.....	30
2.1.3. A. <i>Phalloides</i> mantarlarının elde edilmesi.....	30
2.1.4. Hayvan materyali.....	30
2.1.5. Laboratuvar koşulları.....	31
2.1.5.1. Cihazlar ve teknik malzemeler.....	31
2.1.5.2. Kimyasallar.....	32
2.2. Yöntem.....	32
2.2.1. α -amanitin elde edilmesi.....	32
2.2.1.1. Mantar ekstraksiyonu.....	32
2.2.1.2. Preparatif HPLC Sistemi.....	33
2.2.1.3. Analitik HPLC sistem.....	35

2.2.1.3.A. HPLC koşulları.....	35
2.2.1.4. Saflık analizi.....	36
2.2.1.5. Toksinin doğrulaması.....	36
2.2.1.6. Miktar analizi.....	37
2.2.2. Deney protokolü.....	37
2.2.3. Serumda alfa amanitin analizi.....	38
2.2.4. İstatistiksel analiz bilgileri.....	40
3. BULGULAR.....	41
3.1. Kromatogram Pik alanı.....	41
3.2. Kalibrasyon Eğrisi.....	41
3.3. Toksikokinetik Bulgular.....	42
4. TARTIŞMA.....	46
KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	62
EKLER.....	63

SİMGELER ve KISALTMALAR

AAPCC:	Amerika Zehir Kontrol Birliği
AST:	Aspartat aminotransferaz
ALT:	Alanin aminotransferaz
NAC:	N-asetilsistein
RNA:	Ribonükleik asit
kD:	Kilo dalton
Na:	Sodyum
DNA:	Deoksiribonükleik asit
LD ₅₀ :	Populasyonun yarısını öldürecek doz
HPLC:	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
CL:	Klirens
EAA:	Eğri altındaki alan
F:	Biyoyararlanım faktörü
İ.V.:	İntravenöz
Vd :	Dağılım hacmi
T:	Total ilaç miktarı
V _{ss} :	Kararlı durum hacmi
C _{doruk} :	Doruk konsantrasyonu
t _{doruk} :	Doruk konsantrasyonuna ulaşma süresi
k _a :	Absorbsiyon hız sabiti
k _e :	Eliminasyon katsayısı
RIA:	Radioimmunoassay
ELISA:	Enzyme Linked-ImmunoSorbent Assay
TLC:	İnce tabaka kromatografisi
LC-MS:	Sıvı kromatografisi-kütle spektrometre
GS-MS:	Gaz kromatografisi-kütle spektrometre
RP-HPLC:	Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi
LC:	Sıvı kromatografisi
LSC:	Katı absorband
LLC:	Sıvı absorband
DÜ-HADYEK:	Düzce Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
KOH:	Potasyum hidroksit
SH:	Standart hata
LOD:	Tayin limiti
LOQ:	Ölçüm limiti
SS:	Standart sapma

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1: <i>Amanita Phalloides</i> türünün sınıflandırılması.....	6
Tablo 2: Amatoksinlerin kimyasal özellikleri ve toksik dozları	11
Tablo 3: Fallotoksinlerin kimyasal özellikleri ve toksik dozları.....	13
Tablo 4: α -amanitinin serumdaki ters faz HPLC yöntemi ile analizlerini takiben elde edilen kromatogram pik alanları.....	41
Tablo 5: α -amanitinin sıçanlara oral ve intravenöz yollarla 1 mg/kg dozunda uygulanmalarını takiben ortalama ($\pm$ SS) toksikokinetik parametreleri.....	42
Tablo 6: α -amanitinin sıçanlara oral ve intravenöz yollarla 1mg/kg dozunda uygulanmalarını takiben serumda ortalama α -amanitin miktarları.....	45
Tablo 7: Biyoyararlanım.....	45

ŞEKİLLER VE RESİMLER

Şekil 1: Dünya genelinde zehirli mantarların oranı.....	6
Şekil 2: <i>Amanita phalloides</i> mantar türünün gelişim evreleri.....	7
Şekil 3: <i>Amanita phalloides</i> mantar türünün kısımları.....	8
Şekil 4: Amatoksinlerin kimyasal yapısı.....	11
Şekil 5: Fallotoksinlerin kimyasal yapısı.....	13
Şekil 6: α -amanitin molekülünün kimyasal yapısı.....	15
Şekil 7: Birinci preparatif saflaştırma işlemi kromatogramı: kesikli oklar fraksiyonlama başlangıç ve bitişini göstermektedir.....	34
Şekil 8: İkinci preparatif saflaştırma işlemi kromatogramı: kesikli oklar fraksiyonlama başlangıç ve bitişini göstermektedir.....	35
Şekil 9: Saflaştırılarak elde edilen α -amanitin kromatogramı.....	36
Şekil 10: α -amanitin pikinin saflık analizi.....	36
Şekil 11: α -amanitin standart (a) ve fraksiyon (b) ultraviyole spektrumu.....	37
Şekil 12: α -amanitin HPLC’de analizinden elde edilen kromatogramlar (A: boş serum, B: serum üstüne sonradan eklenmiş α -amanitin).....	39
Şekil 13: Serumda α -amanitin analizi kalibrasyon grafiği.....	42
Şekil 14: α -amanitin oral ve intravenöz değerlerinin grafiği.....	44
Resim 1: <i>Amanita phalloides</i>	8
Resim 2: <i>Amanita phalloides</i> makroskopik ve mikroskopik resimleri.....	31
Resim 3: Sokslet ekstraksiyon aparatı.....	33
Resim 4: Deneyde kullanılan HPLC sistemi.....	34
Resim 5: Deney masası genel görünümü.....	38

ÖZET

ALFA AMANİTİNİN SIÇANLARDA TOKSİKOKİNETİĞİ

Selim KARAHAN

Yüksek Lisans Tezi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı Yrd.Doç.Dr. Ertuğrul KAYA

Haziran, 2012

Amanita phalloides dünyadaki görülen ölümcül mantar zehirlenmelerinin %95'in üzerinde sorumlu olan mantar türüdür. Bu mantarın 2 grup toksini tanımlanmıştır. Bunlar amanitin grubu ve falloidin grubu toksinler olarak bilinmektedir. Amanitin grubu toksinlerden mantar içinde en fazla bulunan ve hakkında en fazla araştırma yapılan toksin α -amanitindir. Bu grup toksinler RNA polimeraz II enziminin spesifik inhibitörüdür. Mantarlarla olan zehirlenmelerde bu toksinin toksikokinetiği çok önemlidir. Ancak bu konuda yapılan araştırmalar yetersizdir.

Yaptığımız saha çalışmalarında Ekim-Kasım 2010 aylarında Düzce çevresindeki ormanlardan yeterli miktarda *Amanita phalloides* mantarı toplanmıştır. Mantar içeriğindeki toksin analizi ve mantarlardan α -amanitin saflaştırılması HPLC cihazıyla gerçekleştirildi. Çalışmamızda, anestezi altındaki sıçanlara oral ve intravenöz yoldan 1 mg/kg α -amanitin verildikten sonra farklı zaman dilimlerinde (2.-5.-10.-15.-20.-45.-60.-90. dakika ve 2.-3.-4.5.-6.-9.-12.-24 saat) alınan kanların serumlarında α -amanitin toksininin HPLC yöntemiyle C18 kolon, amonyum asetat: asetonitril: metanol (80:10:10,v/v/v) mobil faz ve 1 mL/dak izokratik akış hızı kullanılarak analizi yapıldı. Yapmış olduğumuz analizler sonucunda, α -amanitin toksikokinetiğinin “iki kompartmanlı dışarıya açık model”e uygunluk gösterdiği, oral biyoyararlanımının $F=0.936$, t_{doruk} : 2-3 saat (2.64), $C_{\text{doruk-oral}} = 2.86 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$, $C_{\text{doruk-i.v.}} = 12.01 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$, klirensinin $CL = 75.91 \pm 9.11 \text{ ml/st/kg}$ ve eliminasyon yarılanma ömrünün ($t_{1/2\beta}$) $110.4 \pm 0.30 \text{ dak.}$ olduğu saptandı.

Çalışmamızda oral biyoyararlanım oranı, eliminasyon yarılanma ömrü, t_{doruk} , C_{doruk} , klirensin belirlenmesi ve literatüre kazandırılması önemli bir aşamadır. Ayrıca bu verilerden zehirlenme vakalarında yararlanılabilecektir.

Anahtar sözcükler: *Amanita phalloides*, α -amanitin, HPLC, toksikokinetik, biyoyararlanım, klirens

ABSTRACT

TOXICOKINETICS OF THE ALPHA AMANITIN IN RATS

Selim KARAHAN

Master of Science Department of Medicinal Pharmacology

Supervisor Asistant Prof.Dr. Ertuğrul KAYA

June, 2012

Amanita phalloides is the species which cause more than % 95 lethal mushrooms' poisoning. There have been determined two groups of toxin in these mushrooms. These toxins are known as amanitin group and phalloidin group. Among toxins, the most frequent toxin is α -amanitin type toxin and there are a lot of distributions in the mushroom. α -amanitin is specific inhibitor of RNA polymerase II. Toxicokinetics of this toxin is very important about poisoning caused mushrooms but pharmacokinetics of this toxin has not been sufficiently determined.

In recent field study at October-December in 2010, *Amanita phalloides* was adequately collected in forest around the Düzce. Toxins in the mushrooms were analyzed with HPLC machine. In our study, α -amanitin (1 mg/kg) was administrated via oral and intravenously in rats at different times ((2.-5.-10.-15.-20.-45.-60.-90. minutes and 2.-3.-4.5.-6.-9.-12.-24 hours) under anaesthesia. In the different times, blood specimens of the taking from rats will be analyzed for α -amanitin by using HPLC methods (C18 column, amonium asetate: acetonitrile: methanol (80:10:10,v/v/v) mobile phase, and 1 mL/min. isoacratric flows).

Results from analyzes that we were done, toxicokinetics of α -amanitin is demonstrate compliance with "two compartment-open model", oral bioavailability $F = 0.936$, t_{max} : 2-3 hours (2.64), $C_{max-oral} = 2.86 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$, $C_{max-i.v.} = 12.01 \pm 0.07 \mu\text{g/ml}$, clearance $CL = 75.91 \pm 9.11 \text{ ml/h/kg}$, elimination half life ($t_{1/2\beta}$) $110.4 \pm 0.30 \text{ min}$.

We explain parameters of toxicokinetics of α -amanitin which oral bioavailability, elimination half life, t_{max} , C_{max} , clearance and earned to literatures in rats. Furthermore, there will be also to take advantages of this data at mushrooms poisoning cases.

Keywords: *Amanita phalloides*, α -amanitin, HPLC, toxicokinetics, bioavailability, clearance

1. GİRİŞ

Amanita phalloides, dünyada en çok ölüme neden olan zehirli mantar türüdür¹. Öyle ki; mantar zehirlenmelerinden kaynaklanan ölümlerin % 95'inden fazlasını oluşturur². Amerika'da 1957-1964 yılları arasında 30 kişinin mantar zehirlenmesinden nedeni ile öldüğü belirtilmektedir³. Batı Avrupa'da 1990-1994 yılları arasında yılda 50-100 arasında, Amerika Birleşik Devleti'nde ise 5 yılda 100 ölümcül mantar zehirlenmesi vakası tespit edilmiştir⁴. Aynı şekilde Afrika, Asya, Avustralya, Amerika kıtalarında birçok zehirlenme vakası rapor edilmiştir⁵. Orta Avrupa'da mantar zehirlenmesi kaynaklı ölümlerin en büyük nedeni *A. phalloides* olmakla beraber, *Amanita verna* türü ile de zehirlenme vakaları olduğu saptanmıştır. Amerika'da ise ölümcül mantar zehirlenmelerinin büyük bölümü *A. phalloides* türünden kaynaklandığı belirtilmiştir⁶. Bu mantar türünde amatoksinler ve fallotoksinler olmak üzere 2 grup toksin tanımlanmıştır. *A. phalloides* türünde mantarın en zehirli kısmı şapka kısmıdır. Kuru mantarın bir gramında yaklaşık olarak 2-3 mg amatoksinler bulunur⁷. Toksisitesi en yüksek amatoksin olan α -amanitinin kuru mantardaki oranı ise 1-2 mg/g'dır⁸.

A. phalloides'in diğer yenilebilen mantar türlerinden ayırt edilmesinin zor olması zehirlenme tehlikesini arttıran önemli bir faktördür. *A. phalloides* gelişme evreleri içerisinde birçok mantar türüne benzeyerek ve aynı ortamlarda, yan yana yetişerek bu tehlikeyi arttırmaktadır⁹⁻¹⁰. Mantar konusunda uzman olmayan kişilerin hataları sonucu ayırt edilmeleri güç olan yabani mantarların yenmesi nedeniyle alerjik gastroenteritten ölümcül karaciğer nekrozuna kadar çeşitli reaksiyonlar ortaya çıkabilmektedir¹¹. Bunun yanı sıra *A. phalloides* mantarları alkolle birlikte tüketildiklerinde daha tehlikeli sonuçlar meydana getirmektedir¹².

Yakın bir zamana kadar mantar zehirlenmesi vakalarında etken olan mantar türü teşhis edilemiyordu. Bunun ana nedeni, gerek teşhis yöntemlerinin geliştirilememesi gerekse ekonomik olarak laboratuvar koşullarının yetersiz oluşudur. Amerika Zehir Kontrol Birliği (AAPCC), 1975-1995 yılları arasında mantar zehirlenmelerinden kaynaklanan vakaların yaklaşık %90'ında, toksinlerin ayrımının yapılamadığını rapor etmiştir¹³.

Dünyada mantar tüketiminin yüksek olmasının en büyük sebebi mantarların protein ve bazı özel amino asitleri barındırmasından kaynaklanır. Bunun yanı sıra, yağ, kolesterol ve kalori yönünden düşük olması tercih edilmesinde önemli rol oynar¹⁴. Bir başka

nedeni ise insanların sosyoekonomik durumlarının düşük olmasıdır. Ayrıca mantar toplama ve yeme, bazı insanlar için oldukça keyifli bir hobi nedenidir¹⁵.

Amanita cinsi mantar zehirlenmelerinde ölüm oranı (mortalite) % 9-40 arasında değişmektedir¹⁶. Çocuklarda ise bu oran %50'nin üstündedir⁵. Son yapılan araştırmalar; yetişkinlerde bu oranın % 20 civarında olduğu ve amanita nedenli mantar ölüm oranlarının son yıllarda destekleyici tedaviler sayesinde azaldığını göstermektedir¹⁷. Amatoksin zehirlenmelerine bağlı vakalar en çok Avrupa'da görülmektedir. Orta Avrupa'da 1971-1980 yılları arasında 205 amatoksin zehirlenme vakasında toplam ölüm oranı % 22.4, 10 yaşın altındaki çocuklarda ise bu oran % 51.3 bulunmuştur¹⁸. Yine Fransa'da 1984-1989 yılları arasında görülen 45 zehirlenme vakasında ölüm oranı; % 17.8, 10 yaşın altındakilerde ise %33.3'tür¹⁹. Bulgaristan'da 1991-1998 yılları arasında görülen 25 mantar zehirlenmesinde ölüm oranı % 40 olarak saptanmıştır. Bu oran en yüksek amatoksin kaynaklı ölüm oranı olarak rapor edilmiştir²⁰. Amatoksin zehirlenmelerinde, 1970'li yıllarda ölüm oranı % 80 civarında olmasına rağmen, son yapılan çalışmalarda bu oranın yetişkinlerde % 10-20'lere, çocuklarda ise %22-50'ye indiği bildirilmiştir²¹⁻²².

1.1. Türkiye'deki Zehirlenme Vakaları

Son yıllarda dünya genelinde mantar üretimi ve tüketimi giderek artmakta ve kültür ortamında yetiştirilmiş mantarlar sofraları zenginleştirmektedir²³⁻²⁴. Fakat satılan mantarların uzun süre bekletilmesi, taze toplanılmış mantarların kontamine olması ve en önemlisi toksik madde içeren mantarların ayırt edilmeden toplanması ile mantar zehirlenmesi vakaları gün geçtikçe artmaktadır²⁵. Ülkemiz ekolojik yönden kıtalararası geçiş bölgesinde olduğu için mantar çeşitliliği bakımından zengin bir floraya sahiptir. Mantar zehirlenmesinin yaygın olduğu ülkemizde doğadan toplanan mantarların günlük tüketimi sosyoekonomik seviyesi düşük olan ailelerde daha fazladır²⁶.

Türkiye'de ölümle sonuçlanan mantar zehirlenmeleri hala ciddiyetini korumaktadır. İklim şartlarının mantarlar için elverişli olduğu yıllarda ölümle sonuçlanabilen zehirlenme vakaları daha çok görülmektedir ve meydana gelen zehirlenme vakaları ciddi ölümlere yol açabilmektedir. Türkiye'de her yıl ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde mantarların yaygın olduğu bölgelerde zehirlenme vakaları tespit edilmekte ve son yıllarda bu oran giderek artmaktadır²⁷⁻²⁹. Zehirlenmeler soğuk ve

geceleri ayaz geçen ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde artmaktadır. Çoğu zaman zehirli ve zehirsiz mantar türleri bir arada bulunmakta ve ancak alanında uzman mikologlar tarafından ayırt edilebilmektedir. Bu durum mantar zehirlenmelerini arttırıcı en önemli sebeplerden biri olarak görülmektedir³⁰.

Türkiye’de değişik merkezlerde yapılan çalışmalarda mortalite ile ilgili farklı oranlar verilmektedir. Eskişehir’den bildirilen bir çalışmada ölüm oranı yetişkinlerde % 3.8, çocuklarda % 7.8 iken, Sivas’ta yapılan bir çalışmada ise 58 zehirlenme vakasından hiçbirinin ölümle sonuçlanmadığı bildirilmiştir. Ülkemizde sıkça görülen amanita kaynaklı zehirlenmeler, ölümle sonuçlanan mantar zehirlenmelerinin % 90’ına sebep olur³¹. Ülkemizde 1970-1975 yılları arasında 1315 kişinin mantardan zehirlendiği ve bunların 44’ünün yaşamını yitirdiği bildirilmiştir (ölüm oranı: % 3.3)³². Kasım 1994’te İstanbul’da 150 kişi zehirlenmiştir. Bu vakaların % 25’inin *A. phalloides* kaynaklı olduğu yapılan müdahalelere rağmen 20 kişinin hayatını kaybettiği görülmüştür (ölüm oranı: % 54)³³. Ülkemizde yapılan çalışmalarda 1996-2000 yılları arasında 143 hasta mantar zehirlenmesi sebebiyle hastanelerin acil servislerine başvurmuş ve 4 hasta karaciğer yetmezliği sebebiyle kaybedilmiştir¹³. Aynı şekilde bir başka çalışmada, İç Anadolu bölgesinde Mayıs-Haziran ayları arasında mantar zehirlenmesi şikâyeti ile hastaneye başvuran 63 çocuktan 5’inin hayatını kaybettiği rapor edilmiştir. Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Zehir A.M. bünyesinde 1988 yılında kurulan ve 24 saat hizmet veren Ulusal Zehir Danışma Merkezi verilerine göre zehirlenme nedeniyle başvuranların % 1,8’ini mantar zehirlenmeleri oluşturmaktadır³⁴. Türkiye’de biyolojik sıvılarda amatoksin teşhisi yapılamamaktadır. Ulusal Zehir Danışma Merkezi’nde ise sadece mantardan alınan örneğe bakılarak yapılabilmektedir³⁵.

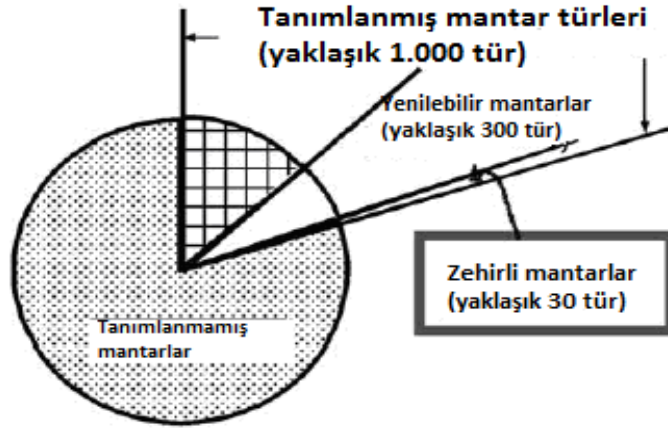
Ülkemizde yapılan çalışmalarda tüm zehirlenmeler içinde, mantar zehirlenmesi oranının çocuklarda % 2.8, yetişkinlerde ise % 2.5 olduğunu bildirmektedir³⁶⁻³⁷.

1.2. *Amanita phalloides* Türü

1.2.1. *Amanita phalloides* türünün taksonomisi

Yeryüzünde yaklaşık 5000 mantar türü olduğu tahmin edilmektedir. Bunlardan sadece % 20-25’i tanımlanabilmiştir (Şekil 1). Tanımlanan mantar türleri içinde zehirli mantarların oranı % 3 civarındadır³⁸.

Amanita cinsi mantar türleri yüzyıldan fazla bir süreden beri tanımlanmış bir türdür⁷. Amanita cinsi mantarlar yeryüzünde bugüne kadar tanımlanmış yaklaşık 500 basidiomycetous sınıfı mantar grubunun en büyüğüdür (Tablo 1). İçinde *Amanita phalloides*, *Amanita verna*, *Amanita virosa* ve *Amanita fuliginea* gibi birçok zehirli mantar türü barındırır³⁹⁻⁴¹.



Şekil 1: Dünya genelinde zehirli mantarların oranı³⁸.

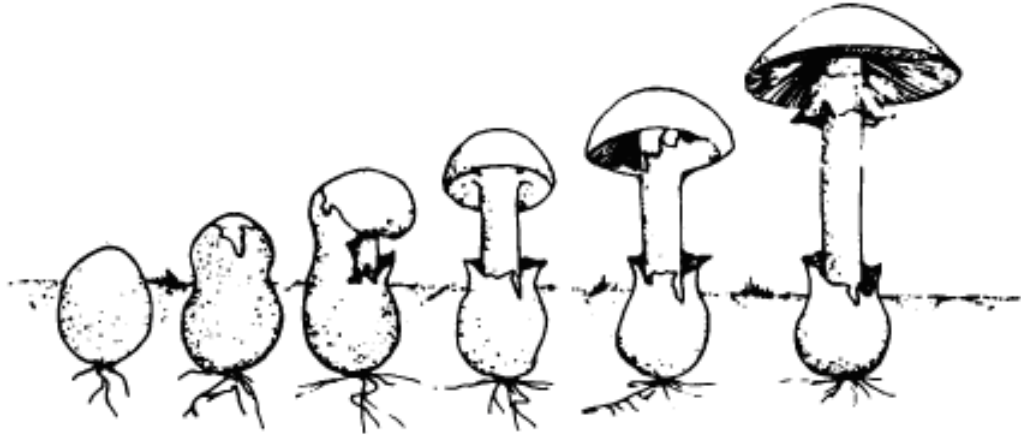
Amatoksin içeren mantarlar *Amanitaceae* ailesi (*Amanita* cinsi), *Agaricaceae* ailesi (*Lepiota* cinsi) ve *Cortinariaceae* ailesine (*Galerina* cinsi) bağlı mantar türleridir. *A. phalloides*, *A. virosa*, *A. verna*, *A. ocreta*, *A. bisporigera*, *A. suballiacea*, *A. tenuifolia* ve *A. hygroskopica* türleri *Amanita* cinsi mantar grubunu oluştururlar. Bu türler içinde farklı oranlarda toksin bulunur. *Lepiota* cinsi mantar türlerinin toksisitesi yüksektir. Fakat zehirlenme vakaları *Amanita* türlerine göre azdır. *Galerina* türlerinde ise toksin miktarı oldukça düşüktür⁵.

Tablo 1: *Amanita Phalloides* türünün sınıflandırılması⁴².

Alem	Fungi
Filum	Eumycophyta
Sınıf	Basidiomycete
Sıra	Agaricales
Aile	Amanitaceae
Cins	Amanita
Tür	<i>Amanita phalloides</i>

1.2.2. *Amanita phalloides* türünün morfolojisi

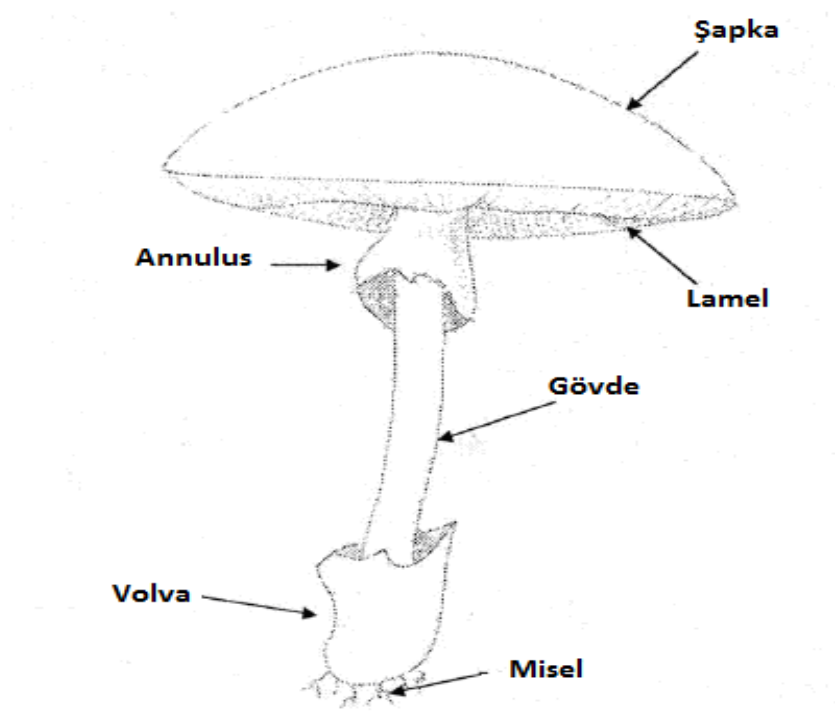
Amanita cinsi mantarlar gelişme sürecinin ilk aşamasında yumurta şeklinde bir zarlı yapı içinde gelişirler ve bu evrede genellikle puf mantarlarla karıştırılırlar. Daha sonra mantar gövdesinin uzamasıyla zarlı yapı yırtılır. Mantar olgunlaştıkça şapka kısmı büyür ve yatay olarak düzleşir ve şapkanın alt kısmında bulunan lamelleri sarmalayan zarsı yapı yırtılarak mantarın gövdesinin orta bölgesinde annulus denen etek şeklinde halka yapısını oluşturur (Şekil 2). *Amanita* türlerinin lamelleri beyaz olur ve gövde kısmına yapışık değildir. *Amanita* türlerini ayırt etmenin en önemli yolu mantar gövdesinin alt kısmında bulunan volva denilen fincan şeklindeki yapıyı gözlemlemektir (Şekil 3). Bu mantarların renginde iklim, toprak çeşidi, yükselti, mantarın yaşı gibi nedenlerden dolayı beyaz, açık sarı, açık yeşil, kahverengi gibi farklı renkler gözlemlenebilmektedir (Resim 1). *A. phalloides* mantarları genellikle açık yeşil veya açık kahverengi olurlarken, *A. ocreata* turuncu, *A. verna* ise beyaz renktedir⁴³.



Şekil 2: *Amanita phalloides*'in gelişim evreleri



Resim 1: *Amanita phalloides*



Şekil 3: *Amanita phalloides* mantar türünün kısımları

1.2.3. *Amanita phalloides* türünün yaygınlığı

Amanita grubu mantarların yaşam koşulları (habitatu) oldukça geniştir. Dünyanın her yerine dağılmış ve kolaylıkla bulunabilen bir mantar grubudur. Bunun yanında bazı türleri doğada endemik olarak bulunmaktadır⁴⁴. *A. Phalloides* türü dünyada en çok Avrupa kıtasının iç taraflarında bulunmaktadır. Bu mantar türünün albinosu olan *Amanita phalloides. verna* ise dünyada nadir olarak bulunmaktadır⁷. *Amanita* grubu mantarlar genellikle Avrupa’da görülmekle beraber Amerika, Güney Afrika, Malezya, Şili, Meksika, Avustralya, Hindistan gibi ülkelerde de bulunduğu ve zehirlenme vakalarına rastlanıldığı görülmüştür⁴⁵⁻⁵¹. Ülkemizde ise İstanbul ve Batı Karadeniz ormanlarında bol miktarda yetiştiği gözlemlenmekte ve ormanlık alanlarda özellikle meşe ağaçlarının altında yaygın olarak görülmektedir⁵². Ormansız bölgelerde birçok *Amanita* grubu mantarlara pek rastlanmaz, fakat bazı türler nadir de olsa yaşayabilmektedirler⁴⁴. Genellikle bir arada kümelenmiş halde bulunurlar, bazen de tek başına büyürler. Ağaç ve yaprak döküntüleri arasında ve nemli alanlarda yoğunlaşmaktadırlar⁵³.

1.3. *Amanita phalloides* Türünün İçerdiği Toksik Maddeler

Siklopeptit yapıdaki toksinler 3 gruba ayrılırlar; amatoksinler, fallotoksinler ve virotoksinler⁶⁶. *A. phalloides* içinde barındırdığı toksinler siklopeptit yapıdadır. *A. phalloides*’de sadece amatoksinler ve fallotoksinler bulunmaktadır. Amatoksinler 8 adet bisiklik oktapeptit yapıda toksin içerirken, fallotoksinler ise 7 adet siklik heptapeptit yapıda toksin içerirler ve bu toksinlerin hepsi *A. phalloides*’de bulunmaktadır¹⁰⁰. Monosiklik heptapeptit yapıda bir toksin grubu olan virotoksinler siklopeptit yapıdadır, fakat *A. phalloides* türlerinde bulunmazlar, daha çok *A. virosa* türünde bulunmaktadırlar⁶⁶.

Amatoksinler ve fallotoksinler renksiz ve kristalize bileşiklerdir. Metanol, su ve diğer polar organik çözücülerde çözünürler. Bu toksinlerin bozulmasına sebep olacak herhangi bir peptidaz enzimi yoktur. Birkaç dakika 100 °C’de kaynatıldığında bile toksinlerde bozulma görülmez. Aynı şekilde *A. phalloides* mantarları pişirildiğinde veya uzun süre muhafaza edildiğinde içindeki toksik maddelerde azalma gözlenmez. Uzun süre dondurulmuş (7-8 ay) mantarlardan kaynaklı ölümle sonuçlanan mantar

zehirlenmesi vakaları mevcuttur¹⁰¹. *A. phalloides*'in içerdği bütün toksinlerin kimyasal yapısında sülfüre bağlı triptopan ve hidroksillenmiş aminoasitler vardır. Toksinler şapka kısmında, gövde ve diğer kısımlara nazaran 3 kat daha fazla bulunur⁴⁰. Yaş *A. phalloides*'in bir gramında 0.2-0.4 mg arasında toksin bulunmaktadır⁸².

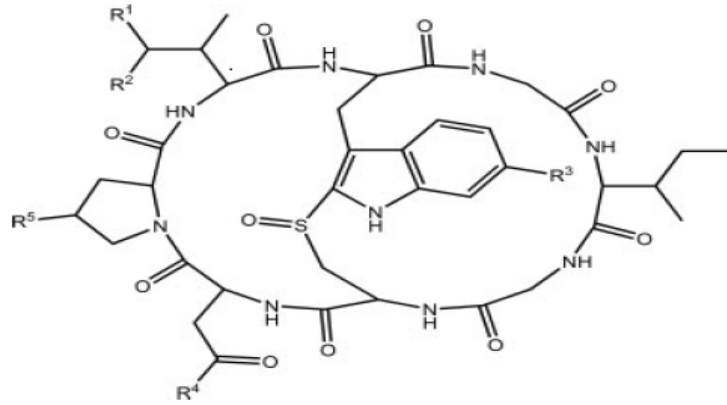
1.3.1. Amatoksinler (Amatoxins)

A. phalloides; amatoksinler ve fallotoksinler olmak üzere 2 ana toksin grubu barındırır. Amatoksinler çok potent toksinlerdir. Amatoksinin toksisite mekanizması RNA polimeraz II enzimini inhibe edip protein sentezini etkileyerek olur^{7,102}. Bundan dolayı hücre üretimi fazla olan karaciğer, böbrek ve barsak hücrelerinde nekroza yol açarlar¹⁰³⁻¹⁰⁴.

Karaciğer hasarına neden olan bisiklik oktapeptit yapıdaki amatoksinler, *Amanita*, *Conocybe*, *Galerina* ve *Lepiota* gibi birçok basidiomycete türü mantar cinslerinde bulunur¹⁰⁵. Fakat bu mantar cinslerinde bulunan amatoksin konsantrasyonları değişkenlik göstermektedir. Mesela toksik *Galerina* türlerinde α -amanitin ve β -amanitin konsantrasyonları *A. phalloides* mantarında bulunan konsantrasyonun yarısı kadardır¹⁰⁶. Günümüzde α -amanitin sentezi için bir yöntem tanımlanmıştır. Ancak pratikte yalnızca mantar ekstraktlarından saflaştırılarak doğal toksin olarak elde edilmektedirler¹⁰⁷. İlk defa 1966'da yapılan bir çalışmada ise fermente edilmiş *Galerina marginata* türü mantardan α -amanitin elde edilmiştir¹⁰⁸. Amatoksin konsantrasyonu yaşlı mantarlarda genç mantarlara nazaran daha yüksektir¹⁰⁹. Benzer şekilde amatoksin konsantrasyonları mantar kısımları içinde de değişkenlik gösterir. Fallotoksin konsantrasyonu volvada fazla iken, amatoksin konsantrasyonu genellikle lamel ve şapkada fazla olur⁴⁰. *A. phalloides* türü içinde amatoksin konsantrasyonu yetiştiği mevsim koşulları, nem oranı gibi çevresel faktörler ve genetik farklılıklardan dolayı diğer toplanan aynı tür mantarlarlardan konsantrasyon bakımından farklılık gösterir¹¹⁰⁻¹¹¹. Örneğin 1970'li yılların sonlarına doğru yapılan bir çalışmada Avrupa'da bulunan mantarlardaki amanitin içeriği araştırılmış, *A. phalloides* bulunan 24 adet örneklem oluşturulmuş ve amanitin konsantrasyonlarına bakılmıştır. Yaklaşık 4430 mg/kg kuru mantar toksin içeriğinin % 43'ü α -amanitin, % 49'u β -amanitin ve % 8'inde γ -amanitin olduğu bulunmuştur¹¹².

Amatoksin grubu toksinler 8 tanedir: α -amanitin, β -amanitin, γ -amanitin, δ -amanitin, ϵ -amanitin, amanin, amanullin, proamanullin (Tablo 2). Amanullin ve proamanullinin herhangi bir toksisite mekanizması gözlenmemiştir⁷. Amanita mantar türlerinin çoğu kültür ortamında yetiştirilememektedir. Bundan dolayı bu toksinler doğada toplanan mantarlardan saflaştırarak elde edilmektedir¹¹³⁻¹¹⁴. Geçen otuz yıllık süreçte sentetik ve türevleri olmak üzere kırktan fazla amatoksin tanımlanmıştır¹¹⁵.

Amatoksinler yüksek seçicilikle tüm ökaryotik hücre çekirdeklerinde bulunan ribozomların 140 kD altbirimine (SB3) bağlanır¹¹⁶. Amatoksinler yaklaşık 900 Dalton molekül ağırlığındadır⁶⁶. Amatoksinlerin bisiklik oktapeptit kimyasal yapısında; merkezde triptofan halka yapısı, sülfid köprüsü ve izolösin halkası vardır^{39,117-118}. Amatoksinler kimyasal yapısında hidroksillenmiş izolösin ve sistein sülfoksidinin yapmış olduğu 6-hidroksitriptofan köprüsü vardır (Şekil 4)^{102, 119}.



Şekil 4: Amatoksinlerin kimyasal yapısı¹²⁰

Tablo 2: Amatoksinlerin kimyasal özellikleri ve toksik dozları^{66,120}

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Molekül Formülü	Ma	LD50(ip) (mg/kg)
α-Amanitin	CH ₂ OH	OH	OH	NH ₂	OH	C ₃₉ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₄ S	918.97	0.3
β-Amanitin	CH ₂ OH	OH	OH	OH	OH	C ₃₉ H ₅₃ N ₉ O ₁₅ S	919.95	0.5
γ-Amanitin	CH ₃	OH	OH	NH ₂	OH	C ₃₉ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₃ S	902.97	0.2
δ-amanitin	CH ₃	H	OH	OH	OH	C ₃₉ H ₅₃ N ₉ O ₁₃ S	887.96	20
ϵ-Amanitin	CH ₃	OH	OH	OH	OH	C ₃₉ H ₅₃ N ₉ O ₁₄ S	903.96	0.3
Amanullin	CH ₃	H	OH	NH ₂	OH	C ₃₉ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₂ S	886.97	20
Proamanullin	CH ₃	H	OH	NH ₂	H	C ₃₉ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₁ S	870.97	20
Amanin	CH ₂ OH	OH	H	OH	OH	C ₃₉ H ₅₃ N ₉ O ₁₄ S	903.96	0.5

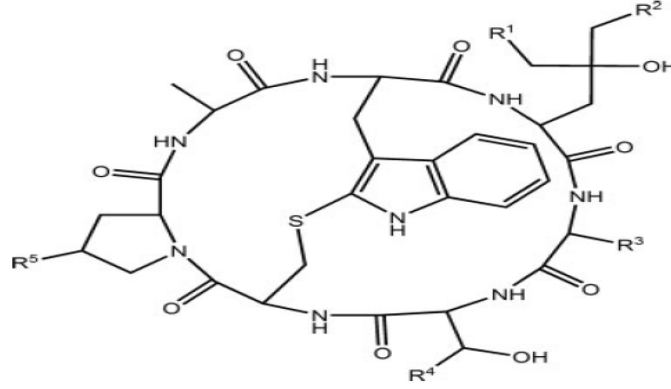
1.3.2. Fallotoksinler (Phallotoxins)

Fallotoksinler insanlarda görülen ölümcül mantar zehirlenmelerinde etkin role sahip değildir. Sindirim sisteminde emilimi zor olmasından dolayı oral biyoyararlanımı düşüktür⁶⁰. Fakat periton içine verildiğinde bu toksinler karaciğer hücrelerinde birçok lezyona sebep olurlar. Karaciğer hücreleri bu toksinleri oldukça hızlı alırlar (10 dakikada toksinin % 70-90'i) ve bu oran amatoksinlerle karşılaştırıldığı zaman 20 kat daha fazladır⁷.

Fallotoksinler deney hayvanlarında periton içine verildiğinde 2-5 saatte ölüme sebep olurlar¹²¹. Yapılan çalışmalar ile fallotoksinlerin yalnızca amanita cinsi mantarlarda bulunduğu anlaşılmıştır¹²².

Fallotoksinler spesifik olarak F-aktine bağlanarak, F-aktinin G-aktine dönüşmesini engeller. F-aktin ve G-aktin dengesi hücresel fonksiyonlar için önemli ve gereklidir. Hücre içinde çok önemli bir hücresel protein olan monomerik yapıdaki F-aktin ile polimerik yapıda olan G-aktin birbirine dönüşebilen bir denge halindedirler. Fallotoksinler F-aktine bağlanarak F-aktinin polimerizasyonunu engeller ve F-aktin- G-aktin dengesi bozulur^{7,123}. Fallotoksinler F-aktine bağlanarak hücresel filamentlerin stabilizasyonuna sebep olurlar¹²⁴. Fallotoksinler F-aktine sıkı bir şekilde bağlanırken, G-aktine bağlanmazlar¹⁰⁷. Fallotoksinlerin F-aktinlere bağlanması ile F-aktin filamentlerin depolarizasyonunu sağlayan kimyasal ajanlara karşı stabil olurlar¹²⁵⁻¹²⁷. Fallotoksinler hücre zarından taşıyıcı aracılığı ile geçer ve hızlı bir şekilde hücre zarının alt kısmında bulunan aktine bağlanırlar⁶⁶.

Fallotoksin grubu toksinler phalloidin, phalloin, phallacidin, phallisin ve phallin B dir (Tablo 3)¹²⁸. Bütün fallotoksin grupları F-aktine karşı yüksek afiniteye sahiptirler⁶⁶. Fallotoksin grubundan bisiklik peptit yapıda olan phalloidin hücresel bir toksindir ve hücre membranı üzerindeki proteinlere bağlanıp hücre hasarına neden olur¹²⁹. Fallotoksinlerin bisiklik heptapeptit şeklinde olan kimyasal yapısında birçok hidroksillenmiş amino asit bağı ve sistein ile triptofan arasında tioeterin yapmış olduğu köprü vardır (Şekil 5)¹³⁰.



Şekil 5: Fallotoksinlerin kimyasal yapısı¹²⁰

Tablo 3: Fallotoksinlerin kimyasal özellikleri ve toksik dozları^{66,120}

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	Molekül Formülü	Mr	LD50 (mg/kg)
Falloidin	OH	H	CH ₃	CH ₃	OH	C ₃₅ H ₄₈ N ₈ O ₁₁ S	788.87	2
Falloin	H	H	CH ₃	CH ₃	OH	C ₃₅ H ₄₈ N ₈ O ₁₀ S	772.87	1,5
Profalloin	H	H	CH ₃	CH ₃	H	C ₃₅ H ₄₈ N ₈ O ₉ S	756.87	100
Fallisın	OH	OH	CH ₃	CH ₃	OH	C ₃₅ H ₄₈ N ₈ O ₁₂ S	804.87	2,5
Fallacin	H	H	CH(CH ₃) ₂	COOH	OH	C ₃₇ H ₅₀ N ₈ O ₁₂ S	830.90	1,5
Fallacidin	OH	H	CH(CH ₃) ₂	COOH	OH	C ₃₇ H ₅₀ N ₈ O ₁₃ S	846.90	1,5
Fallisacin	OH	OH	CH(CH ₃) ₂	COOH	OH	C ₃₇ H ₅₀ N ₈ O ₁₄ S	862.90	4,5

1.3.3. Virotoksinler (Virotoxins)

Virotoksinler zehirli mantar türü olan *Amanita virosa* Fr. mantarından elde edilir. *A. virosa* mantar türü Avrupa kıtasının bazı bölgelerinde bulunmakla beraber daha çok Kuzey Amerika ülkelerinde yaygınlık gösterir⁷. Virotoksinler monosiklik heptapeptit yapıdadır¹³¹. Virotoksinler 6 toksik fraksiyondan oluşur: virodin, viroisin, deoxoviroisin, Ala-viroidin, Ala-desoksoviroidin ve deoksoviroidin⁴². Virotoksinler yakın zamanda keşfedilmiş, kimyasal yapı ve toksik etki bakımından fallotoksinlerle benzerlik gösterdiği saptanmıştır¹³². İçerisinde virotoksinleri barındıran *A. virosa* mantar türü zehirlenmesinin klinikteki seyri, *A. phalloides* semptomlarına benzemektedir⁴².

1.4. α -amanitin

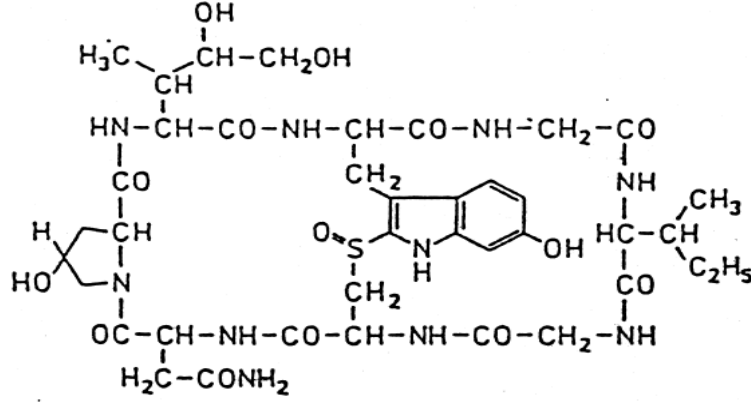
A. phalloides içinde barındırdığı toksinler arasında klinikte en önemli olan toksik madde α -amanitin'dir. Bisiklik polipeptit yapıda olan α -amanitin toksinini ilk izole eden ve kimyasal yapısını tanımlayan Theodor Wieland'dır⁶. Zehirli mantar cinsi olan *Amanita* mantar cinsinin en etkili toksini olan α -amanitin *Microlepiota* cinsi (*M. helveola*, *M. cristata*, *M. brunneoincarnata*, *M. fuscovinacea*, *M. lilacea*, *M. castanea*) ve *Galerina* cinsi (*G. marginata*, *G. autumnalis*) gibi farklı mantarlarda da tespit edilmiştir¹³³.

Bugüne kadar tanımlanmış olan 8 amatoksin içerisinde, organizmada toksisitesi en yüksek olanı α -amanitin toksinidir¹³⁴. α -amanitinin ökaryot hücrelerde en önemli toksik mekanizması, protein sentezinden sorumlu RNA plimeraz II enzimini inhibe etmesi ve bunun sonucunda protein sentezini durdurmasıdır¹³⁵. α -amanitin güçlü bir toksin olup, *A. phalloides*'de yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır¹³⁶. Benzer şekilde α -amanitin konsantrasyon bakımından amatoksinlerin % 40'ına tekabül etmektedir¹³⁷. Diğer amatoksinler yapı ve toksik özellik olarak α -amanitin toksini ile benzerlik göstermekle beraber etki şiddetleri düşüktür¹³⁸.

α -amanitin, l-aspargin, glisin, d-dihidroksi-l-izolösin (4,5-dihidroksiizolösin), l-izolösin, trans-4-hidroksi-l-prolin, l-sistein ve 6-hidroksi-2-merkaptol-triptofan amino asitlerini içerir (Şekil 6). α -amanitin enzimatik olarak mide ve ince bağırsakta hidrolize uğramaz, çünkü α -amanitin içinde olan peptit bağlarını koparacak peptidaz enzimleri bulunmamaktadır¹³⁹.

α -amanitin araştırmalarda RNA polimeraz II potent inhibitörü olarak kullanılmaktadır⁷. α -amanitin bazı virüsler üzerinde herhangi bir RNA polimeraz inhibisyonu yoktur. İnhibisyon mekanizmasını anlamak ve ökaryot hücrelerinde yeni tedavi yöntemleri bulmak için virüslerle ilgili çalışmalar yoğun olarak yapılmaktadır¹⁴⁰.

Enjalbert ve ark.²¹ 2002 yılında amatoksin zehirlenmesinden kaynaklı tedavi prosedürlerinin detaylarını anlattığı çalışmada, 20 yıllık retrospektif analizler ışığında halen amatoksinin spesifik antidotunun bulunmadığını vurgulamaktadır.



Şekil 6: α -amanitin molekülünün kimyasal yapısı

1.4.1. α -amanitin molekülünün metabolizmadaki etkisi

Amatoksin zehirlenmesinin moleküler mekanizması hücre çekirdeğinin içindeki RNA sentezinin inhibisyonu şeklindedir. Bu bulgulara ilk defa ulaşan Fiume ve Stripe¹³⁸ adlı bilim adamları 1966 yılında yaptıkları çalışma ile fareye verilen α -amanitinden bir saat sonra çekirdek içindeki RNA miktarının azaldığını gözlemlemişlerdir. Daha sonraları bu mekanizmanın RNA polimeraz enzimlerinin bloke edilmesi şeklinde olduğu anlaşılmıştır¹⁴¹⁻¹⁴². Aynı yıllarda Roeder ve Rutter¹⁴³ adlı bilim adamlarının denizkestanesi embriyosundan izole ettikleri RNA polimeraz enzimlerini sınıflandırarak RNA polimeraz I, II, III enzimlerini ayırt etmişlerdir. RNA polimeraz enzimlerinin sınıflandırılmasıyla birlikte Lindell ve ark.¹⁴⁴ denizkestanesi ve sıçanlardan izole ettiği enzimlerle yaptığı çalışmada sadece RNA polimeraz II enziminin α -amanitin tarafından inhibe edildiğini saptamıştır. Sonraki yapılan çalışmalarda, RNA polimeraz I enziminin α -amanitine karşı duyarsız olduğu, RNA polimeraz III enziminin ise α -amanitin tarafından inhibe edildiği, fakat α -amanitine karşı afinitesinin çok az olduğu anlaşılmıştır¹⁴⁵.

RNA polimeraz II aktivitesinin inhibisyonu, amatoksinin toksik özelliklerine dayalı tek basamaklı bir mekanizmadan oluşmamaktadır. Biyolojik sıvının yer değiştirmesi, hücre içine girmesi ve birikmesi gibi faktörler inhibisyon mekanizmasının aktivitesini değiştiren faktörlerdir¹³⁹.

Yapılan çalışmalardan çıkan bulgular amanitinin enzimatik olarak RNA polimeraz II enzimini inhibe etmesi ile transkripsiyonu durdurması ve bunun sonucunda mRNA oranının düşmesi ve protein sentezinin durması nedeniyle hücre ölümlerinin meydana

gelmesi şeklindedir. Amanitinin karaciğer hücrelerine girişleri ise sodyum (Na) aracılı taşıyıcılar yolu ile yapılmaktadır¹⁴⁶. Amanitin karaciğer hücrelerine girerken kullandıkları yollar amanitine has transport sistemleri değildir^{39, 80}.

α -amanitin RNA polimeraz II enzime afinitesi yüksek olmasından dolayı ($K_d \sim 10^{-9} M$)¹⁰², α -amanitin RNA polimeraz II enzime sıkıca bağlanır¹⁴⁷. Amatoksin inhibisyonu yarışmalı değildir⁷.

1.4.1.1. RNA polimeraz II enzimi

Genel anlamda canlıların genetik bilgilerini muhafaza ve nesilden nesile aktarımını sağlayan DNA (deoksiribonükleik asit) molekülü bunun yanı sıra protein sentezi, RNA üretimi, polipeptit sentezlenmesi gibi birçok hücresel olayda etkin role sahiptirler. Bu hücresel olaylardan biri olan protein sentezi genellikle şifrelerini DNA'dan alan enzimatik bir mekanizma ile meydana gelmektedir. Çift sarmal şeklinde olan DNA sarmalının ayrılmasıyla protein sentezi için gerekli olan şifre kodlanarak RNA sentezlenir. Transkripsiyon sırasında DNA sarmalından RNA kodlanması RNA polimeraz enzimleri sayesinde olur. RNA polimeraz enzimleri ise 3 gruba ayrılırlar; RNA polimeraz I, II, III. RNA polimeraz I enzimi ribozomal RNA molekülünün sentezinden sorumlu iken RNA polimeraz III enzimi taşıyıcı RNA ve diğer küçük RNA moleküllerinin sentezinden sorumludur. RNA polimeraz II enzimi ise protein sentezinde kullanılan bütün gen kodlarının transkripsiyonundan ve fonksiyonel RNA moleküllerinin sentezinden sorumludur.¹⁴⁸

1.4.2. α -amanitin molekülünün toksikokinetiği

Amatoksinler insanlarda sindirim yolundan çok hızlı emilirler ve karaciğer hücreleri tarafından büyük oranda alınırlar, buradan safra kesesine atılırlar. Daha sonra duodenuma salgılanırlar ve buradan da tekrar geri emilirler^{80, 19}. Bunun sonucunda amatoksinlerin büyük bir kısmı enterohepatik döngüye uğrarlar¹¹⁷. Bu enterohepatik döngü sırasında kan plazmasında da toksinler bulunur. Fakat kan proteinlerine bağlandığı için serumda serbest olarak dolaşamazlar¹⁴⁹. Amatoksinler enterohepatik dolaşıma katılmaları ve böbrekten geri emilime uğramaları nedeniyle toksisiteyi yüksektir¹⁵⁰. Amatoksinler, fallotoksin ve virotoksinlerden yaklaşık olarak 10-20 kat daha zehirli toksinlerdir⁷.

Amanitin toksinleri böbrek glomerulus hücrelerinde süzülür, böbrek tübüllerinde geri emilime uğrar ve bunun sonucunda akut böbrek tübüler nekrozuna sebep olurlar¹⁵¹. Amanitin grubu toksinler direkt etkili nefrotoksinlerdir. Proksimal ve distal tübüllerde nekroza neden olurlar^{104,152-153}. Farelerdekinin aksine, sıçanların böbreklerinde bulunan proksimal tübül hücreleri α -amanitinden etkilenmezler¹⁵⁴. Amanita mantar cinsi zehirlenmelerinde oluşan böbrek hasarları genellikle geri dönüşümlüdür¹⁵⁵.

İn vivo toksisite çalışmalarında genellikle 0.1-0.4 mg/kg α -amanitin dozu yetişkinlerde ölümcül olarak kabul edilir (Fareler için periton içi LD₅₀ 0.3 mg/kg)¹⁵⁶. Köpeklerde bu oran intravenöz verildiğinde 0.1 mg/kg'e kadar inebilmektedir. Sadece sıçanlarda bu dozun 2 mg/kg'dan fazla olması söz konusudur. Çünkü sıçanlarda böbrek tübüllerinde α -amanitin geri emilemediğinden idrarla atılımı fazladır¹⁵⁷. α -amanitin farelere enjekte edildikten sonra karaciğer nekrozu meydana gelir ve fareler 2-5 günlük süre zarfında ölürlür¹³⁸.

Ökaryotik hücrelerin α -amanitine duyarlılıkları farklılık göstermektedir. Bazı hücrelerin α -amanitine karşı dirençleri α -amanitin hücre içine girememesinden kaynaklandığı gibi, farklı türlerdeki benzer hücrelerin duyarlılıkları da farklılık gösterebilmektedir¹⁵⁸. İnsanlarda ise karaciğer hücreleri, böbrek proksimal tübül hücreleri α -amanitinden en çok etkilenen hücrelerdir ve α -amanitin bu hücrelere hızlı bir şekilde geçer^{59,79}. α -amanitin pankreas, adrenal korteks, ve testis gibi bazı organları da olumsuz yönde etkilediği gözlenmiştir.⁶³

α -amanitin hamile bayanlarda plasentadan geçmediği söylenmektedir. *A. phalloides* zehirlenmesi ile hastaneye yatırılan 8 aylık hamile bir bayanın kan plazmasında α -amanitin miktarı 18.5 ng/ml (HPLC) olmasına rağmen amniotik sıvıda toksin miktarı bulunamamıştır. Başarılı bir tedavi sonucunda anne kurtarılmış ve sağlıklı bir bebek dünyaya getirmiştir¹⁵⁹.

1.5. *Amanita phalloides* Zehirlenmelerinin Klinik Seyri

1.5.1. Semptomlar

Ölümcül zehirlenmeye neden olmayan mantarlarla görülen zehirlenmelerde semptomlar kısa sürede başlarken, *A. phalloides* tipi mantar zehirlenmelerinin semptomları mantar yendikten en az 3 saat sonra meydana gelmektedir (3-6 saat). Genellikle öldürücü olan

mantar zehirlenmelerinin semptomları geç başlar⁵⁴. Yüksek toksisiteli bu mantarların semptomları karakteristik olarak 4 evrede gerçekleşir.

1.5.1.1. Birinci evre

Amatoksin zehirlenmesinin latent fazıdır. Mantar yendikten sonra en az 3 saate kadar semptomlar gözlenmez. Bu evre mantar zehirlenmeleri arasında amatoksin zehirlenmelerinin karakteristik özelliğidir⁵⁵.

1.5.1.2. İkinci evre

Bu evrede; karın ağrısı, mide bulantısı, kusma, ishal, hematuri, sıvı ve elektrolit kaybı gibi semptomlar görülür (6-24 saat)¹⁹. Bununla beraber her zaman olmasa da taşikardi, hiperglisemi, hipotansiyon, dehidratasyon, elektrolit seviyelerinde de düzensizlik görülür⁵⁶. Bu evrede karaciğer fonksiyon testlerinde herhangi bir değişiklik görülmediği için hastalar yanlışlıkla taburcu edilebilirler.

1.5.1.3. Üçüncü evre

Üçüncü evre 24-48 saat aralığında görülür. Bu zaman diliminde sindirim yolu ağrıları biter ve hasta kendini iyi hissetmeye başlar. Fakat bu evrede karaciğer ve böbrek fonksiyonlarında artan seviyede bozukluklar meydana gelir⁵⁷.

1.5.1.4. Dördüncü evre

Bu evre ikinci günden sonra başlayan semptomların olduğu evredir (2. gün sonrası). Bu evrede karaciğer hücre hasarı ve böbrek fonksiyonları ile ilgili bozukluklar artarak devam eder. Karaciğer transaminaz enzimi ve kreatinin seviyelerinde ani yükselmeler görülür. Aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), GOT, GPT, LDH ve bilirubinin gibi bazı karaciğer enzimlerinin serum konsantrasyonlarında artış meydana gelir. Bu enzimlerin artması ile vücutta koagülasyona bağlı iç kanama, metabolik asidoz ve ensefalopati gelişir. Bunu takiben sarılık, hipoglisemi, oliguri, delirium, konfüzyon gelişir. Ağır karaciğer hücre nekrozu ve akut böbrek yetmezliği meydana gelir. Karaciğer enzimlerinin yükselmesi durdurulamaz ise karaciğer yetmezliği ve çoklu organ hasarı sebebiyle hasta komaya girer ve ölüm meydana gelir⁵⁶.

Ölüm genellikle mantar alımının 6-16 günleri arasında görülür. Uygulanan tedaviler başarılı olursa ya da alınan toksin miktarı yeterince toksisiteye neden olmazsa, toksisiteye maruz kalmayan karaciğer hücrelerinin fonksiyonunun düzene girmesi sonucunda hasta sağlıklı bir şekilde hayatına devam edebilir^{13,58-60}. Birçok mantar yendikten sonra sindirim sistemi bozuklukları meydana getirir. Bunların çoğunda semptomlar kısa sürede başlar ve karaciğer toksisitesine neden olmaz⁴³.

1.5.2. Tedavi süreçleri

A. phalloides mantarında bulunan amatoksinlerin spesifik antidotu yoktur. Bugüne kadar *A. phalloides* zehirlenmesi tedavilerinde radikal bir tedavi prosedürü oluşturulamamıştır. Günümüzde dünya genelinde amatoksin kaynaklı mantar zehirlenmesi tedavisinde birçok farklı tedavi yöntemi denenmiştir^{20,61}. Palyatif tedavi seçenekleri; destekleyici tedavilerin uygulanması, metabolik sıvıların ve koagülasyon faktörlerinin yerine konması şeklindedir. Amatoksin kaynaklı mantar zehirlenmesi tedavilerinde öncelikli olarak stabilizasyon, dekontaminasyon, eliminasyonu arttırmak ve antidot tedavisi amaçlanmaktadır³⁴.

1.5.2.1. Stabilizasyon

Mantar zehirlenmesi tedavilerinde hastaneye başvuran hastaların hastalık öyküleri ayrıntılı bir şekilde alınması gerekir. Tanı, anamnez, mantar örneklerinin incelenmesi ve klinik bulgular ile konulabilir^{13,62}. Hastalarda oluşan sulu ishal kaynaklı sıvı replasmanı gerekli ise; elektrolit, glukoz, sıvı tedavisine başlanmalıdır^{63,64}. Sindirim sistemi bozukluklardan kaynaklı şikayetleri en aza indirgenerek hastanın vücut fonksiyonları denge halinde tutulmaya çalışılmalıdır⁶⁵.

1.5.2.2. Dekontaminasyon

Dekontaminasyon için; mide yıkaması, aktif kömür uygulaması ve laksatif gibi yöntemler kullanılır⁶⁶. Erken teşhis, kusturma, midenin yıkanması, toksinin emilmesini engellemek için aktif kömür gibi uygulamalar erken dönemde tedavinin etkinliğini artırır⁶⁷⁻⁶⁸. Fakat erken teşhis mümkün olmamışsa; kusturma işlemi zehiri vücuttan uzaklaştırmaya katkı sağlamaz. Çünkü mantar yeme zamanı ile semptomların başlama zamanı arasındaki geçen süre uzundur⁶⁹.

1.5.2.3. Eliminasyonu arttırma

Aferez ve diürez gibi uygulamalar destekleyici tedavi olarak önemlidir⁷⁰. Kandaki serbest toksinlerin atılımını sağlamak için idrar çıkışı 3-6 ml/kg/saat olacak şekilde diürez sağlanmalıdır^{65,71}. Hemodiyaliz, böbrek fonksiyonları bozukluklarının giderilmesinde başarılı bir uygulama olarak tedavide kullanılmakla beraber, amanitin ve falloidin atılımına yararı olmamaktadır⁷²⁻⁷⁴.

1.5.2.4. Antidot tedavisi

Amanita cinsi mantar zehirlenmelerinde standart bir tedavi stratejisi yoktur. N-asetilsistein (NAC), silibinin, tiotik asit ve penisilin G gibi birçok ilaç tedavide kullanılmasına rağmen, bu tedavilerin klinik etkinliği tartışmalı bir konudur²¹. Amatoksin zehirlenmesi tedavilerinde genellikle birçok ilacın kombinasyonu ile tıbbi müdahalelerde bulunmaktadır^{5, 35, 59, 66, 75-76}.

Penisilin G'nin özellikle steroidlerle beraber kullanıldığında serum proteinlerine bağlandığı ve amanitinin böbreklerden atılımını kolaylaştırdığı düşünülmektedir⁷⁷. Aynı şekilde fenilbutazon, kloramfenikol gibi ilaçlar da amatoksinlerin plazma proteinlerine bağlanmasını engelleyerek böbrek klirensini arttırmak için kullanılmaktadır⁷⁸. Retrospektif klinik çalışmalar ile yüksek doz penisilin G verilmesinin mortaliteyi azalttığı görülmüştür¹⁸. Fakat penisilin G'nin kendisinin neden olduğu toksisite engellenemediğinden ve karaciğer hücrelerini nasıl etkilediği bilinmediğinden bu tedavi yöntemi tercih edilmemektedir²¹.

Enjalbert'in²¹ yapmış olduğu 20 yıllık retrospektif çalışmaya göre amatoksin zehirlenmesi tedavisinde beta-laktam antibiyotikler, antioksidanlar, tiotik asit, hormonlar, steroidler gibi birçok ilaç kullanılmasına rağmen sadece silibinin ve NAC tedavide etkinlik gösterebilmektedir. Silibinin ve prednizolon gibi ilaçlar α -amanitinin karaciğer hücrelerine girişini engellerler. Penisilin G ve tiotik asit gibi ilaçların ise α -amanitinin karaciğer hücrelerine girişinin engellenmesinde herhangi bir etkisi yoktur⁷⁹. Silibinin ve prednizolonun koruyucu etkisi α -amanitin ile aynı transport sistemi kullanmaları sebebiyle kompetitif (yarışmalı) inhibisyonu sağlayarak α -amanitinin hücre içine alınmasını engellemek şeklindedir⁸⁰. *Silybum marianum* bitkisinden elde

edilen silibinin mantar zehirlenmelerinde sıkça kullanılsa da karaciğeri olumsuz etkilediği için Amerika ve Fransa gibi bazı ülkelerde kullanılmamaktadır⁸¹.

Yakın zamana kadar amatoksin kaynaklı mantar zehirlenmelerinde tiotik asit kullanılırdı. Kubick adlı bir bilim adamının ilk defa 1959'da tedavide kullandığı⁸² bu madde genellikle intravenöz yolla günde 400 mg ve dört farklı zamanda verilmekteydi. Fakat bu ilacın hipoglisemiye arttırıcı yan etkisi olduğu gözlenmiş⁸³ ve kontrol edilebilir bir tedavi olmadığı, yalnızca birkaç küçük çalışmada mortaliteyi azalttığı rapor edilmiştir⁸².

Amatoksin kaynaklı mantar zehirlenmesinde kullanılan bir diğer ilaç olan simetidin karaciğere gelen kan akım hızını azaltan bir maddedir⁸⁴.

Son zamanlarda yapılan bazı araştırmalarda α -amanitin silibinin ve NAC gibi bazı anti-oksidan maddelerle beraber kullanıldığında kanser tedavilerinde yararlı etkileri olabileceği vurgulanmıştır⁸⁵⁻⁸⁶.

Transfüzyon (kan değişimi)⁸⁷, yüksek dozda kortikosteroid ilaçlar⁸⁸ gibi birçok tedavi uygulanmasına rağmen, bu tedavilerin hiçbirisi destekleyici tedaviler kadar etkili olamamışlardır.

Yüksek konsantrasyonlarda alınan α -amanitin karaciğer hücrelerinde apoptozize neden olur ve bunun sonucunda sistemik plazma sıvısındaki AST enzim seviyesi düşer⁸⁹. *A. phalloides* zehirlenmelerinde AST ve ALT gibi enzimlerin seviyelerine bakarak karaciğer harabiyetinin derecesi anlaşılabilir⁹⁰⁻⁹¹. Klinik analizlere bakıldığında amanitin kaynaklı zehirlenme vakalarının % 20'sinde kronik aktif hepatit meydana gelmektedir. Bu hastaların karaciğer fonksiyon testleri normale dönene kadar doktor gözetiminde bulunması gerekir¹⁶. Ayrıca yaygın karaciğer hasarı sırasında beyin ödemi engellemek amacıyla hemoperfüzyon uygulanması tedavinin seyrini değiştirmemektedir⁹².

A. phalloides kaynaklı yaygın karaciğer yetmezliğinde, protrombin zamanının 2 kattan uzun olması, ensefalopati ve faktör V düzeyinin % 20-30'un altına düşmesi durumunda mortalite yükselir⁷⁷ ve karaciğer nakli kaçınılmaz olur^{63,93-96}. Yapılan klinik çalışmalarda nakledilen karaciğerlerde zehirlenme riskinin olmadığı ve bu hastaların sağlığına kavuştukları gözlenmiştir^{19,97}. Amatoksin zehirlenmesinden kaynaklı karaciğer yetmezliği sebebiyle ilk karaciğer nakli 1985 yılında yapılmış ve bu tedavi yöntemi

günümüze kadar başarılı bir şekilde uygulanmaktadır⁹⁸. Eğer karaciğer hasarı sınırlı ve geri dönüşümlü ise hasta kurtarılabilir⁹⁹.

1.6. Farmakokinetik ve Toksikokinetik

1.6.1. Farmakokinetik ve toksikokinetik tanımlar

Farmakokinetik ve toksikokinetik, ilaç, zehir ve kimyasal maddelerin vücut içindeki davranışının belirlenmesi, miktarının hesaplanması ve vücuda verilen sistemik dozdaki maddenin vücut kompartmanlarındaki konsantrasyonları ile arasındaki ilişkiyi inceleyen bilim dalıdır. Bu ilişki ilaçların çoğu için belirlenmiştir. Ksenobiyotiklerin vücutta dağılım zamanı, absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve itrahındaki miktarının matematik modelleme ile hesaplanması farmakokinetik ve toksikokinetiğin temel konularından biridir. Birçok ilaç için farmakolojik etki ve plazmadaki konsantrasyon arasında basitçe açıklanabilir bir ilişki bulunamamıştır. Bu yüzden ilaçların veya diğer ksenobiyotiklerin farmakokinetik hesaplamaları gittikçe önem kazanmaktadır.

İlaçların vücut içindeki davranışlarını kontrol eden en önemli parametreler klirens, dağılım hacmi, yarılanma ömrü, biyoyararlanımdır.¹⁶⁰⁻¹⁶¹.

1.6.1.1. Klirens

Klirens (CL) genel olarak bir ajandan birim zamanda temizlenen (arıtılan) plazma hacminin göstergesidir. Klirens hesaplaması sırasında ilacın uygulanmasından sonra oluşan grafikteki zamana bağlı olan parabolün altındaki alanın (eğri altı alan) bilinmesi gerekir. Eğri altındaki alan (EAA) kısaca ilacın vücutta kaldığı süre içerisinde ölçülen konsantrasyonlarının toplamı olarak düşünülebilir. EAA absorpsiyon hızına bağlı değildir¹⁶².

Klirens şu şekilde hesaplanır:

$$EAA = F \cdot \text{Doz (biyoyararlanım)} / CL$$

(F: biyoyararlanım faktörü)

Bu denklemden yararlanılarak bir toksinin sistemik klirensini bulabiliriz;

$$\text{İV verilişte; } CL = \text{Doz}_{i.v.} / \text{EAA}$$

$$\text{Oral verilişte; } CL = F \cdot \text{Doz}_{oral} / \text{EAA}$$

Benzer şekilde toksinin eliminasyon hızı ve konsantrasyonu da bize klirensi verir;

$$CL = \text{eliminasyon hızı} / C$$

(C: konsantrasyon)

Toksinlerin eliminasyonu mide-incebağırsak, böbrek, karaciğer ve diğer organlarda görülebildiği için klirens hesaplamaları yapılırken her bir organın klirensinin toplamı bize toplam klirensi verir;

$$CL = CL_{\text{böbrek}} + CL_{\text{karaciğer}} + CL_{\text{diğer}}^{160}$$

1.6.1.2. Dağılım hacmi

Dağılım hacmi (V_d) toksinin vücutta homojen bir şekilde dağıldığı sıvının hacmi demektir. Vücuttaki toksin miktarı ile kan, plazma ya da serum içerisinde bulunan toksin konsantrasyonunun orantılanmasıdır;

$$V_d = T / C$$

(T: total ilaç miktarı)

Bir toksinin dağılım hacmi o toksinin teorik olarak vücutta dağıldığı alanı gösteren hacmine denir. Fakat bu değer olası bir kavramdır. Çünkü bu hacim saptanabilir

fizyolojik bir hacimden çok, vücuttaki tüm toksini içine almak için gerekli olan sıvı hacmini belirtir;

$$V_{SS} = V_C + V_T$$

(V_{SS} : kararlı durum hacmi)^{160, 162}

1.6.1.3. Yarılanma ömrü

Yarılanma ömrü ($t_{1/2}$), bir toksinin plazmada yada vücutta maksimum konsantrasyonunun yarıya inmesi için geçen süreye denir. Yarılanma ömrü toksin ve toksinin verildiği organizmanın özelliklerini gösteren bir parametredir. Yaş, dağılım hacmi, toksinin proteinlere bağlanması gibi faktörler yarılanma ömrünü etkileyen faktörlerdir. Yarılanma ömrü doza bağlı bir parametre değildir:

$$t_{1/2} \approx 0.693 \times V_{ss}/CL^{162}$$

1.6.1.4. Biyoyaralanım

Biyoyaralanım toksinlerin etki etmesi istenilen bölgedeki miktarının, verilen doza yüzde olarak oranıdır. Biyoyaralanım, toksinin hangi yoldan verilirse verilsin emiliminden etki yerine varıncaya dek olan konsantrasyonları göz önüne alan kinetik bir kavramdır¹⁶².

Maksimum biyoyaralanım ancak İ.V. yolla enjekte edildiğinde meydana gelir. Çünkü toksin İ.V. yolla verildiğinde verilen dozun %100 emilir. Benzer şekilde biyoyaralanım toksinin oral yoldan verildiğinde kana geçme derecesidir. Biyoyaralanımda önemli parametreler şunlardır: eğri altındaki alan (EAA), doruk konsantrasyon (C_{doruk}), C_{doruk} 'a ulaşmak için gerekli olan zaman (t_{doruk})¹⁶³. İlaçların İ.V. dışındaki diğer yollarla vücuda verildiğinde, toksinin emilen fraksiyonu (F) verilen dozdan az veya eşit olduğundan, biyoyaralanım söz konusu olur ve aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$F = EAA_{oral}/EAA_{iv}$$

1.6.2. Absorbsiyon kinetiği

1.6.2.1. Birinci derece kinetiği

Toksinin vücuda alındıktan sonra kompartmanlar arasındaki transferi sırasında toksinin transfer hızının kompartman dışında kalan toksin konsantrasyonu ile orantılı olması durumuna birinci derece kinetiği denir:

$$\text{Absorbsiyon hızı} = k_a \times C^1$$

(k_a : absorpsiyon hız sabiti, C: toksin uygulama yerindeki konsantrasyon)

Uygulama yerindeki toksin miktarının zamana göre azalması eksponensiyel şekilde olur. Başlangıçta (t_0) toksinin uygulama konsantrasyonu C_0 ise difüzyon başladıktan t süre sonraki konsantrasyon şu şekilde hesaplanır:

$$C = C_0 \times e^{-k_a.t}$$

Absorpsiyonun yarılanma ömrü:

$$t_{1/2} = 0.693/k_a$$

1.6.2.2. Sıfırıncı derece kinetiği

Farmakokinetik ve toksikokinetik bir olay eğer konsantrasyondan bağımsız olarak, sabit bir hız (k) ile meydana geliyor ise bu sıfırıncı derece kinetiğine uygun bir absorpsiyon durumudur (hız = k).

$$\text{Hız} = k \times C^0$$

$$(C^0 = 1)$$

Esas olarak ilacın absorpsiyonu sırasında difüzyon veya aktif taşımada doygunluk olduğunda, ya da sabit hızla salıverilen bir farmasötik şekilde üretilen ilaçların absorpsiyonu gibi durumlarda sıfırıncı derece kinetiğinden söz edilebilir¹⁶⁴.

1.6.3. Farmakokinetik ve toksikokinetik modeller

1.6.3.1. Tek-kompartman modeli

Tek kompartmanlı modellerde vücuda verilen toksinin vücutta sabit bir hacimde homojen olarak dağıldığı farz edilir. Toksin intravenöz verildikten sonra vücutta bir anda dağılıma uğradığı düşünülür. Bu model pratik uygulamada nadir görülür. Toksinin vücutta eliminasyonu 1. Derece kinetiğine göredir. Yani birim zamanda toksinin sabit bir fraksiyonu elimine olur. Toksinin vücuda verilmesiyle oluşan grafiğin eğimi eliminasyon hız sabitesi (-k) diye adlandırılır. Toksinin vücuda uygulanmasından sonraki herhangi bir t zamanındaki plazma-toksin konsantrasyonunun denklemi:

$$\ln C_2 = \ln C_1 - kt$$

Herhangi iki zamanda plazma konsantrasyonları arasındaki ilişki:

$$\ln C_1 = \ln C_0 - k(t_2 - t_1)$$

Eliminasyon hız sabiti (k), Vd ve CL arasındaki ilişki:

$$CL = k \times Vd^{162,165}$$

1.6.3.2. İki-kompartmanlı model

Bu modelde vücut iki kompartmandan (dağılım hacminden) oluştuğu varsayılır: Ufak sanal hacimli santral kompartman ve daha büyük hacimli periferik kompartman. Santral

kompartman, vücutta dolaşan kan hacmi ve fazla kanlanan organların interstisyel sıvı hacminden ibarettir. Periferik kompartman ise genellikle az kanlanan organların interstisyel sıvı hacminden ibarettir. Daha yaygın ve birinci derece kinetiğine uygun bir modeldir. Başlangıçta toksinin periferik dokulara geçme hızı santral kompartmandan elimine olmasından daha hızlıdır. Santral kompartmandaki toksin miktarı periferik kompartmandaki toksin miktarına eşitlendikten sonra sistem tek kompartmanlı model gibi sabit bir eliminasyon ile devam eder. Bu modelde toksinlerin yarılanma ömrü şu şekilde hesaplanır:

$$t_{1/2} = 0.693/k_e$$

(k_e : eliminasyon katsayısı)^{162,164,165}

1.7. α -amanitin Molekülünün Analiz Yöntemleri

α -amanitin molekülünün analizi, miktar tayini ve saflaştırma işlemleri; mantarlardan, mantar zehirlenmelerine maruz kalan hastaların plazma, serum, idrar ve bazı organlarından elde edilen örneklerden yapılabilmektedir. α -amanitin molekülünün analizi 25 yılı aşkın süredir radioimmunoassay (RIA) ve kromatografik yöntemler ve son zamanlarda kullanılan ELISA yöntemi ile yapılmaktadır¹⁶⁶. Kanda α -amanitin teşhisi için birçok yöntem olmasına rağmen, klinikte uygulanabilen ve basit olan bir teknik bulunamamıştır¹⁶⁷. Önceleri amanitinlerin teşhisi RIA metodu ile yapılabilmekteydi. Bu yöntemde radyoaktif I^{125} atomu ile işaretlenmiş izotop atomlar kullanılmaktadır. Fakat bu yöntem zehirlenme vakalarında amanitin teşhisinden ziyade, daha çok kinetik çalışmalarda amanitinlerin önceden işaretlenmesiyle bulunabiliyordu¹⁶⁸. Daha sonraları ince tabaka kromatografisi (TLC) kullanılmaya başlandı. Bu yöntem hassas olmamakla beraber RIA ile doğrulanması gerektiğinden çok kullanılmamıştır¹⁶⁹. Aynı zamanda α -amanitin teşhisi ELISA yöntemi ile de yapılabilmektedir. ELISA yöntemi RIA ile kıyaslandığında kolay uygulanabilir bir yöntemdir ve radyasyona maruz kalınmadığı için avantajlıdır. Kromatografik yöntemlere nazaran tedavi öncesi örnek alınımına gereksinim duymaz. Ekonomik olarak daha uygun bir yöntemdir, fakat β -amanitin gibi diğer toksinlerin analizi bu yöntem ile yapılamamaktadır. Aynı zamanda α -amanitin kitinin elde edilme imkânı kısıtlıdır¹⁶⁶. α -amanitin analizlerinde kullanılan başka bir yöntem ise yüksek

performanslı sıvı kromatografisidir (YPSK-HPLC). Bu yöntem ile sindirim sistemi sıvısında, feçes ve dokularda analiz yapılabilmektedir¹⁹. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometrede (LC-MS) yeni yöntemler geliştirilmiştir. Karaciğer dokularında, idrar ve serumda α -amanitin tayini yapılabilmektedir¹⁷⁰. LC-MS sistemi birçok laboratuvarında bulunmamakta, hassasiyetinin ve diğer parametrelerinin uygun hale getirilmesinde zorluklar yaşanmaktadır. Ayrıca yöntem olarak uzun deney prosedürü kullanılmaktadır¹⁷¹. Analitik toksikolojide en önemli analiz yöntemi olarak görülen gaz kromatografisi-kütle spektrometrede (GS-MS) ise biyolojik sıvılarda amatoksin analizi yapılamamaktadır¹⁷².

1.7.1. Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC)

A. phalloides'in barındırdığı toksinlerin fiziko-kimyasal özelliklerini araştırmada ve tayininde kullanılan en etkili yöntem ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisidir (RP-HPLC). Bu yöntemde serum, idrar ve mantar örneklerinde aynı anda amatoksin ve fallotoksin analizleri yapılabilmektedir¹⁶⁷. Enjalbert ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada RP-HPLC metodu kullanılarak yapılan deneyde bütün amatoksinlerin ve fallotoksinlerin analizi ve miktar tayini yapılmıştır¹⁷³.

RP-HPLC yöntemi bütün kromatografik yöntemler arasında en etkili olanıdır. Diğer kromatografik yöntemlerde ayrıştırılamayan maddeleri kolaylıkla saflaştırıp analiz etme imkânı sunmaktadır. RP-HPLC yöntemi analitik kimya başta olmak üzere birçok alanda kullanılmaktadır. Bu yöntem makromoleküller, inorganik moleküller, doğal ürünler, farmasötik bileşikler ve biyokimyasal maddelerin tanımlanması ve saflaştırılmasında kullanılan önemli bir yöntemdir.

HPLC yöntemi yeni saflaştırma yöntemleri geliştirme sürecinde sıvı kromatografisinin geliştirilmesi ile elde edilmiştir. Klasik sıvı kromatografilerinde (LC) saflaştırma süreci uzun ve saflaştırma derecesi düşüktür. Yöntem olarak bir cam kolonun içine madde ayırımını sağlayacak aliminyum, silika gibi madde (sabit faz, adsorband) koyulur ve saflaştırılacak madde kolonun üst tarafına konularak kolona sıvı akımı (mobil faz) verilir. Madde, bu sıvı akımı kolondan geçtiği süre içinde kolonda hareket ederek birbirinden ayrılır.

Sıvı kromatografiler adsorbandın değiştirilmesi ile farklı yöntemlerde saflaştırma yapabilir. Mesela adsorband katı (LSC) veya sıvı (LLC) olabilir. Kromatografik

yöntemlerin geliştirilmesi için maddeleri birbirinden ayıran sabit faz daha küçük hale getirmek amacıyla çalışmalar yapılmış ve mikro düzeyde parçacıklardan oluşan kolonlar geliştirilmiştir. HPLC yönteminde kullanılan bu kolonlar içinde 10, 5, 3 μ m yarıçapında silika parçacıkları bulundurlar. Genellikle 10-25 cm uzunluğunda 4-5 mm yarı çapında olan bu kolonlardaki sıvı akışı yüksek basınç altında uygulanmaktadır. Analitik HPLC yönteminde mobil faz kompozisyonu sabit ise izokratik, mobil faz kompozisyonu değişken ise gradient elüsyon denir¹⁷⁴.

Mantar zehirlenmeleri dünyanın birçok ülkesinde nadir olarak görülmesine rağmen, karşılaşıldığında bazen ölümle sonuçlanabilmektedir. Ölümle sonuçlanan vakalardaki toksinlerin spesifik antidotunun olmayışı nedeniyle halen ölümler görülmekte ve bu da mantar zehirlenmesini ve tedavisini önemli bir araştırma konusu olarak gündemde tutmaktadır.

A. phalloides mantarının içinde bulunan ve canlılarda en etkili toksisiteye neden olan α -amanitin toksini hakkında sınırlı sayıda toksikokinetik çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, mantar ekstraktından HPLC sistemi ile saflaştırdığımız α -amanitin sığanlara oral ve intravenöz yolla verilmesinden sonra, belirli zaman dilimlerinde anestezi altındaki hayvanlardan alınan kan örneklerindeki α -amanitin-serum konsantrasyonunun HPLC yöntemi ile elde edilmesi, ulaşılmış olduğumuz verilerden yola çıkarak toksikokinetik hesaplamalar yapılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmamızda temel olarak ölümcül mantar zehirlenmelerinde başlıca sorumlu olan α -amanitin toksininin sığanlarda bugüne kadar yapılmamış olan toksikokinetik profilinin araştırılması ve bu konu hakkında bilimsel birikime katkıda bulunulması amaçlanmaktadır. Öte yandan, klinik zehirlenme vakalarında hastadaki toksin konsantrasyonunun zamana göre değişimini yorumlamak için literatüre katkı sağlaması arzu edilmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Etik kurul izin belgesi

Çalışmamız için Düzce Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (DÜ-HADYЕК) 2012/05 nolu etik kurul izni alınmıştır.

2.1.2. Standart ve kitler

α -amanitin standardı Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edildi.

2.1.3. *A. phalloides* mantarlarının toplanması

A. Phalloides mantarları Ekim-Kasım 2010 aylarında Düzce/Gümüşova/Yeşilyayla Kasabası ormanlık alanından toplanmıştır. Toplanan mantarlar toplama sırasında Düzce Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü tarafından sistematik olarak tanımlanmıştır. Tanımlamada makroskopik ve mikroskopik özellikleri incelenmiştir. Makroskopik olarak şapka şekli, rengi, çapı, lamel şekli, sap lamel birleşmesi, sap boyu, yüksük ve kapçık şekilleri bakılmıştır. Mikroskopik olarak ise binoküler mikroskopta, x100 büyütmede lamellerden % 20 KOH ile hazırlanmış preparatlarda basidiospor, basidium ve hiflerin şekil ve boyutları incelenerek tanı konulmuştur (Resim 2).

2.1.4. Hayvan materyali

Deneyde 18 adet Wistar (300 ± 30 g) erkek sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar kontrol, oral toksin ve intravenöz toksin olmak üzere rastgele 3 gruba ayrılmıştır. Sıçanlar her kafeste 6 adet olacak şekilde yerleştirildi. Deney hayvanlarının tamamı çalışma boyunca 22 ± 5 °C oda ısısında, 12 saatlik aydınlık-karanlık döngüsü bulunan bir ortamda takip edildi.



Resim 2: *Amanita phalloides*'in makroskopik ve mikroskopik resimleri

2.1.5. Laboratuvar koşulları

Çalışmaların tamamı Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmamızda Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan cihaz, teknik malzeme ve sarf malzemeleri kullanıldı.

2.1.5.1. Cihazlar ve teknik malzemeler

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC, Shimadzu)

Sokslet sistemi

Çok bölmeli hava akımlı kurutucu

Santrifüj (Nüve)

Mikrosantrifüj (Eppendorf Centrifuge-5415 R)

Öğütücü (Premium)

Vortex (Velp)

Manyetik karıştırıcı (Lab Companion)

Hassas terazi (Precisa)

pH ölçüm cihazı (Hana)

Distile su cihazı (TKA-pacific)

Otomatik mikropipetler (Nichiryo)

Buzdolabı (Profilo)

Mikro enjektör (Hamilton)

Cerrahi aletleri

Mikro filtre

Ependorf

2.1.5.2. Kimyasallar

α -amanitin (Sigma-Aldrich)

Amonyum asetat (Merck)

Asetonitril (Sigma-Aldrich)

Metanol (Merck)

2.2. Yöntem

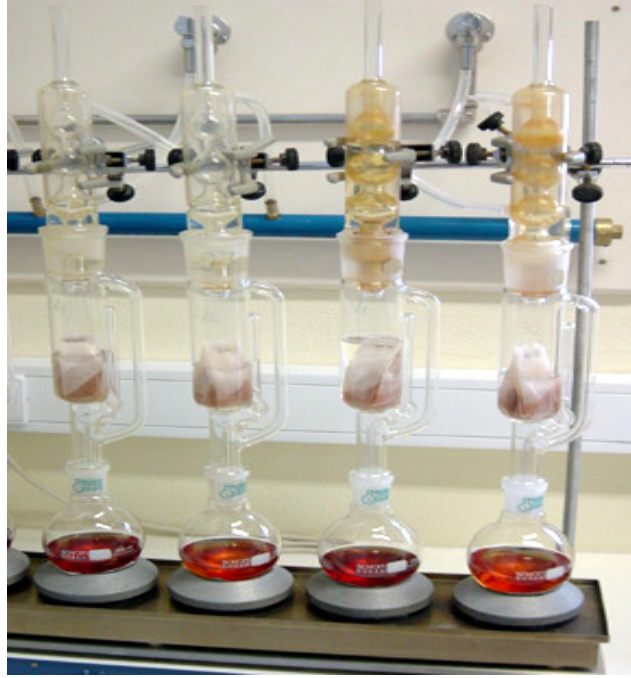
2.2.1. α -amanitin elde edilmesi

α -amanitin deneyde bol miktarda gerektiğinden daha önceden tanımladığımız yöntemle saflaştırıldı¹⁷⁵. Bu yöntem aşağıdaki şekilde uygulandı:

HPLC analizlerindeki tüm çözücüler analitik kalitede kullanıldı. Mantarlar sokslet aparatında %50 metanolde ekstrakte edildi, 2 defa preparatif HPLC saflaştırma işlemi uygulandı. Her bir aşamadan sonra saflık oranları ölçüldü. Toksinin doğrulaması analitik HPLC'deki tutulma zamanı ve UV spektrumu karşılaştırılması yöntemleriyle yapıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SH olarak verildi.

2.2.1.1. Mantar ekstraksiyonu

Mantarlar 50-60°C hava akımı altında 12 saatte kurutuldu, öğütülerek toz haline getirildi. 10 gramlık 6 ayrı sokslet filtresi içine alındı, 6 farklı kanalda 150 mL %50 metanolde 4 saat sokslet aparatında ekstraksiyonu yapıldı (Resim 3). Elde edilen ekstraktlar vakum evaporatörde tam kuru oluşuna kadar 50°C'de buharlaştırıldı. Kalan materyal üzerine 1. mobil fazdan 10 mL eklenerek iyice çözüldü, 10 dakika 4000 rpm'de santrifüj edildi, üstteki sıvı kısım alındı, 45 μ m filtreden geçirilerek preparatif HPLC sistemine 1 mL enjekte edildi.



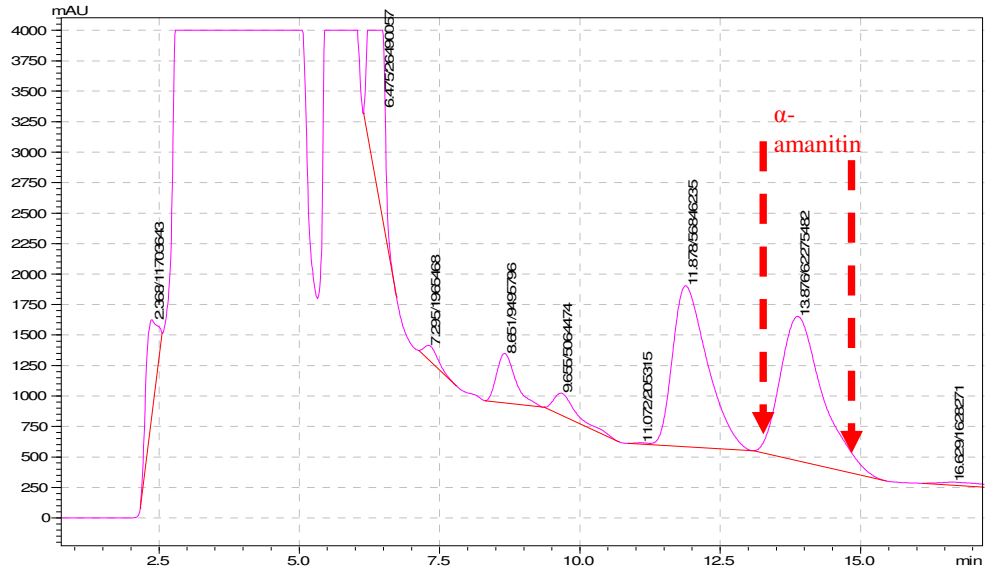
Resim 3: Sokslet ekstraksiyon aparatı

2.2.1.2. Preparatif HPLC Sistemi

Degazer, pompa ve dedektör 2 farklı paralel hatta bağlanarak bir vana yoluyla hem preparatif hem analitik HPLC sistemleri oluşturuldu. Preparatif sistemde degazer (Shimadzu DGU-20A₃) 0.05 mL/dakika hassasiyetli pompa (Shimadzu LC-6AD), bilgi işlem ünitesi (Shimadzu CBM-20A), ayırıcı vana (preparatif/analitik), 5 mL manuel enjektörlü sample loop, C18 ODS 10 μ m partikül, 250x20 mm preparatif kolon (GL Science Inc.), diyod array dedektör (Shimadzu SPD-M20A), fraksiyon toplayıcı (Shimadzu FRC-10A) sistemi kullanıldı (Resim 4). Mobil faz akış hızı 16 mL/dakika izokratik olarak kullanıldı. Birinci mobil faz olarak amonyum asetat (50 mM, pH 5.5 asetik asit), asetonitril, metanol 80+10+10 (v/v/v) kullanıldı. Öncelikle α -amanitin standardı 100 μ g/mL bu sisteme uygulandı ve tutulma zamanı ile toksin UV spektrumu kaydedildi. Hazırlanmış olan *A. phalloides* ekstresi bu sisteme 1 mL uygulandı. α -amanitin standardı ile aynı tutulma zamanında gelen pik başlangıcından sonuna kadar fraksiyon toplayıcı ile toplandı (Şekil 7). Elde edilen fraksiyon vakum evaporatörde 50°C’de kurutuldu, 1 mL olan fraksiyon %40 metanol içerisinde çözüldü ve ikinci saflaştırma için yeniden preparatif HPLC sistemine uygulandı.

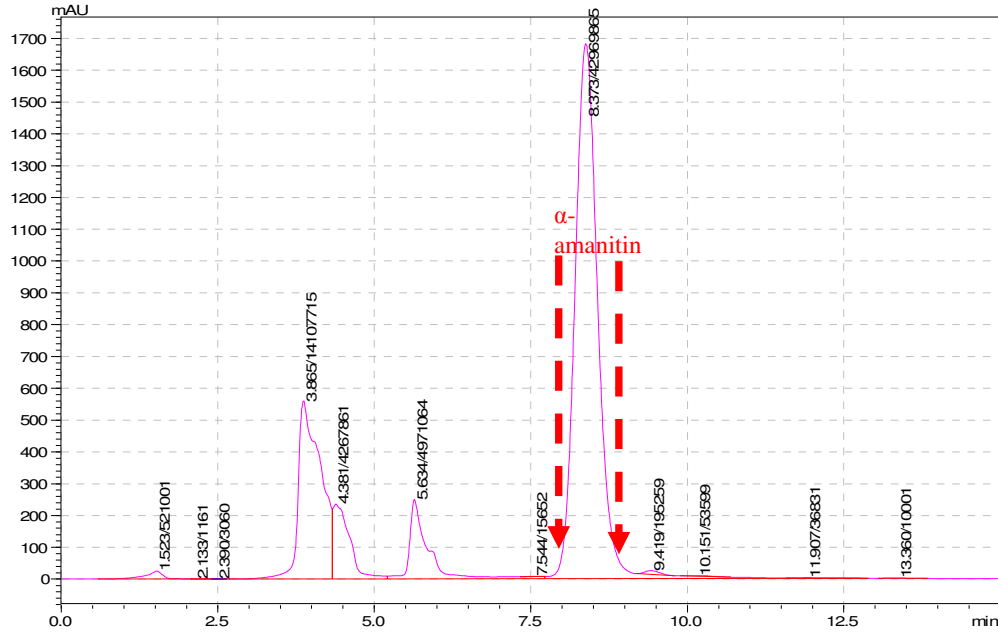


Resim 4: Deneyde kullanılan HPLC sistemi



Şekil 7: Birinci preparatif saflaştırma işlemi kromatogramı: kesikli oklar fraksiyonlama başlangıç ve bitişini göstermektedir.

İkinci preparatif HPLC işlemi, saflık oranını artırmak ve toksini amonyum asetat tuzundan arındırmak amacıyla uygulandı. Bu aşamada ikinci mobil faz olarak %40 metanol kullanıldı. Diğer tüm parametreler aynı yöntemle uygulandı. Bu sistemde de önce α -amanitin standardı uygulandı, tutulma zamanı kaydedildi. Fraksiyonun sisteme verilmesinden sonra standart ile aynı zamanda gelen pik başlangıcından sonuna kadar fraksiyon toplayıcı ile alındı (Şekil 8). Elde edilen fraksiyonun hacmi ölçüldü. Bu fraksiyondaki saflık oranını ve toksin miktarını ölçmek için 20 μ L analitik HPLC sistemine uygulandı.



Şekil 8: İkinci preparatif saflaştırma işlemi kromatogramı: kesikli oklar fraksiyonlama başlangıç ve bitişini göstermektedir.

2.2.1.3. Analitik HPLC sistemi

Yukarıdaki preparatif sisteme paralel olarak ayırıcı vana sonrasında analitik kolon kullanıldı.

2.2.1.3.A. HPLC koşulları

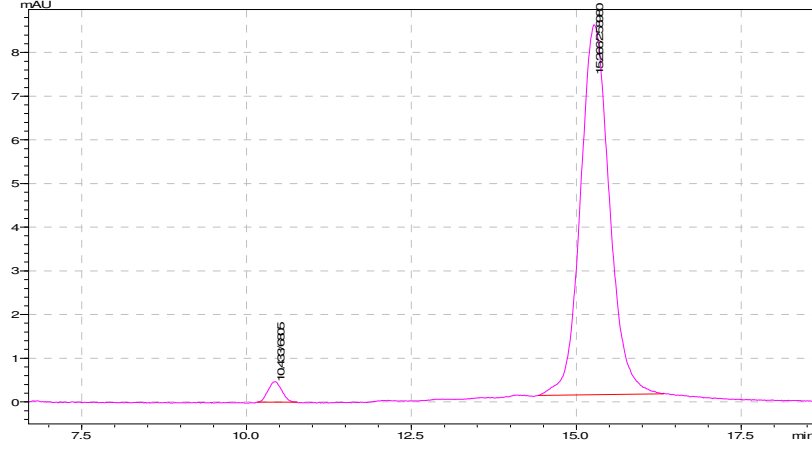
Kolon: Çalışmamızda 5 μ m partiküllü, 4,6 x 250 mm C18 ODS kolon kullanıldı.

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

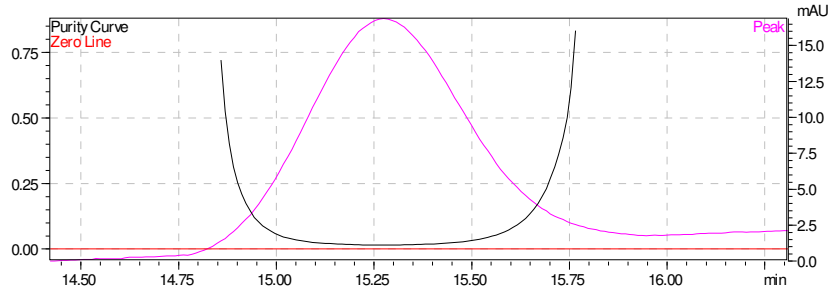
Mobil faz akış hızı: İzokratik olarak 1 mL/dak olarak ayarlandı¹³³.

2.2.1.4. Saflık analizi

Analitik HPLC sisteminde elde edilen kromatogramdaki toksin pikinin tüm piklere oranı saflık oranı olarak kullanıldı. Ayrıca toksin pikinin kendi içindeki saflık oranı UV tarama ile yapıldı. Elde edilen α -amanitin saflık oranı % 99.8 (Şekil 9), pik saflık oranı 0.99995 olarak bulundu (Şekil 10).



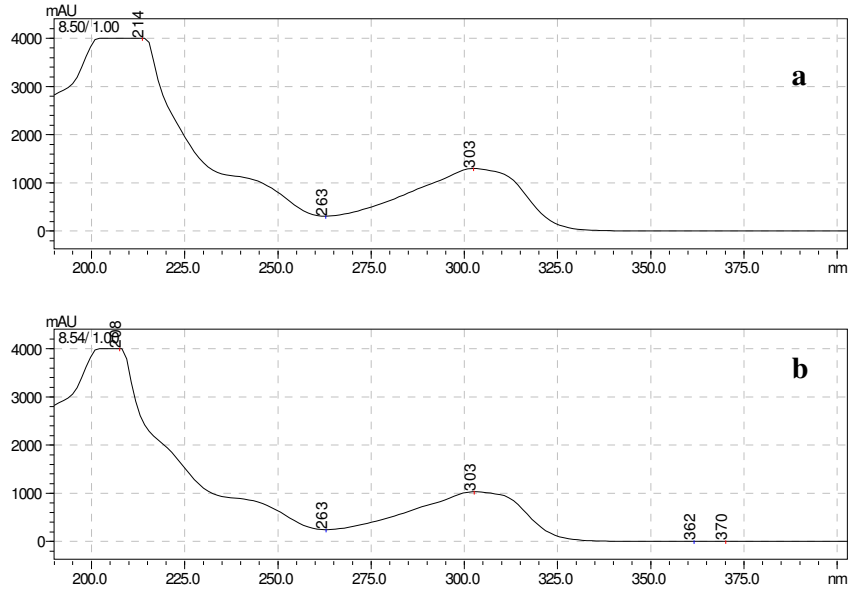
Şekil 9: Saflaştırılarak elde edilen α -amanitin kromatogramı



Şekil 10: α -amanitin pikinin saflık analizi

2.2.1.5. Toksinin doğrulanması

Elde edilen α -amanitin toksininin doğrulanması için 2 yöntem kullanıldı. İlk olarak preparatif HPLC sisteminde tutulma zamanı, ikinci olarak UV spektrumunda minimum ve maksimum absorband değerlerin karşılaştırması yapıldı (Şekil 11).



Şekil 11: α -amanitin standart (a) ve fraksiyon (b) ultraviyole spektrumu

2.2.1.6. Miktar analizi

Analitik HPLC sisteminde α -amanitin standardı için 6 noktalı (her biri 3 defa tekrarlı) kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Kalibrasyon eğrisinin denklemine, analizlerde elde edilen pik alanları uygulanarak madde miktarı ölçümü yapıldı. Elde edilen saf α -amanitin çözücüsü uçurulduktan sonra 1 mL distile suda çözülerek miktar analizi yapıldı. Elde edilen miktar analizi sonucunda sıçanlara 1 mg/kg olacak şekilde distile suda çözünmüş saf α -amanitin uygulandı.

2.2.2. Deney protokolü

Çalışmaların tamamı Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi. Deney için sıçanlara su kısıtlaması yapılmadı ve deney öncesi bir gece sıçanlar aç bırakıldı. Sıçanlar rastgele olarak 2 gruba ayrıldı. Sıçanlara 100 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin ile anestezi yapıldı. Anestezi gerektiğinde ek doz uygulanarak 24 saate kadar uzatıldı (Resim 5). Anestezi altındaki sıçanlardan bir gruba α -amanitin 1 mg/kg dozunda gavaj yöntemi ile oral olarak, diğer gruba juguler venden intravenöz olarak 1 mg/kg dozunda uygulandı. Uygulama sonrasında 2.-5.-10.-15.-20.-45.-60.-90. dakikalarda ve 2.-3.-4.5.-6.-9.-12.-24. saatlerde her bir sıçandan juguler venden 100 μ L kan alındı. Alınan kanlar 20 dakika bekletildi, sonra 5 dakika 10000 rpm altında santrifüj yapıldı. Elde edilen serumdan 30 μ L alınarak üzerine 30 μ L metanol eklendi ve

2 dakika vorteksle karıştırıldı. Tekrar 5 dakika 10000 rpm de santrifüj yapıldı. Üstte kalan sıvı bölümden 20 µL alınarak analitik HPLC cihazına enjekte edildi.

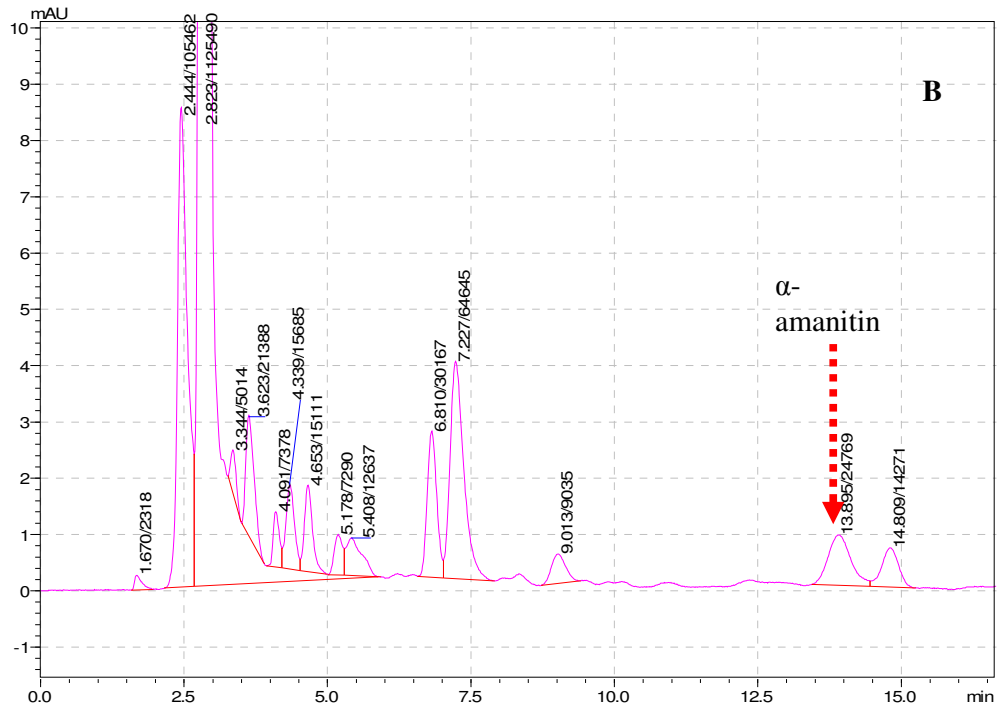
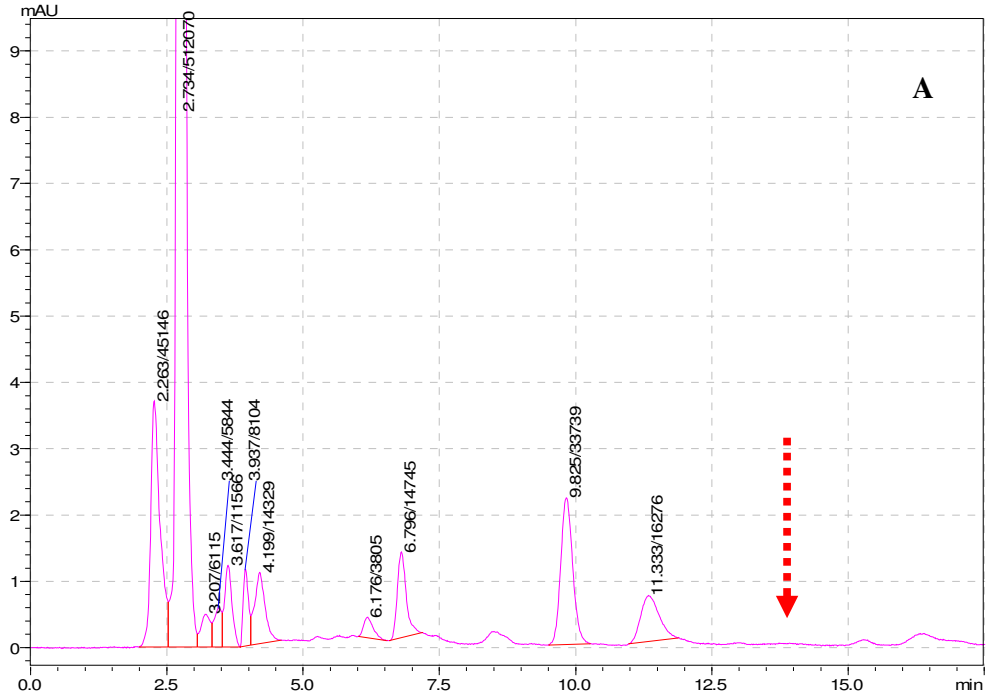


Resim 5: Deney masası genel görünümü

2.2.3. Serumda α -amanitin analizi

α -amanitin analizi için daha önce tanımlanmış yöntem modifiye edilerek kullanıldı¹³³. Bu amaçla öncelikle kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Kontrol grubu sıçanlardan alınan 21 serum örneği üzerine α -amanitin standardı 0.2-0.5-1-2-5-10 µg eklendi. 3 örnek de boş bırakıldı. 2 dakika karıştırıldı, 30 µL serum üzerine 30 µL metanol eklendi ve 2 dakika vorteksle karıştırıldı. Tekrar 5 dakika 10000 rpm de santrifüj yapıldı. Üstte kalan sıvı bölümden 20 µL alınarak analitik HPLC cihazına enjekte edildi. Elde edilen sonuçlar X-Y dağılım grafiğine uygulanarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. HPLC analizi sonucunda elde edilen pik alanları bu denkleme uygulanarak α -amanitin miktarı hesaplandı.

HPLC sisteminde 5 µm partiküllü, 4.6 x 250 mm C18 ODS kolon kullanıldı. Mobil faz olarak amonyum asetat (50 mM, pH 5.5 asetik asit), asetonitril, metanol 80+10+10 (v/v/v) kullanıldı. Mobil faz akış hızı izokratik olarak 1 mL/dak olarak ayarlandı. HPLC sistemi olarak yukarıda tanımlanan analitik sistem kullanıldı. Sisteme önce boş numuneler enjekte edildi, α -amanitin eklenmiş numunelerdeki α -amanitin pikinin tutulma zamanında başka pik gelmediği görüldü (Şekil 12).



Şekil 12: α -amanitin HPLC’de analizinden elde edilen kromatogramlar (A: boş serum, B: serum üstüne sonradan eklenmiş α -amanitin)

2.2.4. İstatistiksel analiz bilgileri

Elde edilen verilerin ortalaması alındı ve standart hata hesaplandı. Oral ve intravenöz uygulama için zaman-konsantrasyon eğrisi oluşturuldu. Eğri altı alan her iki uygulama için hesaplandı, oral olan değerler intravenöz değerlere bölünerek biyoyararlanım hesaplandı. Elde edilen veriler WinNonLin® (Scientific Consulting Inc.) programına girildi. İlk konsantrasyon, yarı ömür, dağılım hacmi, klirens değerleri program ile hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1. Kromatogram Pik alanı

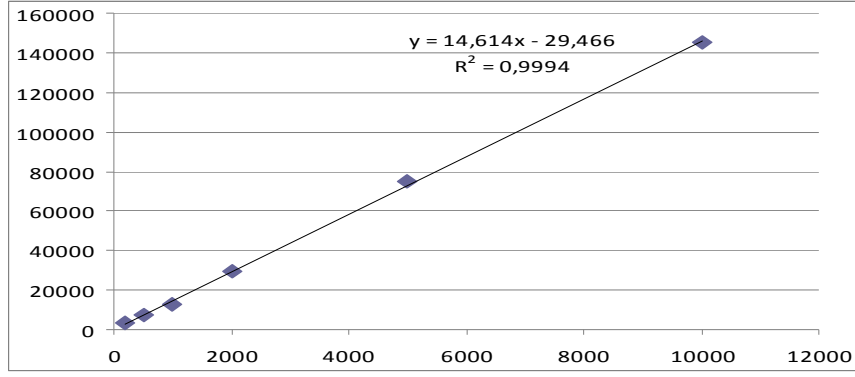
Analizler sonucunda serum içine eklenen α -amanitin için elde edilen kalibrasyon konsantrasyonları ve pik alanları Tablo 4'te gösterilmiştir. α -amanitinin boş serum ve serum üstüne sonradan eklenmiş α -amanitin kromatogramları Şekil 12'te gösterilmiştir. α -amanitinin pik çıkış süresi 13.89 dakika olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4: α -amanitin serumdaki ters faz HPLC yöntemi ile analizlerini takiben elde edilen kromatogram pik alanları.

	Serumdaki konsantrasyon (ng/ml)	Elde edilen pik alanı
α -amanitin	200	3415 $\pm$ 11
	500	7145 $\pm$ 4
	1000	12681 $\pm$ 9
	2000	29628 $\pm$ 11
	5000	75014 $\pm$ 180
	10000	145231 $\pm$ 26

3.2. Kalibrasyon Eğrisi

Seruma α -amanitin eklenmesi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 13'te gösterilmiştir. Kalibrasyon eğrisi denklemi $y = 14.614x - 29.466$ olarak bulunmuştur. Denklemin R^2 değeri 0.9994 olarak bulunmuştur. Serumda α -amanitin analizi için sinyal/gürültü oranı 3 olarak alındığında tayin limiti (limit of detection, LOD) 0.12 $\mu\text{g/mL}$, sinyal/gürültü oranı 10 olarak alındığında ölçüm limiti (limit of quantification, LOQ) 0.40 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 13: Serumda α -amanitin analizi kalibrasyon grafiği

3.3. Toksikokinetik Bulgular

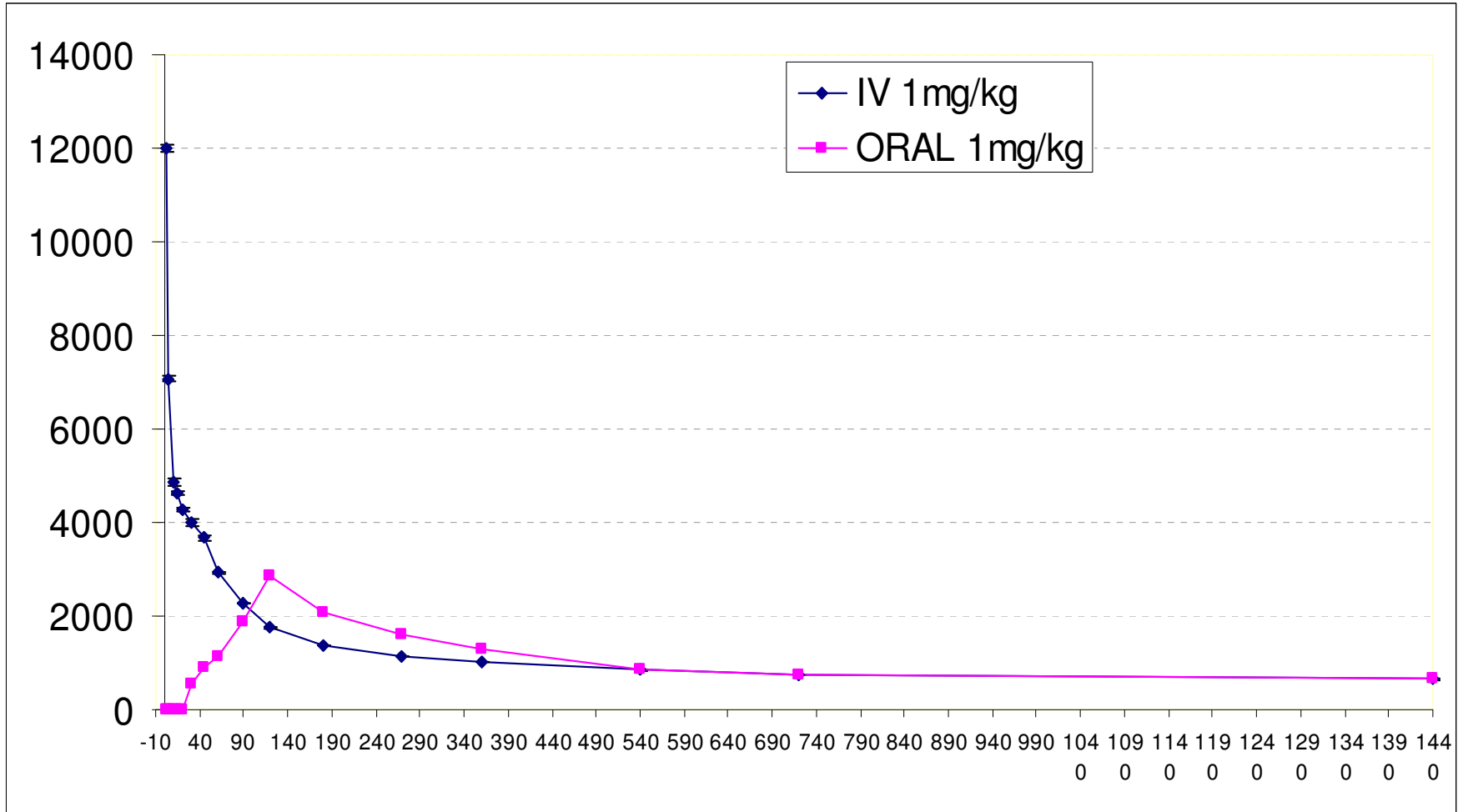
α -amanitin'in intravenöz uygulamasını takiben 2. dakika ile 24. saat arasında tespit edilebiliyorken, oral uygulamasında 30. dakika ile 24. saat arasında tespit edilebilmiştir.

Çalışmamızda α -amanitin'in “iki kompartmanlı dışarıya açık model”e uygunluk gösterdiği ve “birinci derece kinetiği”ne uyduğu belirlendikten sonra; dağılım yarılanma ömürleri ($t_{1/2\alpha}$), eliminasyon yarılanma ömürleri ($t_{1/2\beta}$) ve klirens (CL), WinNonLin® bilgisayar programı ile hesaplandı. Pik konsantrasyon (C_{doruk}) ve bu konsantrasyonlara ulaşma zamanları (t_{doruk}) çizilen zaman-konsantrasyon grafiklerine bakılarak belirlendi. Her iki uygulama için eğri altındaki alan (EAA_{toplam}) değerleri grafikten alan hesaplaması yöntemiyle bulundu (Tablo 5).

Tablo 5: α -amanitin'in sıçanlara oral ve intravenöz yollarla 1 mg/kg dozunda uygulanmalarını takiben ortalama ($\pm$ SS) toksikokinetik parametreleri.

Kinetik parametreler	α -amanitin Oral	α -amanitin İntravenöz
T_{doruk} (saat)	2-3 saat (2.64)	-
C_{doruk} ($\mu\text{g/ml}$)	2.86 ± 0.08	12.01 ± 0.07
Eğri altındaki alan(EAA) (ng.saat/ml)	1443590.40	1541050.00
$t_{1/2\alpha}$ (saat)	-	0.13 ± 0.01
$t_{1/2\beta}$ (saat)	110.4 ± 0.30	1.84 ± 0.30
Klirens (CL) (ml/st/kg)	75.91 ± 9.11	75.91 ± 9.11
Vd (ml/kg)	191.25 ± 12.85	191.25 ± 12.85

α -amanitin'in oral uygulamada serumdaki pik konsantrasyonuna 2.64 saatte ulaştığı gözlemlenmiştir. Toksin verildikten 1.30-2.00 saat aralığı sonrasında intravenöz ve oral gruplarda serum toksin konsantrasyonları birbirine yakın çıkmaktadır. Her iki verilişteki toksin konsantrasyonları 6. saatten sonra gittikçe birbirine yakınlaşan değerlerde seyretmekte ve 24. saat diliminde α -amanitin'in her iki uygulamada vücuttan tamamen uzaklaşmadığı (oral: 0.65 ± 0.007 ng/mL, intravenöz: 0.66 ± 0.02 ng/mL) ve eliminasyon hızının gittikçe azaldığı görölmektedir. Sıçanlarda toksisite nedeniyle 2. gün ölüm göröldüğünden ve kinetik hesaplamalar 24 saatlik analiz sonucunda yapılabildiğinden daha uzun süre toksin analizi yapılmamıştır. α -amanitin toksikokinetik profilinin grafiği şekil 14'te verilmiştir.



Şekil 14: α -amanitin oral ve intravenöz değerlerinin grafiği

Tablo 6: α -amanitinin sıçanlara oral ve intravenöz yollarla 1mg/kg dozunda uygulanmalarını takiben serumda ortalama α -amanitin miktarları.

Zaman (saat)	Oral değerler (ng/mL)	İntravenöz değerler
2 dak.	Limit altında	12.01 $\pm$ 0.07
5 dak.	Limit altında	7.06 $\pm$ 0.06
10 dak.	Limit altında	4.86 $\pm$ 0.07
15 dak.	Limit altında	4.63 $\pm$ 0.03
20 dak.	Limit altında	4.28 $\pm$ 0.04
30 dak.	0.55 $\pm$ 0.005	4.00 $\pm$ 0.07
45 dak.	0.89 $\pm$ 0.004	3.67 $\pm$ 0.06
1 st.	1.15 $\pm$ 0.01	2.92 $\pm$ 0.03
1.5 st.	1.88 $\pm$ 0.006	2.27 $\pm$ 0.01
2 st.	2.86 $\pm$ 0.008	1.74 $\pm$ 0.01
3 st.	2.05 $\pm$ 0.01	1.37 $\pm$ 0.004
4.5 st.	1.62 $\pm$ 0.01	1.13 $\pm$ 0.008
6 st.	1.28 $\pm$ 0.005	1.02 $\pm$ 0.008
9 st.	0.88 $\pm$ 0.007	0.84 $\pm$ 0.01
12 st.	0.75 $\pm$ 0.008	0.74 $\pm$ 0.007
24. st.	0.65 $\pm$ 0.007	0.66 $\pm$ 0.02

Oral α -amanitin serum konsantrasyonunun 2-6. saatleri arasında, intravenöz uygulamaya göre daha yüksek seviyede olduğu anlaşılmaktadır (Tablo 6).

α -amanitine bağlı mantar zehirlenmelerinin klinik seyrinde toksin biyoyararlanımının bilinmesi çok önemlidir. Yapmış olduğumuz bu çalışma ve analizler ile sıçanlardaki oral biyoyararlanım 0.936 olarak hesaplanmıştır (Tablo 7).

Tablo 7: Biyoyararlanım.

Toksin	Parametre	Oral	İntravenöz	F (Biyoyararlanım)
α -amanitin	EAA _{toplam}	1443590.40	1541050.00	0.936758

TARTIŞMA

Çalışmamızda sıçanlarda α -amanitin toksikokinetik profilinin açığa çıkartılması amaçlanmıştır. Deney prosedürüne uygun şekilde hareket ettiğimiz çalışmamızda uyguladığımız yöntemle sıçanlarda α -amanitin toksikokinetik analizleri başarıyla sonuçlanmıştır. Toksini intravenöz ve oral yoldan verdikten sonraki dilimde serum konsantrasyon-zaman eğrisine göre yapmış olduğumuz çalışma çift kompartmanlı açık modele uygunluk göstermiştir. Serum konsantrasyon-zaman eğrisi şekil 14'te gösterilmiştir. Ulaşmış olduğumuz toksikokinetik parametreler tablo 5 ve 7'de gösterilmiştir. Her iki verilişte çıkan toksikokinetik sonuçlara baktığımızda EAA parametrelerinin birbirine yakın olduğunu (oral: 1443590.40 ng.saat/ml, intravenöz: 1541050.00 ng.saat/ml) görmekteyiz. Oral verilişte α -amanitin hızlı bir şekilde emilime uğradığını gözlemledik (2 ± 0.05 st.). Toksinin oral biyoyararlanımı $F=0.936$ 'dır. Bu değerler bize toksinin sistemik dolaşıma geçme oranının ve hızının yüksek olduğunu göstermektedir.

A. phalloides zehirlenmesi birbirinden bağımsız olan başlangıç, latent ve letal fazlar ile seyreder. α -amanitin başlangıç fazında hızla emilir, vücutta dağılıma uğrar ve karaciğer hücrelerine girer. α -amanitin toksininin vücutta bulunması ve dağılımı süresince etkili, hızlı ve hassas bir şekilde vücuttaki miktarının hesaplanması gerekir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar içinde α -amanitin vücuttaki seyri, dağılımı ve atılımı konusunda yapılan çalışmalar yok denecek kadar azdır. Yapılan bazı çalışmalar ise daha çok periton içine veya intravenöz verilerek yapılan letal doz (LD_{50}) hayvan çalışmalarıdır^{19, 99, 176} ve bu çalışmalar klinikteki pratiğe uygun bir karşılaştırma imkânı sunmamaktadır.

İnsanda yapılan analizlerde amatoksinlerin emiliminin yaklaşık olarak 2 saat olduğu görülmüştür¹⁶⁸. Sıçanlarla yapmış olduğumuz çalışmada aynı şekilde oral olarak alınan α -amanitin yaklaşık olarak 2. saatte doruk konsantrasyonuna ulaştığı; sıçan ve insanlardaki α -amanitin emilim hızının birbirine benzediği görülmektedir.

Şu ana kadar yapılan çalışmalar ve analizler sonucunda α -amanitin insan vücudundaki dağılım hacmi ortaya çıkarılamamıştır. Hayvanlarda ise köpeklerde yapılan çalışmaya göre intravenöz yolla verilen α -amanitin dağılım hacmi ekstraselüler boşlukta tayin edilebilmiştir (160-290 ml/kg). Faulstich ve ark.¹⁷⁶ işaretli amatoksinleri (14 C-metil- γ -

amanitin ve 3 H-O-metil-dehidroksimetil- α -amanitin) intravenöz yoldan köpeklere uygulamış, bu toksinlerin dağılım hacimlerinin ekstraselüler sıvı ile sınırlı ve total klirenslerinin kreatinin klirensine benzer olduğunu saptamıştır. Çalışmamızda ulaşılmış olduğumuz dağılım hacmi sonucuna bakıldığında sıçanlarda 191.25 ± 12.85 ml/kg çıkmaktadır. Bu sonuç ise Faulstich ve ark.'nın ¹⁷⁶ köpekler üzerinde ulaşılmış olduğu değer aralığına denk gelmektedir. Fakat unutulmaması gerekir ki deneylerde kullanılan hayvanların ve deney prosedürlerinin farklı olması bizi yanıltacak bulgulara götürebilir. Buna ek olarak bu deneyde kullanılan teşhis ve analiz yöntemlerinin farklı ve eski yöntemler olması HPLC analizlerine oranla hassasiyetinin az olması iki veri arasındaki paralelliği değiştirebilecek etkenlerdir. Bu yüzden köpeklerde ve sıçanlarda aynı analiz yöntemleri ile yapılacak çalışmalar bize daha net sonuçlar sunabilecektir.

İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan analizlerde oral ve parenteral yolla alınan α -amanitin yarılanma ömrü tam olarak hesaplanamamıştır. Vesconi ve ark.'nın ⁹⁹ bir grup hasta üstünde yaptığı çalışmada toksin seviyesinin bir hasta dışında hızlı bir şekilde düştüğü ve mantar alındıktan 48 saat sonra bütün hastaların kanındaki α -amanitin saptama limitinin altında kaldığı gözlenmiştir. Aynı şekilde Jeager ve ark.'nın ¹⁹ üç yıl sonra yaptıkları çalışmada 32 hastanın amatoksin-serum konsantrasyonunun hızlı bir şekilde düştüğü ve 36 saat sonra sadece 2 hastanın kanında teşhis edilebildiği gözlenmiştir. Hayvanlarda ise oral yoldan alınan amatoksinlerin yarılanma ömürlerine dair bugüne kadar yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yüzden yapmış olduğumuz çalışmada ortaya çıkan yarılanma ömrü klinikte mantar zehirlenmesi teşhisi ile tedavi altına alınmış hastalara uygulanacak müdahaleler açısından önemli bir parametre olarak kullanılabilir. Bunun yanı sıra uygulanan madde toksin olduğu için insanlarda parenteral yoldan vücuda α -amanitin verilmesi mümkün değildir ve insanlarda bu şekilde toksikokinetik analizler yapılamaz. Hayvanlarda ise parenteral yoldan verilen α -amanitin serumdan hızlı bir şekilde atıldığı gözlemlenmiştir. Farelerde periton içine verilen α -amanitin 4 saat sonra serumda görülmediği, köpekte ise periton içine verilen α -amanitin plazma yarı ömrünün 26.7-49.6 dakika olduğu bildirilmiştir ¹⁷⁶. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise intravenöz yolla verdiğimiz α -amanitin dağılım yarılanma ömrü ($t_{1/2\alpha}$) 7.8 ± 0.01 dakika, eliminasyon yarılanma ömrü ($t_{1/2\beta}$) 110.4 ± 0.30 dakika olarak hesaplanmıştır. Toksikokinetik çalışmalarda yarılanma ömrü denildiğinde eliminasyon yarılanma ömrü ($t_{1/2\beta}$) göz önüne alınır. Çalışmamızda ulaşılmış olduğumuz değerlere bakıldığında α -

amanitinin yarılanma ömrü hesaplanması açısından kıymetli bir çalışma olarak görünmektedir. Diğer çalışmalarda^{19, 99, 176} ise dağılım fazının yarılanma ömrü ayrıca hesaplanmadığından, değerlerin daha düşük çıkması muhtemeldir. Bizim çalışmamız dışında dağılım fazı yarı ömrü hesaplaması bulunmamaktadır, konu hakkında diğer hayvan türlerini kapsayan daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

α -amanitinin insan vücudunda ne şekilde metabolize olduğu ve metabolitlerinin olup olmadığı hakkında daha fazla bilgi bulunmamaktadır. Fakat hayvan deneylerinde hayvan vücuduna verilen radyoaktif α -amanitin metabolitlerinin olmadığı gözlemlenmiştir¹⁷⁷. Bu konuda yapılacak olan çalışmalar α -amanitin insan ve hayvanlardaki toksikokinetik profilini aydınlatma adına önemli bilgiler sağlayabilir. Yaptığımız çalışmada α -amanitin metabolize olduğuna dair bulguya rastlanmamıştır. Ancak metabolit çalışmalarında kütle spektrumu (MS) kullanarak yapılması gerektiğinden bu konu daha detaylı çalışmayı gerektirmektedir.

A. phalloides zehirlenmelerinde eliminasyon kinetiği çok önemli bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır. Klinik olgularda toksinlerin vücuttan atılması önem arz etmektedir. Mantar zehirlenmesi vakalarında toksinin emilmesini önleyecek birçok tedavi seçeneği uygulanmaktadır. Fakat *A. phalloides* kaynaklı zehirlenme vakalarında semptomların geç başlamasından dolayı, hasta acil servislere ulaştığında toksinin büyük bir bölümü sistemik dolaşıma geçmiş olmaktadır. Eğer α -amanitin klirens değerleri bilinmiş olursa zehirlenmenin seyrini saptamak ve ona göre bir tedavi stratejisi oluşturmak daha etkili olabilir. α -amanitin insan idrarlarında en erken mantar yendikten 90-120 dakika sonra teşhis edilebiliyor iken¹⁶⁸, idrarda en son teşhis edilebilen zaman dilimi 24-66 saatleri arasındadır. Busi ve ark.¹⁵⁰ RIA yöntemini kullanarak 5 hastanın mantar alımından 12-72 saat sonra mide sıvısında α -amanitin belirlediklerini rapor etmişlerdir. Hayvanlarda α -amanitin oral olarak verildikten sonra idrarda veya başka biyolojik sıvılarda eliminasyonu ile ilgili bugüne kadar herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Parenteral verilerek biyolojik sıvılarda eliminasyon parametrelerini gösteren tek bir çalışma vardır. Bu çalışmada köpeklere verilen işaretlenmiş α -amanitin %83-89'u idrarla, %10' dan daha az bir kısmı ise safra yoluyla atıldığı ve toplam vücut klirensinin 2.7-6.2 ml/dak/kg olduğu rapor edilmiştir¹⁷⁸. Bu klirens değerleri çok geniş bir aralığı içermektedir. Bizim çalışmamız da ulaştığımız klirens değeri ise 75.91 ± 9.11 (ml/st/kg)'dir. Bu değer diğer çalışmada bildirilenden daha küçük bir değerdir, ancak diğer çalışmada aralığın çok geniş olması güvenilirliği

düşürmektedir. Ayrıca hayvan türlerinin ve analiz yöntemlerinin de farklı olması bu değişikliğe neden olmuş olabilir. Konu hakkında daha fazla çalışma yapılması klirensin aydınlatılması için kıymetli olacaktır.

Dünyada bugüne kadar yapılmış çalışmalarda insan ve hayvanlarda yapılan toksikokinetik analizler göz önüne alındığında α -amanitin biyoyararlanımının ($EAA_{oral}/EAA_{i.v.}$) henüz belirlenmediği anlaşılmaktadır. Amanita kaynaklı mantar zehirlenmelerinin ölümcül olması ve klinikte radikal bir tedavinin olmaması α -amanitin biyoyararlanım oranının belirlenme aciliyetini göstermektedir. Biyoyararlanım oranları çıkarılan amatoksinlerin ölümcül vakalarda destekleyici tedavilerin etkililiğini önemli derecede arttıracaktır. Yapmış olduğumuz toksikokinetik analizler sonucunda α -amanitin toksininin oral biyoyararlanımı $F=0.936 \mu\text{.saat/ml}$ olarak hesap edilmiştir. Çalışmamızda oral biyoyararlanım oranının belirlenmesi ve literatüre kazandırılması önemli bir aşamadır. Biyoyararlanımın yüksek olması, oral olarak alınan toksinin tamamına yakınının sistemik dolaşıma geçtiğini göstermektedir. Daha önceden yapılmış mantarda toksin miktarı analizi yayınları bulunmaktadır. Bu yayınlar da referans alınarak, kliniğe başvuran zehirlenme vakalarında yenilen mantardaki toksinin tamamına yakınının emileceği hesap edilebilir.

Sonuç olarak; yaptığımız α -amanitin toksikokinetik çalışması, bazı değerler açısından ilk olma özelliğindedir. Elde edilen verilerin kliniğe uyarlanması sonucunda, kişinin aldığı toksin miktarı ve zehirlenmenin prognozu hakkında çok kıymetli veriler elde edilebilir. Bu veriler sonrasında hastaya uygulanacak tedavilerin yoğunluğu konusunda öngörülebilir. Benzer konuda çalışmaların çok az sayıda olması ve insanlar üzerinde toksikokinetik çalışma yapılamaması nedeniyle, başka hayvan türlerinde ve daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerekmektedir.

KAYNAKÇA

1. Litten W. The most poisonous mushrooms. Scientific American. 1975;232:1143-1152.
2. Tyler VE, Jr Brady LR, Benedict RG, Khauna JM and Malone MH. Chromatographic and pharmacologic evaluation of some toxic *Galerina* species. Lloydia. 1963;26:154.
3. Buck RW: Poisoning by wild mushrooms. Clin Med. 1964;71:1353-1363.
4. Broussard CN, Aggarwal A, Lacey SR, Post AB, Gramlich T, Henderson JM. Mushroom poisoning-from diarrhea to liver transplantation. Am J Gastroenterol. 2001;56:3195–3198.
5. Karlson-Stiber C, Persson H. Cytotoxic fungi-an overview. Toxicon 2003;42:339–349.
6. Wieland T, Wieland O. Chemistry and Toxicology of the Toxins of *Amanita Phalloides*. Pharmacological Reviews. 1959;11:87-107.
7. Wieland T, Faulstick H. Amatoxins, phallotoxins, phallolysin and antamanide: The biologically active components of poisonous amanita mushrooms. Critical Review in Biochemical and Molecular Biology. 1978;5:185-260.
8. Faulstich H, Georgopoulos D, Bloching M and Wieland Th. Analysis of the toxins of amanitin containing mushrooms. Z. Naturforsch. 1974;29:86.
9. Yamada EG, Mohle-Boetani J, Olson KR, Werner SB. Mushroom poisoning due to amatoxin. West J Med. 1998;169:380-384.
10. Pajoumand A, Shadnia S, Efricheh H, Mandegary A, Hassanian-Moghadam H, Abdollahi M. A retrospective study of mushroom poisoning in Iran. Hum Exp Toxicol. 2005;24:609-613.
11. Chaparroška D, Becarowski N, Babulovska A. Alanine transaminase and prothrombin time abnormalities following mushroom poisoning. Toxicol Lett. 2006;164:99.
12. Floersheim GL, Bianchi L. Ethanol diminishes the toxicity of the mushroom *Amanita phalloides*. Experientia. 1984;40:1268 –1270.
13. Unluoglu I, Tayfur M. Mushroom poisoning:an analysis of the data between 1996 and 2000. Eur J Emerg Med. 2003;10:23-26.
14. Kleven R. Farming mushrooms. San Diego Tribune. 1989;1:2.

15. Escudie L, Francoz C, Vinel JP. *Amanita phalloides* poisoning: Reassessment of prognostic factors and indications for emergency liver transplantation. *J Hepatol.* 2006;46:466-473.
16. Pond SM, Olson KR, Woo OF, Osterhold JD, Ward RE, Kaufman DA, Moody RR. Amatoxin poisoning in northern California, 1982-1983. *West J Med.* 1986;145:204-209.
17. Berger KJ, Guss DA. Mycotoxins Revisited Part: 1, *The Journal of Emergency Medicine.* 2004;28:53-62.
18. Floersheim GL, Weber O, Tschumi P, Ulbrich Mx. Die klinische Knollenblätterpilzvergiftung (*Amanita phalloides*): prognostische Faktoren und therapeutische Massnahmen. Eine Analyse anhand von 205 Fällen. *Schweiz. Med. Wschr.* 1998;112:1164–1177.
19. Jaeger A, Jehl F, Flesch F, Sauder P, Kopferschmitt J. Kinetics of amatoxins in human poisoning: therapeutic implications. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1993;31:63–80.
20. Iliev Y, Andonova S, Akabaliev V. Our experience in the treatment of acute *Amanita phalloides* poisoning. *Folia Med.* 1999;4:30–37.
21. Enjalbert F, Rapior S, Nouguiet-Soulé J, Guillon S, Amoroux N, Cabot C. Treatment of amatoxin poisoning: 20-year retrospective analysis. *J Toxicol Clin Toxicol.* 2002;40:715–757.
22. Jander S, Bischoff J. Treatment of *Amanita phalloides* poisoning: I. Retrospective evaluation of plasmapheresis in 21 patients. *Ther Apher.* 2000;4:303–307.
23. Breene WM. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *J Food Protec.* 1990;53:883-894.
24. Senatore F. Chemical constituents of some mushrooms. *J Sci. Food Agric.* 1992;58:499-503.
25. Ajlouni SO, Beelman RR, Thompson DB, Mau JL. Stipe trimming at harvest increases shelf life of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). *J Food Sci.* 1992;57:1361-1363.
26. Onat T. *Pediatric Health and Diseases.* İstanbul; Eksen yayınları, 1996; 1050-1051
27. Paydas S, Kocak R, Erturk F, Erken E, Zaksu HS, Gurcay A. Poisoning due to amatoxin-containing *Lepiota* species. *Br J Clin Prac.* 1990;44:450-453.

28. Aji DY, Caliskan S, Nayir A, Mat A, Can B, Yasar Z. Haemoperfusion in *Amanita phalloides* poisoning. *J Trop Pediatr*. 1995;41:371-374.
29. Durukan P, Yildiz M, Cevik Y, Ikizceli I, Kavalci C, Celebi S. Poisoning from wild mushrooms in Eastern Anatolia region: analyses of 5 years. *Hum Exp Toxicol*. 2007;26:579-82.
30. Erguven M, Yilmaz O, Deveci M, Aksu N, Dursun F, Pelit M. Mushroom poisoning. *Indian J Pediatr*. 2007;74:847-52.
31. Abut E, Abut Y. Mantar Zehirlenmeleri. *Sendrom*. 2002;14:126-30.
32. Öder N. Bazı Zehirli Mantarlar ve Mantar Zehirlenmelerinde İlk Yardım, Şafak Matbaası, Ankara, 1977.
33. Işıloğlu M, Gücin F, Mat A. Kasım 1994'te İstanbul'da meydana gelen mantar zehirlenmeleri. *Ekoloji-Çevre Dergisi*. 1995;4(14):22-28.
34. Ergin NA. Mantar Zehirlenmeleri ve Tedavide genel yaklaşım. *Derleme*, 2000;57:109-118.
35. Ahishali E, Boynueğri B, Özpolat E, Sürmeli H, Dolapçioğlu C, Dabak R, Bahçebaşı ZB, Bayramiçli OU. Approach to mushroom intoxication and treatment: Can we decrease mortality?. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. 2012;36(2):139-145.
36. Öntürk YA, Uçar B. Eskişehir bölgesinde çocukluk çağı zehirlenmelerinin retrospektif değerlendirilmesi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*. 2003;46:103-113.
37. Akköse AŞ, Köksal Ö, Fedakar R, Emircan Ş, Durmuş O. 1996-2004 yılları arasındaki erişkin zehirlenme olguları. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2006;32(1):25-27.
38. Gonmori K, Yoshioka N. The examination of mushroom poisonings at Akita University. *Legal Medicine*. 2003;5:83-86.
39. Wieland T and Faulstich H. Fifty years of amanitin. *Experientia*. 1991;47:1186-1193.
40. Enjalbert F, Gallion C, Jehl F, Monteil H and Faulstich H. Toxin content, phallotoxin and amatoxin composition of *Amanita phalloides* tissues. *Toxicon*. 1993;31:803-807.
41. Enjalbert F, Cassanas G, Guinchard G and Chaumont JP. Toxin composition of *Amanita phalloides* tissues in relation to the collection site. *Mycologia*. 1996;88:909-921.

42. Bonnet MS, Basson PW. The toxicology of *Amanita virosa*: The destroying angel. Homeopathy. 2004;93:216–220.
43. Olson KR, Pond SM, Seward J, Healey K, Woo OF, Becker CE. *Amanita phalloides*-type mushroom poisoning. West J Med. 1982;137:282-289.
44. Seeger R, Stijve T. Occurrence of toxic *Amanita* species. International *Amanita* Symposium. 1978.
45. Roland A, Harvey RE and Klein AS. *Amanita* poisoning. American Journal of Medicine. 1989;86:641.
46. Reid DA and Eickert A. South African fungi: The genus *Amanita*. Mycological Research. 1991;95:80-95.
47. Chin FH. Edible and poisonous fungi from the forests of Sarawak. Sarawak Museum Journal. 1988;39:195-201.
48. Valenzuela E, Moreno G and Jeria M. *Amanita phalloides* in forests of *Pinus radiata* the IX Region in Chile: taxonomy, toxins, detection methods and phalloidin intoxication. Boletín Micológico. 1992;7:17-21.
49. Aroche RM, Villegas M and Cifuentes J. Nuevos datos sobre la distribución y taxonomía de *Amanita phalloides* en México. Boletín de la Sociedad Mexicana de Micología. 1984;19:275-281.
50. Cole FM. *Amanita phalloides* in Victoria. Medical Journal of Australia. 1993;158:849-850.
51. Dwivedi Y, Rastogi R, Garg NK and Dhavan BN. Effects of picroliv, the active principle of *Picrorhiza kurroa* on biochemical changes in rat liver poisoned by *Amanita phalloides*. Acta Pharmacologica Sinica. 1992;13:197-200.
52. Smith AH. Poisonous mushrooms: Their Habitats, Geographic Distribution, and Physiologic Variation within Species. Handbook of Mushroom poisoning diagnosis and treatment. Chapter 3: p. 39-45
53. Culliton BJ. The Destroying Angel: A story of a search for antidote. Science. 1974;185: 600-601.
54. Saviuc P, Flesh F. Acute higher fungi mushroom poisoning and its treatment. Presse Med. 2003;32:1427-1435.
55. Piqueras J. Hepatotoxic mushroom poisoning: diagnosis and management. Mycopathologia. 1989;105:99 –110.
56. Sanz P, Reig L, Borrás J. Disseminated intravascular coagulation and mesenteric venous thrombosis in fatal *Amanita* poisoning. Hum Toxicol. 1988;7:199 –201.

57. *Amanita phalloides* mushroom poisoning—Northern California, January 1977. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1997;46:489–92.
58. Paaso B, Harrison DC. A new look at an old problem: Mushroom poisoning. Clinical presentations and new therapeutic approaches. Am J Med. 1975;58:505–509.
59. Becker CE, Tong TG, Boerner U, Roe RL, Scott AT, MacQuarrie MB, Bartter F. Diagnosis and treatment of *Amanita phalloides*-type mushroom poisoning: use of thioctic acid. West J Med. 1976;125:100-109.
60. Köppel, C. Clinical symptomatology and management of mushroom poisoning. Toxicon. 1993;31:1513-1540.
61. Splendiani G, Mazzearella V, Zazzaro D. Clinical experience in treatment of *Amanita phalloides* poisoning. G Ital Nefrol. 2002;19:31-36.
62. Araz C, Karaaslan P, Esen A. Successful treatment of a child with fulminant liver failure and coma due to *Amanita phalloides* poisoning using urgent liver transplantation. Transplant Proc. 2006;38:596-597.
63. Klein AS, Hart J, Brems JJ, Goldstein L, Lewin K, Busuttil RW. *Amanita* poisoning: treatment and the role of liver transplantation. Am J Med. 1989;86:187–193.
64. Pinson CW, Daya MR, Benner KG. Liver transplantation for severe *Amanita phalloides* mushroom poisoning. Am J Surg. 1990;159:493-499.
65. Ergüven M, Çakı S, Deveci M. Mantar zehirlenmesi: 28 vakanın değerlendirilmesi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi. 2004;47:249-253.
66. Vetter J. Toxins of *Amanita phalloides*. Toxicon. 1998;36:13-24.
67. Jander S, Bischoff J, Woodcock BG. Plasmapheresis in the treatment of *Amanita phalloides* poisoning: II. A review and recommendations. Ther Apher 2000;4:308-312.
68. Olesen LL. Amatoxin intoxication. Scand J Urol Nephrol. 1990;24:231-234.
69. Lampe KF. Current concepts of therapy in mushroom intoxication. Clin Toxicol. 1974;7:115-121.
70. Piqueras J, Duran-Suarez JR, Massuet L and Hernandez-Sanchez JM. Mushroom poisoning: therapeutic apheresis or forced diuresis. Transfusion. 1987;27:116-117.
71. Eren ŞH, Oğuztürk H, Korkmaz İ, Varol O. 2004 yılı içerisinde Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Tıp Anabilim Dalı'na başvuran mantar zehirlenmesi vakalarının değerlendirilmesi. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2005;27:15-18.

72. Harrison DC, Coggins CH, Welland FH. Mushroom poisoning in five patients. *Am J Med.* 1965;38:787-792.
73. Skrabal F, Dittrich P. Death-cap poisoning. *Lancet.* 1973;1:767.
74. Steyn DG. The treatment of cases of *Amanita phalloides* and *Amanita capensis* poisoning. *S Afr Med J.* 1966;40:405-406.
75. Giannini L, Vannacci A, Missanelli A, Mastroianni R, Mannaioni PF, Moroni F, Masini E. Amatoxin poisoning: a 15-year retrospective analysis and follow-up evaluation of 105 patients. *Clin. Toxicol.* 2007;45:539-542.
76. Mas A. Mushrooms, amatoxins and the liver. *Journal of Hepatology.* 2005;42:166-169.
77. Sarıkayalar F, Saltık İN. Mantar zehirlenmesi ve tedavisi. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi.* 1993;7: 293-296.
78. McClain JL, Hause DW, Clark MA. *Amanita phalloides* mushroom poisoning: a cluster of four fatalities. *J Forensic Sci.* 1989; 34:83-87.
79. Faulstich H, Jahn W and Wieland T. *Arzneim-Forsch.* 1980;30:452-454.
80. Kroncke KD, Fricker G, Meier PJ, Gerok W, Wieland T, Kurz G. Alpha-amanitin uptake into hepatocytes. Identification of hepatic membrane transport systems. *J Biol Chem.* 1986;261:12562-12567.
81. Hruby K, CsomqS G, Fuhrmann H and Thaler H. Chemotherapy of *Amanita phalloides* poisoning with intravenous silibinin. *Human Toxicology.* 1983;2:183-195.
82. Faulstich H. New Aspects of *Amanita* Poisoning. *Klinische Wochenschrift.* 1979;57:1143-1152.
83. Woo OF. The Role of Thiocetic Acid in Mushroom Poisoning. *CSHP Voice.* 1984;11-35.
84. Feelly J, Wilkinson GR, Wood AJJ. Reduction of liver blood flow and propranolol metabolism by cimetidine. *N Engl J Med.* 1981;304:692-695.
85. Krenová M, Pelclová D, Navrátil T. Survey of *Amanita phalloides* poisoning: clinical findings and follow-up evaluation. *Hum Exp Toxicol.* 2007;26:955-961.
86. Zheleva A, Tolekova A, Zhelev M, Uzunova V, Platikanova M, Gadzheva V. Free radical reactions might contribute to severe alpha amanitin hepatotoxicity - A hypothesis. *Medical Hypotheses.* 2007;69:361-367.
87. Lough J, Kinnear DG. Mushroom poisoning in Canada: Report of a fatal case. *Can Med Assoc J.* 1970;102:858-860.

88. Grossman CM, Malbin B. Mushroom poisoning: A review of the literature and report of two cases caused by a previously undescribed species. *Ann Intern Med.* 1954;40:249-259.
89. Magdalan J, Ostrowska A, Piotrowska A, Izykowska I, Nowak M, Gomulkiewicz A, Podhorska-Okolow M, Szelag A, Dziegiel P. Amanitin induced apoptosis in primary cultured dog hepatocytes. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2010;48:58-62.
90. Dökmeci İ. Toksikoloji (akut zehirlenmelerde tanı ve tedavi). İstanbul: Fatih Gençlik Matbaası; 1988.
91. Vural N. Toksikoloji. Ankara: Ankara Üniv Ecz Fak Yayınları 1996:73.
92. Canalese J, Gimson AES, Davis C. Controlled trial of dexamethasone and mannitol for the cerebral oedema of fulminant hepatic failure. *Gut.* 1982;23:625-629.
93. Pinson CW, Daya MR, Benner KG. Liver transplantation for severe *Amanita phalloides* mushroom poisoning. *Am J Surg.* 1990;159:493-499.
94. Galler GW, Weisenberg E, Brasitus TA. Mushroom poisoning: the role of orthotopic liver transplantation. *J Clin Gastroenterol* 1992;15:229-232.
95. Boudjema K, Wolf P, Burtscher A. Fulminant hepatitis caused by *Amanita phalloides* poisoning. An indication for hepatic allotransplantation. *Presse Med.* 1989;18:937.
96. Pouyet M, Caillon P, Ducerf C. Orthotopic liver transplantation for severe *Amanita phalloides* poisoning. *Presse Med.* 1991;20:2095-2098.
97. Doepel M, Isoniemi H, Salmela K. Liver transplantation in a patient with *Amanita* poisoning. *Transplant Proc.* 1994;26:1801-1802.
98. Woodle ES, Moody RR, Cox KL, Cannon RA, Ward RE. Orthotopic liver transplantation in a patient with *Amanita* poisoning. *JAMA.* 1985;253:69-70.
99. Vesconi S, Langer M, Iapichino G, Costantino D, Busi C, Fiume L. Therapy of cytotoxic mushroom intoxication. *Crit Care Med.* 1985;13:402-406.
100. Mitchel DH. *Amanita* mushroom poisoning. *Ann Rev Med.* 1980; 31:51-57.
101. Himmelmann A, Mang G, Schnorf-Huber S. Lethal ingestion of stored *Amanita phalloides* mushrooms. *Swiss Med Wkly.* 2001;131:616-617.
102. Cochet-Meilhac M and Chambon P. Animal DNAdependent RNA-polymerases, II. Mechanism of the inhibition of RNA-polymerases B by amatoxins. *Biochim Biophys Acta.* 1974;353:160-184.

103. Bartoloni DT, Omer F, Giannini A. Amanita poisoning: A clinical-histopathological study of 64 cases of intoxication. *Hepatogastroenterology*. 1985;32:229-231.
104. Myler RK, Lee JC, Hopper J. Renal tubular necrosis caused by mushroom poisoning. *Arch Intern Med*. 1964;114:196-204.
105. Enjalbert F, Cassanas G, Rapior S, Renault C, Chaumont JP. Amatoxins in wood-rotting *Galerina marginata*. *The Mycological Society of America*. 2004;96:720-729.
106. Kisilevsky R. Hepatic nuclear and nucleolar changes in Amanita poisoning. *Arch Pathol*. 1974;97:253-258.
107. Wieland Th. Peptides of poisonous Amanita mushrooms. New York: Springer-Verlag, 1986: p. 20-46.
108. Benedict RG, Tyler VE, Brady LR and Weber LJ. Fermentative production of amanita toxins by a strain of *Galerina marginata*. *Journal of Bacteriology*. 1966;91:1380-1381.
109. Palyza V. Rapid identification of amanitins in mushroom tissue. *Arch Toxicol*. 1974;32:109-14.
110. Enjalbert F, Gallion C, Jehl F, Monteil H, Faulstich H. Amatoxins and phallotoxins in Amanita species: high-performance liquid chromatographic determination, *Mycologia*. 1993;85:579-584.
111. Tyler VE, Benedict RG, Brady LR, Robbers JE. Occurrence of Amanita toxins in American collections of deadly Amanitas. *J Pharmacol Sci*. 1966;55:590-593.
112. Stijve T, Seeger R. Determination of α -, β - and γ -amanitin by high-performance thin-layer chromatography in *Amanita phalloides*. *Z Naturforsch*. 1979;34:1133-1138.
113. Zhang P, Chen Z, Hu J, Ei B, Zhang Z, Hu W. Production and characterization of amanitin toxins from a pure culture of *Amanita exitialis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;252:223-228.
114. Muraoka S, Fukamachi N, Mizumoto K, Shinozawa T. Detection and identification of amanitins in the wood-rotting fungi *Galerina fasciculata* and *Galerina helvoliceps*. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65:4207-4210.
115. May JP, Fournier P, Patrick BO and Perrin DM. Synthesis, characterisation, and in vitro evaluation of Pro2-Ile3-S-deoxo-amaninamide and Pro2-D-allo-Ile3-S-deoxo-

amaninamide: implications for structure-activity relationships in amanitin conformation and toxicity. Chem Eur J. 2008;14(11):3410-3417.

116. Brodner OG and Wieland T. Biochemistry. 1976;15:3480.

117. Ljungman M, Zhang F, Chen F, Rainbow AJ, Mc Kay BC. Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response. Oncogene. 1999;18(3):583-592.

118. Zanolli G, Petersen G, Wieland T. Structure-toxicity relationships in the amatoxin series. Structural variations of side chain 3 and inhibition of RNA polymerase II. Int J Peptide Protein Res. 1992;40:551-558.

119. May JP, Perrin DM. Tryptathionine bridges in peptide synthesis. Pept Sci. 2007;88:714-724.

120. Rittgen J, Pütz M, Pyell U. Identification of toxic oligopeptides in *Amanita* fungi employing capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry with positive and negative ion detection. Electrophoresis Journal. 2008;29:2094-2100.

121. Paolillo L, Zanolli G, Falcigno L, Saviano M, D'auria G, Bruno B, Campanile T. Solid state and solution conformation of [Ala7]-phalloidin: a synthetic phalloxin analogue. Chem Eur J. 2001;7:1479-1485.

122. Enjalbert F, Bourrier MJ, Andary C. Assay for the main phallotoxins in *Amanita phalloides* by direct fluorimetry on thinlayer plates. Journal of Chromatography. 1989;462:442-447.

123. Faulstich H, Münter K. New aspects of phalloidin poisoning. Klin Wochenschr. 1986;64:66-70.

124. Wieland T. Poisonous principles of mushrooms of the genus *Amanita*. Science. 1968;59:948-952.

125. Danker P, Löw I, Hasselbach W and Wieland T. Interaction of actin with phalloidin: Polymerization and stabilization of F-actin. Biochim Biophys Acta. 1975;400:407-414.

126. Löw I, Danker P, Wieland T. Stabilization of F-actin by phalloidin. Reversal of the destabilizing effect of cytochalasin B. FEBS Lett. 1975;54:263-265.

127. De Vries J, Wieland T. Influence of phallotoxins and metal ions on the rate of proteolysis of actin. Biochemistry. 1978;17(10):1965-1968.

128. Wieland Th, Faulstich H. Peptidotoxins from *Amanita*. In: Keeler R, Tu A, (eds), *Handbook of Natural Toxins*, Marcel Dekker, New York, Vol. 1, pp. 585-634, 1983.

129. Frimmer, M. (1987) What we have learned from phalloidin, *Toxicol. Lett.* 35, 169-182.
130. Lengsfeld A, Low I, Wieland T, Dancker P, Hasselbach W. Interaction of phalloidin with actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1974;71:2803.
131. Bidnychenko Y. Detecting mushroom peptide toxins in body fluids by capillary electrophoresis. *LCGC* 2001; 19: 1000-1002.
132. Faulstich H, Buku A, Bodenmuller H, Wieland Th. Virotoxins: Actin-binding cyclic peptides of *Amanita virosa* mushrooms, *Biochemistn.* 1980;19:3334-3343.
133. Defendenti C, Bonacina E, Mauroni M, Gelosa L. Validation of a high performance liquid chromatographic method for alpha amanitin determination in urine. *Forensic Sci Int.* 1998;92(1):59-68.
134. Wieland T. The toxic peptides from *Amanita* mushrooms. *Int J Pept Protein Res* 1983;22:257-276.
135. Seifart T, Sekeris CE. Alpha-amanitin, a specific inhibitor of transcription by mammalian RNA polymerase. *Z Naturforsch* 1969;B34:1538-1542.
136. Tagliaro F, Schiavon G, Bontempelli G, Carli G, Marigo M. Improved high-performance liquid chromatographic determination with amperometric detection of alpha-amanitin in human plasma based on its voltammetric study. *J Chromatogr.* 1991;563(2):299-311.
137. Wieland T. Tryptophan, the heart of the toxic peptides from *Amanita* mushrooms. In: *Progress in Tryptophan and Serotonin Research*. Berlin: Walter de Gruyter & Co, 1984;p.13-20.
138. Fiume L, Stirpe F. Decreased RNA content in mouse liver nuclei after intoxication with alpha-amanitin. *Biochim Biophys Acta.* 1966;123(3):643-5.
139. Pomilio AB, Battista ME, Vitale AA. Semiempirical AM1 and ab initio parameters of the lethal cyclopeptides a-amanitin and its related thioether, S-sulphoxide, sulphone, and O-methyl derivative. *Theochem.* 2001;536:243-262.
140. Ron R and Scholtissek C. Specific inhibition of influenza replication by a-amanitin. *Nature.* 1970;228:56.
141. Stirpe F and Fiume L. Effect of a-amanitin on ribonucleic acid synthesis and on ribonucleic acid polymerase in mouse liver. *Biochem J.* 1967;103:67.

142. Stirpe F and Fiume L. Studies on the pathogenesis of liver necrosis by a-amanitin. Effect of a-amanitin on ribonucleic acid synthesis and on ribonucleic acid polymerase in mouse liver nuclei. *Biochem J.* 1967;105:779.
143. Roeder RO and Rutter WJ. Multiple forms of DNA-dependent RNA polymerase in eukaryotic organisms. *Nature.* 1969;224:234.
144. Lindcll ThJ, Weinberg F, Morris PW, Roeder RG and Rutter WJ. Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by a-amanitin. *Science.* 1970;170:447.
145. Seifart KH, Bencckc BJ and Juhasz PP. Multiple RNA polymerase species from rat liver tissue: possible existence of a cytoplasmic enzyme. *Arch Biochem Biophys.* 1972;151:519.
146. Katrin L, Heinz F, Daniela K. Molecular characterization of inhibition of amanitin uptake into human hepatocytes. *Toxicol Sci.* 2006;91:140-149.
147. Mandel JL and Chambon P. Purification of RNA polymerase B activity from rat liver. *FEES Lett.* 1971;15:175.
148. Strachan T, Read A, Human molecular genetics, 4th. Ed. New York: Taylor and Francis Group, 2011: p.347-349.
149. Masini E, Blandina P, Mannaioni PF. Removal of alpha-amanitin from blood by hemoperfusion over uncoated charcoal experimental results. *Contrib Nephrol.* 1982;29:76-81.
150. Busi C, Fiume L, Costantino D. Amanita toxins in gastroduodenal fluid of patients poisoned by the mushroom *Amanita phalloides*. *N Eng J Med.* 1979;300:800.
151. Gibbons RB. Mushroom poisoning. *Compr Ther.* 1982;8:33-39.
152. Fiume L, Marinozzi V, Nardi F. The effects of amanitin poisoning on mouse kidney. *Brit J Exp Pathol.* 1969;50:270-276.
153. Montanaro L, Novello F, Stirpe F. Inhibition of ribonucleic acid and of protein synthesis in the organs of rats and mice poisoned with alpha-amanitin. *Biochim Biophys Acta.* 1973;319:188-198.
154. Bonctti E, Dcrenzini M and Fiume L. Lesions in the cells of proximal convoluted tubules in rat kidney induced by amanitin-albumin conjugate. *Virchows Arch.* 1974;16:71.
155. Lim JG, Kim JH, Lee CY, Lee SI, Kim YS. *Amanita virosa* induced toxic hepatitis: report of three cases. *Yonsei Med J.* 2000;41:416-421.
156. Faulstich H. Mushroom poisoning. *Lancet.* 1980;2:794.

157. Marinozzi V, Fiume L. Effects of α -amanitin on mouse and rat liver cell nuclei. *Exp Cell Res.* 1971;67(2):311-322.
158. Bardocz S, Hesketh JE. Effect of RNA synthesis inhibitors on insulin-induced protein synthesis by 3T3 cells. *Int J Biochem.* 1989;21:1265-1268
159. Belliardo F, Massano G, Accomo S. Amatoxins do not cross the placental barrier. *Lancet.* 1983;1(8338):1381.
160. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, 2006, Godman&Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Godman&Gilman: Tedavinin Farmakolojik Temeli, Süzer Ö, İstanbul: Nobel Basımevi, 2009: p.12-22.
161. Smith CM, Reynard AM (Eds.). Textbook of Pharmacology. Philadelphia: W.b. Saunders co; 1992: p. 59-71.
162. Dökmeci İ (Ed.). Farmakoloji: İlaç uygulamalarında Temel Kavramlar. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1992: p.53-89.
163. Hatip İ. Klinik Uygulamalı Farmakokinetik. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2004: p.26-46.
164. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji.12. baskı. İstanbul: Pelikan Yayıncılık, 2009: 32-75.
165. Rosenfeld GC, Loose-Mitchell DS, Pharmacology, Farmakoloji, Selçukbiricik S, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 1999: 13-18.
166. Butera R, Locatelli C, Coccini T, Manzo L. Diagnostic accuracy of urinary amanitin in suspected mushroom poisoning: a pilot study. *J Toxicol Clin Toxicol* 2004;42:901-912.
167. Caccialanza G, Gandini C, Ponci R. Direct, simultaneous determination of α -amanitin, β -amanitin and phalloidin by HPLC. *J Pharm Biomed Anal* 1985; 3(2):179–85.
168. Homann J, Rawer P, Bleyl H, Matthes KJ, Heinrich D. Early Detection of Amatoxins in Human Mushroom Poisoning. *Arch. Toxicol.* 1986;59:190-191.
169. Haines JH, Lichstein E, Glickerman D. A fatal poisoning from an amatoxin containing *Lepiota*. *Mycopathologia.* 1985;93: 15-17.
170. Puschner B, Rose HH, Filigenzi. Diagnosis of Amanita toxicosis in a dog with acute hepatic necrosis. *J Vet Diagn Invest.* 2007;19: 312-317.

171. Vlaskin DN, Gainullina ET, Klyuster OV, Rybalchenko IV, Ryzhikov SB, Taranchenko VF. Express method for detection of *Amanita phalloides* amanitin toxins. Bull. Exp. Biol. Med. 2006;141:110-111.
172. Maurer HH. Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 1992;580: 3-41,
173. Enjalbert F, Gallion C, Jehl F, Monteil H, Faulstich H. Simultaneous assay for amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* Fr. by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography. 1992;598:227-236.
174. Lindsay S. High Performance Liquid Chromatography, 2nd. Ed. London: John Wiley and Sons Publication, 1992: p.1-5.
175. Kaya E, Karahan S, Bayram R, Hancı M, Bayram S, Yılmaz İ, Yaykaşlı KO: Amanitin Phalloides Mantar Ekstresinden α -amanitin Toksinin Semipreparatif HPLC Yöntemi ile Saflaştırılması, 21. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Eskişehir, 19-22 Ekim 2011.
176. Faulstich H, Talas A, Wellhoner HH: Toxicokinetics of labeled amatoxins in the dog. Arch Toxicol 1985; 56:190-194.
177. Jahn W, Faulstich H, Wieland T. Pharmacokinetics of {3H}-methyl-dehydroxymethyl-amanitin in the isolated perfused rat liver, and the influence of several drugs. In: Faulstich H, Kommerell B, Wieland T (eds) *Amanita* toxins and poisoning. Witzstrock, Baden-Baden, p. 80-85.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Adıyaman ili Gerger ilçesinde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi İstanbul'da, yüksek öğrenimimi 2009 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladım. Halen 2010 yılında girmiş olduğum Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalında eğitimimi sürdürmekteyim.