

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ALFA-AMANİTİN İLE OLUŞTURULMUŞ MANTAR
TOKSİSİTESİ VE ENGİNARIN (CYNARA
SCOLYMUS) BU TOKSİSİTE ÜZERİNE ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mustafa Bahadır KAYMAZ

ELAZIĞ-2015

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Sema TEMİZER OZAN
Veteriner Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak
kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Necmi ÖZDEMİR

Danışman

Yüksek Lisans Sınav Jüri Üyeleri

İmza

Prof. Dr. Sema TEMİZER OZAN

Prof. Dr. Necmi ÖZDEMİR

Prof. Dr. Fulya Benzer

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca gerek tez konumun seçiminde, gerekse araştırmalarımın her aşamasında ilgisini ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Necmi ÖZDEMİR' e, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım anabilim dalımız değerli Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Sema Temizer OZAN, Prof. Dr. Seval YILMAZ, Prof. Dr. Mine ERİŞİR, Yrd. Doç. Dr. Gonca Ozan ile Araştırma Görevlileri Emre KAYA ve Mehmet Ali KISAÇAM'a; ayrıca deney süreci boyunca yanımda olup yol gösteren değerli hocalarım Erzurum Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR ve öğretim üyesi Doç. Dr. Özgür KAYNAR ile benimle beraber laboratuvarında geç saatlere kadar özveriyle çalışıp, deneyleri gerçekleştirmeme yardımcı olan Erzurum Atatürk Üniversitesi Yüksek Lisans Öğrencileri Kübra KILIÇ ve Önder İNCAZ'a teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR LİSTESİ	viii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ	3
3.1. Mantarlar:.....	3
3.1.1. Myxomycetes (Cıvık Mantarlar):	4
3.1.2. Phycomycetes (Algimsi Mantarlar):.....	4
3.1.3. Eumycetes (Gerçek Mantarlar):	5
3.1.3.1. Yenen Mantarlar:	8
3.1.3.2. Zehirli Mantarlar:.....	9
3.1.3.3. Amanita Phalloides (Evcik Kıran, Köy Göçüren):	13
3.2. Amatoksinler:.....	14
3.2.1. Alfa amanitin zehirlenmesinde klinik bulgular:	16
3.2.2. A. phalloides zehirlenmelerinde tedavi:	17
3.3. Enginar (Cynara scolymus):.....	18
3.4. Antioksidan Savunma Sistemleri:	19
3.4.1. SOD	20
3.4.2. Katalaz.....	20
3.4.3. GSH-Px.....	20

3.4.4. GSH	20
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
4.1. Deney Protokolü.....	21
4.2. Karaciğer Örneklerinin Hazırlanması	22
4.3. MDA, Katalaz, SOD, GSH ve Protein Tayini İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması	22
4.4. GSH-Px Tayini İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması	22
4.5. MDA Tayini	23
4.6. SOD Aktivitesinin Tayini	24
4.7. Katalaz Aktivite Tayini	25
4.8. GSH-Px Tayini	26
4.9. GSH Tayini	27
5. BULGULAR.....	30
5.1 İstatistiksel Analiz	34
6. TARTIŞMA	42
7. KAYNAKLAR	455

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Bir cıvık mantar türü olan ve "köpek kusmuğu" olarak adlandırılan <i>Fuligo septica</i>	4
Şekil 2.	<i>Mucor Mucedo</i>	5
Şekil 3.	<i>Saccharomycetaceae</i>	6
Şekil 4.	<i>Penicillium chrysogenum</i>	6
Şekil 5.	<i>Claviceps purpurea</i>	7
Şekil 6.	<i>Agaricus campestris</i>	8
Şekil 7.	<i>Cantharellus cibarius</i>	8
Şekil 8.	<i>Lactarius deliciosus</i>	9
Şekil 9.	<i>Boletus edulis</i>	9
Şekil 10.	<i>Amanita Muscaria</i>	11
Şekil 11.	İbotenik Asit.....	11
Şekil 12.	<i>Lepiota Brunneincarnata</i>	12
Şekil 13.	<i>Amanita Virosa</i>	12
Şekil 14.	<i>Amanita Phalloides</i>	13
Şekil 15.	<i>Silybum marianum</i>	17
Şekil 16.	<i>Cynara scolymus</i>	18
Şekil 17.	Sinarin(1-3, dikafeol kinik asit)	19
Şekil 18.	Sıvı azotta toz haline getirilmiş karaciğer dokusu	22
Şekil 19.	MDA ortalama grafiği.....	38
Şekil 20.	SOD ortalama grafiği	39
Şekil 21.	GSH ortalama grafiği	39
Şekil 22.	GSH-Px ortalama grafiği	40
Şekil 23.	Katalaz ortalama grafiği.....	41

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Zehirli Mantarların Sınıflandırılması	10
Tablo 2.	Fallotoksinler	14
Tablo 3.	Amatoksinler.....	15
Tablo 4.	SOD.....	20
Tablo 5.	GSH-Px	20
Tablo 6.	Doku lipid peroksidaz ölçümü	23
Tablo 7.	SOD aktive ölçümü.....	25
Tablo 8.	Katalaz	25
Tablo 9.	Katalaz aktivitesinin ölçümü.....	26
Tablo 10.	GSH-Px aktivite ölçümü	27
Tablo 11.	Karaciğer doku protein tayini	29
Tablo 12.	MDA VE GSH ölçüm sonuçları	30
Tablo 13.	GSH-Px ve SOD ölçüm sonuçları.....	31
Tablo 14.	Katalaz ölçüm sonuçları.....	33
Tablo 15.	Değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler.....	35
Tablo 16.	Anova test sonuçları.....	36
Tablo 17.	Scheffe çoklu karşılaştırma testi sonuçları	37

KISALTMALAR LİSTESİ

AST	: Aspartat aminotransferaz
ALT	: Alanin aminotransferaz
BSA	: Bovine serum albümine
BUN	: Blood urea nitrogen
CCl₄	: Karbon tetra klorür
CHPO	: Cumen hidroperoksit
CuCl₂	: Bakır II klorür
DTNB	: 5-5-Dithio-bis, 2-nitrobenzoik asid
GSH	: Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HPLC	: High liquid performans chromatography
i.p	: Intraperitonel
i.v	: Intravenöz
LDH	: Laktat dehidrojenaz
MDA	: Malondialdehit
NBT	: Nitroblue tetrazolyum
Na₂CO₃	: Sodyum karbonat
Na₂EDTA	: Disodyum etilendiamin tetra asetat
(NH₄)SO₄	: Amonyum sülfat
O₂[·]	: Süperoksit radikali
RNA	: Ribo nükleik asit
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyobarbitürik asit
t-BHP	: Tert-butil hidroperoksit
TCA	: Trikloroasetik asit solüsyonu

1. ÖZET

ALFA-AMANİTİN İLE OLUŞTURULMUŞ MANTAR TOKSİSİTESİ VE ENGİNARIN (CYNARA SCOLYMUS) BU TOKSİSİTE ÜZERİNE ETKİLERİ

Dünyada keşfedilmiş yaklaşık 2000 mantar türünden özellikle 50 adet civarı insan için toksik olabileceği belirtilmiştir Ülkemizde, mantar zehirlenmeleri nedeniyle her yıl ölüm vakaları gerçekleşmekle beraber, sağlık merkezlerine başvuran tüm zehirlenmelerinin %1,5-3.4'ünü mantarla zehirlenmelerin oluşturduğu bildirilmektedir. Ülkemizde mantar zehirlenmelerinin yaklaşık %90'ından Amanita phalloides türü neden olmaktadır. Alfa amanitin, bisiklik oktapeptid yapıda olup, toksisitesinden sorumlu ana yapıdır. A. phalloides türü mantar zehirlenmeleri tedavisinde kristalize penisilin, kortikosteroidler ve tioktikasit kullanılmakla beraber özellikle son yıllarda halk arasında meryem ana dikenini olarak adlandırılan Silybum marianum bitkisinin aktif bileşeni olan silibinin karaciğer koruyucu ve hayat kurtarıcı özelliği çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmamızda, yine antioksidan özelliği ve karaciğer üzerinde olumlu etkileri çalışmalarla gösterilmiş Cynara scolymus (Enginar) bitkisinin bu zehirlenme üzerindeki olası etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır; herbiri 7'şer rat içeren 4 grup kullanılmıştır. Çalışma sonucunda alfa amanitin zehirlenmesine bağlı bozulan antioksidan parametrelerde, enginar ekstresi uygulanmasıyla anlamlı düzelmeler olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Amanita Phalloides, Alfa Amanitin, Enginar, Antioksidan Parametreler

2. ABSTRACT

MUSHROOM TOXICITY COMPOSED OF ALPHA-AMANITIN AND EFFECTS OF ARTICHOKE (CYNARA SCOLYMUS) ON THIS TOXICITY

It was stated that about 2000 types of mushrooms, discovered around the world, particularly 50 pieces of them may be toxic to humans. In our country, along with death cases taking place every year because of mushroom poisoning, it is reported that 1.5-3.4% of all poisonings which apply to health center are composed of mushroom poisoning. About 90% of mushroom poisoning causes *Amanita phalloides* species in our country. Alpha-amanitin, is bicyclic octapeptide structure and responsible for the toxicity of the main structure. At the treatment of *A.phalloides* type of mushroom poisoning, crystalline penicillin, corticosteroids and tioticacid have been used and especially in recent years, popularly referred to as the thorn of the Virgin Mary, the active component of the plant *Silybum marianum* for protection and life-saving liver of silibinin property is demonstrated in studies. In our study, it has been shown with studies that antioxidant properties and its positively impact on the liver, it has aimed to investigate *Cynara scolymus* (artichoke) plant's possible effects of this poisoning. Four groups was used each of which contains seven rats As a result of the study, on the deteriorated antioxidant parameters due to the poisoning of alpha amanitin has been seen significant improving with application artichoke extract.

Keywords: *Amanita Phalloides*, Alpha-Amanitin, Artichoke, Antioxidant Parameters

3. GİRİŞ

3.1. Mantarlar:

Mantarlar, gerçek kök, gövde, yaprak ve çiçek gibi organları olmayan, ilkel bir canlı grubudur. Bu sınıflandırmaya, küf mantarları, zehirli veya zehirsiz mantarlar da dahil yaklaşık 60.000 tür bulunmaktadır (1).

Bazı sınıflandırmalara göre, klorofil içermediğinden ne bitkiler alemine; ne de hareket edemeyip, hücre yapısı bakımından farklılık gösterdiğinden hayvanlar alemine dahil edilmemektedir. Kendi içinde ayrı sınıflandırılıp fungi alemine dahil edilmektedir (2).

Mantarlar yapı, büyüklük ve bulundukları ortam bakımından farklılık sergilemektedir. Tek veya çok hücreli olabilip, karada veya denizde yaşayabilirler. Klorofilleri olmadığından fotosentez yapamazlar; bu nedenle heterotrof canlılardır. Bazı türleri başka canlılar üzerinde parazit, bazıları ise organik atıklar üzerinde çürükçül yaşarlar. Parazit mantarlar genellikle hastalık etmenidir. Çürükçül mantarlar ise genellikle cansız bitkisel hayvan dokuları üzerinde yaşamaktadırlar. Birçok yenebilir mantar bu grupta incelenmektedir. Bazı mantarlar ise algler ile likenleri oluşturarak beraber yaşarlar. Besini alglerden karşılarken, hifleri sayesinde topraktan aldığı su ve mineralleri alglere verir. Lezzeti ve ekonomik değeriyle tanınan trüf mantarları bu grupta incelenmektedir (1, 3, 5).

Mantar hücreleri bakteri hücrelerinden büyüktür. Bakteri hücresinde çekirdek bulunmadığı halde, mantar hücresinde bir veya daha fazla sayıda çekirdek bulunmaktadır. Hücre çeperinde kitin bulunur. Mantar hücreleri iplik şeklinde hifleri oluşturur, hifler ise bir araya gelerek ağsı bir yapı olan miselyumu meydana getirir. Miselyumlarından selüloz ve lignin parçalayıcı enzimler salgılayan mantarlar, sindirilmiş molekülleri absorbe ederler (3, 4).

Mantarlar eşeysiz veya eşeyli üreyebilirler. Eşeysiz üreme sporlar yardımıyla olup, genelde mantarlar eşeysiz çoğalmaktadır. Karada yaşayan mantarlar endospor ve ekzosporlarla, suda yaşayanlar ise zoosporlar yardımıyla üremektedir. Mantarların eşeyli üremesi yakın gametlerin bir araya gelmesi şeklindedir (1).

Mantarlar yapı olarak başlıca üç sınıfta incelenmektedir:

3.1.1. Myxomycetes (Cıvık Mantarlar):

Kamçı taşımayan ve amip gibi hareket eden bu grup, mantarların en basit ve ilkel sınıfıdır. Sıcak ve nemli topraklarda veya ölü bitkisel dokular üzerinde yaşarlar.

Sporangiyumlar içinde üretilen sporlarla çoğalırlar. Çok çekirdekli hücre çeperi olmayan canlılardır. Bu sınıfta 60 cins ve 500 kadar tür bulunduğu belirtilmiştir. Fuligo, Ceratomyxa, ve Didymium başlıca bilinen cıvık mantar türleridir (1, 4).



Şekil 1. Bir cıvık mantar türü olan ve "köpek kusmuğu" olarak adlandırılan *Fuligo septica* (8)

3.1.2. Phycomycetes (Algimsi Mantarlar):

Bu mantarlara alglere benzemesi nedeniyle algimsi mantarlar da denir. Hifleri bölmesiz olup, tallusları ise mikroskopik boyutlarda küçüktür. Hiflerde meydana gelen ekzosporlarla bitkilerde önemli hastalıklara neden olan mantar grubudur. Bitkilerde patojen olan türlerin başlıcaları *Plasmopara viticola*, *Peronospora tabacina*'dır. Asma yapraklarında görülen mildiyö hastalığının sebebi *Plasmopara viticola* türüdür. *Peronospora tabacina* ise tütün bitkisinde görülüp, tütün yapraklarını sarartır ve kurutur. *Mucor mucedo* çürükçül bir tür olup, salça, ekmek gibi organik maddeler üzerinde yaşar(1, 4, 6). Karbohidrat içeren maddelerde esmer-gri renkli küf meydana getiren *Rhizopus nigricans* türünden, kortizon ve bazı kortikosteroidlerin sentezinde yararlanılmaktadır. Progesteronun 11. C atomuna bir hidroksit (-OH) bağlayıp buradan kortizon sentezlenmektedir (1, 4).



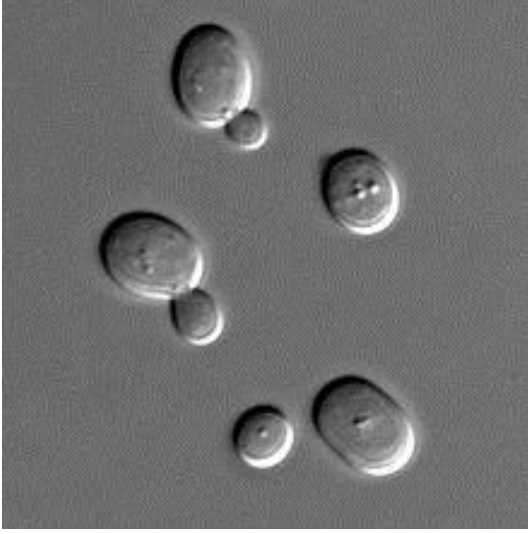
Şekil 2. Mucor Mucedo (9)

3.1.3. Eumycetes (Gerçek Mantarlar):

Genellikle toprakta yaşayan, dallanmış hifleri olan bu mantarlar, diğer mantar çeşitlerine göre gelişmiş ve büyüktür. Bu grupta sporlar, sporangiyum veya basidium denen yapılarda oluşur. Gerçek mantarlar, sporlarının oluşum biçimine göre Ascomycetes (Askuslu mantarlar) ve Basidiomycetes (Bazidiyumlu mantarlar) olarak ikiye ayrılır.

Askuslu mantarlar içerisinde tıbbi olarak önemli olanları Saccharomycetaceae (Maya Mantarları), Aspergillaceae (Yeşil Küf Mantarları), Clavicipitaceae ailesidir.

Maya mantarları, %46-50 kadar protein, %30-35 kadar glikojen, %2-3 yağ içerir. Ayrıca enzim ve B grubu vitaminler (B1, B2, B6, nikotinik asit, riboflavin, folik asit), A ve C vitamini içerir. Anemi, furunculosis tedavisinde kullanılırlar. Gıda ve vitamin içerikleri nedeniyle, diyetlerde ve antibiyotiklerle tedavide kullanılmaktadır. B₂ vitamini üretilmesinde yararlanılıp, nükleik asit üretimi için protein kaynağı olarak kullanılır. Bazı türleri ise alkol ve kefir üretiminde kullanılmaktadır (1, 10).



Şekil 3. Saccharomycetaceae (14)

Yeşil küf mantarları ekmek ve peynir gibi zengin karbohidrat içerikli besinler üzerinde çürükçül olarak yaşar ve yeşil renkli küf meydana getirirler. Bu familya içerisinde *Penicillium* ve *Aspergillus* cinsleri tıbbi olarak çok önemli cinslerdir. İngiliz mikrobiyolog, Alexander Fleming ilk kez *Penicillium* cinsinden elde edilen penisilinin antibiyotik olarak kullanılabileceğini keşfetmiştir. Bu antibiyotik, Gram (+) koküs tipi bakterilere (stafilokok, diplokok, streptokok) karşı etkili olup, *Vibrio* (kolera) ile *Salmonella* (tifo) ve *Mycobacterium* (tüberküloz) gibi çubuk şeklindeki dirençli bakterilere etkisi düşüktür (7, 11, 12).



Şekil 4. *Penicillium chrysogenum* (15)

Clavicipitaceae ailesi mantarları parazit veya çürükçül olabilmektedir. *Claviceps purpurea*, çavdar mahmuzu olarak da bilinip; bu familyanın en önemli türüdür. Bu mantar çavdar, buğday, yulaf gibi Gramineae (Buğdaygiller) bitkilerinin başaklarında hastalık oluşturur (1, 3).

Bu mantar, içerisinde zehirli ergot alkaloidleri bulundurur ve öğütülen çavdar tanelerine bulaşır. Bu undan yapılan ekmek yenirse ateş; buna bağlı halüsyasyonlar, kaslarda kramp, şiddetli yanmalarla belirgin zehirlenme görülür. Kaslardaki kramplar, gangrenli ergotizm denen gangren çeşidine dönüşebilmekte ve organ kaybı hatta ölümle sonuçlanabilmektedir (1,3,4) .



Şekil 5. *Claviceps purpurea* (16)

Ergot alkaloidleri düz kasları, özellikle uterus kaslarını kasıcı etkisi olduğundan tıpta özellikle doğumlardan veya düşüklerden sonra devam eden kanamalara karşı kanama dindirici olarak ve prolaktin inhibitörü olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda ise migren tedavisinde ve antiparkinson ilaçlarında kullanılmaktadır (1, 13).

Hiflerin belirginleşmesiyle oluşan Bazidiyumlu mantarlarda, üreme hücresi olan sporlar bu bazidiyumlarda oluşur. Bu mantarlar ormanlarda ve yeşil alanlarda yaşarlar ve çok sayıda spor oluşturup geniş alanlarda görülürler. Halk arasında mantar denince bu tür anlaşılmaktadır. Besin içerikleri %88-90 oranında su, %3,8 protein, %0,3 yağ, %4,9 karbonhidrat, %1,2 kül, eser A, B₁, B₂, B₃, B₅ vitaminlerinden oluşmaktadır. Bu familyadaki mantarlar yenebilen ve zehirli olmak üzere 2 türe ayrılabilir. 1 kilogram yaş mantar 100-200 kalori içermektedir. Tanımlanmış 1000 kadar mantar türünden

yaklaşık 50 kadarının insan için zehirli olduğu, 200 kadarının ise yenebilen gruba dahil olduğu belirtilmiştir (2, 4, 32,76).

3.1.3.1. Yenen Mantarlar:

Yenen mantarlara *Agaricus campestris* (Şampiyon mantarı), *Cantharellus cibarius* (cüce kız), *Lactarius deliciosus* (kanlıca mantarı). *Boletus edulis* örnek gösterilebilir. Bu mantarlar ülkemizde yetişmektedir (6, 7).



Şekil 6. *Agaricus campestris* (17)



Şekil 7. *Cantharellus cibarius* (18)



Şekil 8. *Lactarius deliciosus* (19)



Şekil 9. *Boletus edulis* (20)

3.1.3.2. Zehirli Mantarlar:

Şapkalı mantarların yapısında bulunan bazı toksik bileşiklerle oluşan patolojik duruma, mantar zehirlenmesi veya misetismus adı verilir. Özellikle ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde görülüp, daha çok sosyoekonomik durumu düşük kesimlerde besin maddesi olarak tüketilmesi nedeniyle mantar zehirlenmesi daha çok görülür (21). Zehirli mantarların dikkat çekici özellikte oldukları, hayvanlar tarafından yenmemeleri, pişirme esnasında gümüş çatal batırıldığında kararmaları ve belli bölgelere ait mantarların zehirli olması gibi halk arasında yaygın görüşlerin bilimsel olarak bir değeri yoktur (22).

Zehirlenme olayı için ülkemizde sağlık merkezlerine başvuruların %1,5-3,4'ünü mantar kaynaklı zehirlenmeler oluşturmaktadır (23).

Zehirli mantarlar birden fazla toksik molekül içermelerine rağmen, içerdiği ana toksin maddesine göre sınıflandırılmıştır (24).

Tablo 1. Zehirli Mantarların Sınıflandırılması (24)

Siklopeptidler	A. phalloides, A. suballicia, A.verna, A. virosa, Galerina venenata, G.autumnalis, Conocybe Marginata...
Orellanin	A.smithana, C.splendus...
Monmethilhidrazin	Helvella lacunosa, Paxina species, Gyromitra caroliana...
Muskarin	Boletus spp., Clitocybe rivulosa...
Halüsülojenik	Conocybe cyanopus, Gymnopilus spectabilis
İzoksazol	A.muscaria, Panaeolus campanulatus...
Gastrointestinal iritanlar	Boletus satanas, Russula emetica...
Disülfram etkisi yapanlar	Clitocybe claviceps, Coprinus atramentarius..

Tüm dünyada mantar zehirlenmesi sebebiyle yaşanan can kayıpları, en çok toksik siklopeptid içeren mantarlar nedeniyle olmaktadır. Bu tarz zehirlenmelerin teşhisi oldukça zor olup, hasta öyküsünün bilinmesi hayat kurtarıcıdır (25).

Ülkemizde bulunan bazı zehirli mantarlar:

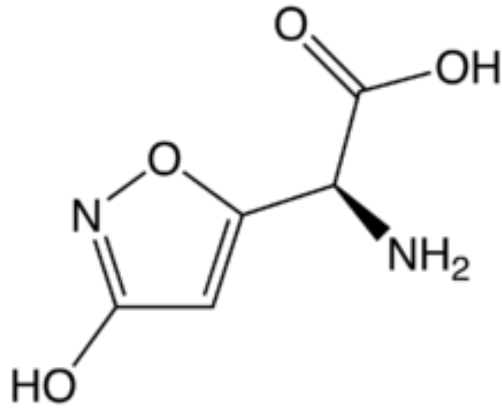
***Amanita Muscaria** (Gelin Mantarı):

Bu mantar türü ibotenik asid, muskimol ve diğer isolakson türevlerini içermektedir. A.muscaria en çok SSS stimülanı olan ibotenik asid içerir. İbotenik asidin dekarboksilasyonu ile muskimol oluşmaktadır. SSS bozucu etkiler mantar tüketildikten 30-120 dakika sonra başlar. Göz bebeklerinin büyümesi, vertigo, terleme,

hareketlerde uyum bozukluğu, kas spazmları, delirium ve komayı andıran derin uyku başlıca zehirlenme belirtileridir. Tedavi semptomatiktir. Belirtileri engellemek için fizostigmin kullanılabilir (26).



Şekil 10. Amanita Muscaria (27)



Şekil 11. İbotenik Asit (27)

*** Lepiota Brunneincarnata (Yalancı Dede):**

Genellikle bol yağışlı mevsimlerde orman ve çayırarda görülür. İçeriğindeki siklopeptid amatoksinler sebebiyle oluşan zehirlenme olaylarında belirtiler 6-24 saat sonra ortaya çıkar. İlk görülen belirtiler karın ağrısı, bulantı ve diyare şeklindedir. Zehirlenmede önce kısa bir hafifleme görülür ki bu aldatıcıdır, daha sonra ağrılar yeniden başlayıp, karaciğer yetmezliği meydana gelir. Ayrıca böbrekler görev kaybına uğrayıp, koma ve süreci takriben ölüm gerçekleşebilmektedir. Ülkemizde Bursa yöresinde bulunmaktadır (28).



Şekil 12. Lepiota Brunneincarnata (29)

*** Amanita Virosa (Ölüm Meleği):**

Yağışların arttığı bahar mevsiminde, orman bölgelerinde görülen bu mantar ülkemizde de bulunmaktadır. Yapı ve içerik olarak A. phalloides mantarına benzeyip, esas toksisiteden sorumlu yapılar amatoksin ve fallotoksinlerdir. Karaciğer toksikasyonun yanında son dönemde içeriğindeki lektinlerin eritrositlerin hemolitik aktivitelerini düşürdüğü ve yok ettiği görülmüştür. Zehirin etkinliği tavşan > rat > insan > köpek olacak şekilde azalan sırada gerçekleşmiştir (31).



Şekil 13. Amanita Virosa (30)

3.1.3.3. Amanita Phalloides (Evcik Kıran, Köy Göçüren):

Yaz veya sonbahar mevsimlerinde, özellikle meşe ve yaprak döken ormanlarında çürükçül olarak yaşayan bu tür, en zehirli mantar olarak görülür. Bazen yerleşim bulunan parklarda da bulunabilirler. İstanbul Belgrad Ormanları'nda da yaşamaktadırlar. Türkiye'de meydana gelen mantar zehirlenmeleri ölümlerinin %95'inden bu tür sorumludur (32, 33, 34). Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç ve Zehir Danışma Merkezi'ne başvuran zehirlenmelerde bu mantar türü ile oluşan zehirlenmelerin oranı %2,5 olmuştur (35).

Roma imparatoru Cladius', Rus Çarı Alexis, Alman imparatoru Charles (17. yy) gibi tarihte ünlü yöneticilerin A. phalloides mantarı zehirlenmesiyle öldükleri bildirilmiştir (22, 36).

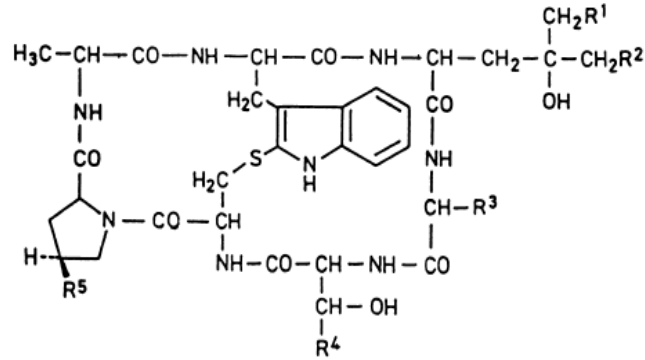
3 temel yapıdan oluşan bir mantardır. Üsteki şemsiye biçimindeki şapkası 4-12 cm çapında açık yeşil renkte olup, şapka altında üreme hücresi sporları üreten lamelleri vardır. Ayrıca 8-15 cm'lik beyaz renkli sapı ve sapın ortasında şapkaya yakın beyaz bir halka bulunmaktadır. Sapın en altında ise yine beyaz bir çanakçık vardır (36, 37).



Şekil 14. Amanita Phalloides (38)

A. phalloides türü mantarların; amanitidin, falloidin, virosin ve viroidin olmak üzere dört tür ana toksini vardır. Ancak falloidin, viroidin ve virosinin oral emilimi az toksinler olup toksikolojik etkileri düşüktür (22, 34). Fallotoksinler, 2. pozisyonunda sülfür atomu bulunan siklopeptid yapıda bir indol halkasıdır (39, 40).

Tablo 2. Fallotoksinler (39)

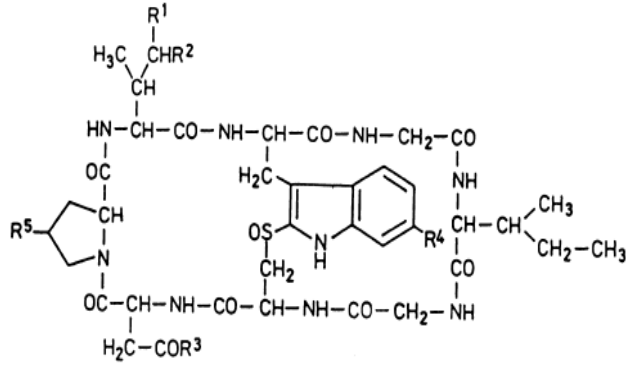


Bileşikler	Organik Bileşikler					LD ₅₀ (mg/kg)
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	
Falloidin	OH	H	CH ₃	CH ₃	OH	2,00
Falloin	H	H	CH ₃	CH ₃	OH	1,5
Profalin	H	H	CH ₃	CH ₃	H	100
Falisin	OH	OH	CH ₃	CH ₃	OH	2,5
Fallasin	H	H	CH(CH ₃) ₂	COOH	OH	1,5
Fallasidin	OH	H	CH(CH ₃) ₂	COOH	OH	1,5
Fallisasin	OH	OH	CH(CH ₃) ₂	COOH	OH	4,5

3.2. Amatoksinler:

Amanitinler, bisiklik oktapeptid yapıda olup, esas toksisitesinden sorumlu yapıdır. Fallotoksinler gibi indol halkası içerirler. Amanitinler renksiz maddeler olup su ve metanolde çözünür, ayrıca enzimlere karşı dayanıklıdırlar. Oral yoldan emilimleri yüksektir. 250 C⁰'ye ve -25 C⁰'ye kadar dayanıklıdır. Plesentadan geçemez, fakat sitolitiktirler. Yaş mantarın 1 gramında 0,2-0,3 mg amatoksin bulunup, 50 g mantar insan için lethal olduğu belirtilmiştir (34, 37, 41).

Tablo 3. Amatoksinler (39)



Bileşikler	Organik Bileşikler					LD ₅₀ (mg/kg)
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	
α-Amanitin	CH ₂ OH	OH	NH ₂	OH	OH	0,3
β-Amanitin	CH ₂ OH	OH	OH	OH	OH	0,5
γ-Amanitin	CH ₃	OH	NH ₂	OH	OH	0,2
ε-Amanitin	CH ₃	OH	OH	OH	OH	0,3
Amanin	CH ₂ OH	OH	OH	H	OH	0,5
Amanin amid	CH ₂ OH	OH	NH ₂	H	OH	0,3
Amanulin	CH ₃	H	NH ₂	OH	OH	20
Amanulinik Asit	CH ₃	H	OH	OH	OH	20
Proamanulin	CH ₃	H	NH ₂	OH	H	20

Amanitin zehir grubu içerisinde en tehlikeli ve mantarlarda en çok bulunan türevi alfa-amanitindir. İstanbul ve çevresinde yetişen *A. phalloides* türlerinin 100 gramında 4,4-13,3 mg alfa amanitin bulunduğu bildirilmiştir (42).

Alfa amanitin, gastrointestinal sistemden 90-120 dakikada emilir. Proteinlere bağlanabilen özellikte olan toksin bu yolla vücut kompartmanlarına dağılır. Enterohepatik dolaşıma girmesi patolojiyi daha da ağırlaştırır. Organik anyon transporter polipeptid 1B3 (OATP1B3) ile hepatositlere taşınır. Toksin, serum

içerisinde 36-48 saat içerisinde HPLC yöntemi ile miktarı tespit edilebilmektedir (39, 43).

Alfa amanitin, toksisitesini RNA polimeraz II enzimini inhibe edip, protein sentezini bozarak gösterir. Sonuçta hücre nekrozu gelişip, bunu takriben karaciğerde dejenerasyon ve kanama oluşabilmektedir (42). Zehirlenme derecesi, amanitin miktarı ve hepatositlerin maruz kaldığı süre artıkça artmaktadır. Karaciğer hücreleri dışında intestinal dokular ve böbreklerin proksimal ve distal tübülü de toksinden etkilenmektedir. Alfa amanitin idrar yolu ile atılıp, böbrek proksimal tübüllerinde reabsorbsiyon görülebilir. Bu esnada renal tübüler hücre ölümleri görülmektedir. Ölümler daha çok karaciğer ve böbrek gibi organ yetmezliklerinden ileri gelmektedir. Toksikasyonla oluşan serbest oksijen radikalleri, karaciğer ve böbrek yetersizliğinin fizyopatolojisine neden olabileceği belirtilmiştir (42, 44, 45).

3.2.1. Alfa amanitin zehirlenmesinde klinik bulgular:

A. phalloides zehirlenmesi 4 klinik dönemde incelenmektedir.

Latent asemptomatik dönem: Genellikle 6-12 saat bazen 48 saate kadar sürebilir. Hastada herhangi bir belirti görülmemekle beraber karın ağrısı görülebilir (22, 46).

Gastrointestinal dönem: Genellikle 12-24 saat bazen 2-4 gün belirtiler görülebilir. Karın ağrısı, bulantı, kanlı veya kansız diyare ve kusma, hipovolemi ve buna bağlı elektrolit bozukluklar görülür. Uzuvlarda kramplar ve hipotansiyon ortaya çıkar. Bu dönemde ateş görülmemektedir. Hematoksit seviyesinde düşüş, metabolik asidoz, hiponatremi, hipoglisemi, hipokalemi biyokimyasal belirtilerdir (39, 46, 47, 48).

Latent dönem: Gastrointestinal dönemi takriben 12-24 saat arası sürebilir. Karaciğer tahribatının ve vücudun biyokimyasal dengesinin bozulduğunun belirgin olduğu dönemdir. Laboratuvar bulguları bozulup, karaciğer enzimleri bu süreçte yükselmektedir. Kan pH, Na, K değerleri normal seviyelere dönerken, ALT, AST, LDH, BUN, kreatinin, bilirubin değerleri yükselmektedir (46, 47, 48).

Hepatik dönem: 2 günden uzun sürmekte, ateş yükselip, hepatit ve iç kanamalar meydana gelebilir. Ensefalopati, böbrek tübüllerinde nekroz, karaciğer ve böbrek yetmezliği oluşabilir. 4-7 gün içerisinde yaşam kaybı olabilmektedir (47, 48).

3.2.2. A. phalloides zehirlenmelerinde tedavi:

A.phalloides zehirlenmelerinin spesifik antidotu bulunmaktadır. Tedavide ilk olarak yapılması gereken zehirin gastrointestinal sistemden ve kandan uzaklaştırılmak olduğu belirtilmiştir. Bunun içinse ilk 36 saat içerisinde mide yıkama önerilip, lavman ve aktif kömür uygulaması yapılır. Böbreklerden atımı hızlandırmak içinse diüretikler uygulanıp, hasta hemodiyaliz ve hemoperfüzyona sokulur (48, 49, 50).

Daha sonra toksinin karaciğer hücreleri tarafından absorpsiyonunun önlenmesi ve tahribatının azalması içinse 3 gün boyunca 1ml/kg/gün kristalize penisilin, 7-10 gün boyunca 4 dozda C vitamini ve tiotikasıit 300mg/gün ve 20-40 mg/gün dozda intravenöz (i.v.) kortikosteroidler (Deksametazon) kullanılmaktadır (48, 49, 51)

Daha sonra tedaviye destekleyici uygulamalar ile devam edilir. Bunun için elektrolit ve sıvı takviyesi yapılır. Bağırsak florası için neomisin, streptomisin gibi antibiyotikler kullanılır. Karaciğer yetmezliği gelişir ise karaciğer transplantasyonu hayat kurtarıcı olabilmektedir (49,50).

Son yıllarda tedavide Silybum marianum (Meryem ana, deve diken) bitkisinin aktif komponenti olan Silibin 20mg/kg/gün her biri 2 saat sürecek şekilde günde 4 infüzyon (3-4 gün) olarak kullanılmaktadır. Değişen dozlarda karaciğer harabiyetini önlediği ve hayat kurtardığı gösterilmesine rağmen halen birçok ülkede bulunamamaktadır. Ülkemizde zehir merkezlerinde kitleri mevcuttur (22, 39).



Şekil 15. Sylybum marianum (53)

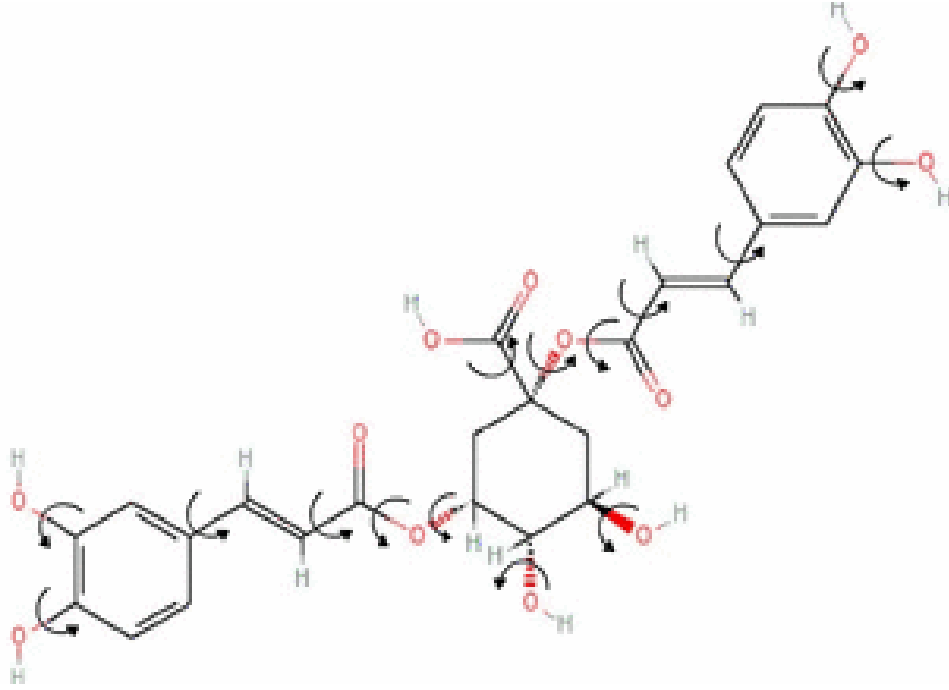
3.3. Enginar (*Cynara scolymus*):

Cynara scolymus (Compositae), 1-1,5 m ye kadar yükselebilen, çok yıllık bir bitkidir. Enginar (*C. scolymus*), yabani enginarın (*C. cardunculus*) kültürlenmiş ve ıslah edilmiş bir çeşididir (54). Enginar bir Akdeniz bitkisi olup, Birleşmiş Milletler Yiyecek ve Tarım Organizasyonu (Faostat) verilerine göre en çok İtalya, Mısır, İspanya'da yetişmektedir (59). Ülkemizde ise en çok Ege Bölgesi'nde yetiştirilmektedir. Yabani enginarda yaprak uçlarında uzun ve sivri diken bulunmaktadır. Tıbbi olarak kullanılan bitkinin yaprakları olup, su miktarı az olduğundan yapraklar ilk yıl toplanır. Toplamanın yaz aylarında yapılması önerilmektedir (54, 55).



Şekil 16. *Cynara scolymus* (56)

Enginar güçlü bir antioksidan olup, içeriğindeki kafeol kinik asit deriveleri (sinarin ve klorogenik asit) ve flavonoidler (luteolin, apigenin) sayesinde karaciğer koruyucu, kolesterol düşürücü, antimikrobiyal özellikleri bildirilmiştir (6, 57). Bunun yanı sıra irritabl bağırsak sendromu ve dispepsi gibi şikayetler için de halk tıbbında kullanılmaktadır (58). Acı lezzetinden ve etken maddelerin suda çözünürlüğünden dolayı tıbbi olarak, kurutulmuş yaprakların sulu ekstreleri ve çayları kullanılmaktadır (54).



Şekil 17. Sinarin(1-3, dikafeol kinik asit) (60)

3.4. Antioksidan Savunma Sistemleri:

Bir veya daha fazla çiftlenmemiş elektron içeren bu yüzden kimyasal olarak aktif olup daha stabil bir forma dönüşme eğilimi gösteren maddelere serbest radikaller denir (61). Reaktif olduklarından hücre organellerine zarar verici özellik gösterebilir ve hastalık oluşturabilirler (62). Serbest radikaller lipitler, proteinler, nükleik asit gibi hücre yapılarıyla etkileşip onların yapılarını bozabilirler (63).

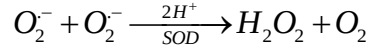
Biyomoleküller içinde en çok serbest radikallerle reaksiyona giren yapılar lipitlerdir. Serbest radikaller, hücre membranlarındaki doymamış yağ asitlerini kolayca okside ederek hücreye zarar vermektedir (64). Lipitlerin peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA), hücrenin diğer yapılarıyla etkileşip kanserojen özellik gösterebilmektedir (65).

Çalışmamızda enzimatik savunma sistemleri süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz aktiviteleri ile nonenzimatik antioksidan olan glutatyon (GSH) ve lipit peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerine bakılarak enginarın karaciğer hücrelerini korumaya yardımcı olup olmayacağı araştırılması amaçlanmıştır.

3.4.1. SOD

İki süperoksit molekülünü hidrojen peroksit ve oksijen molekülüne çevirir (66). Hızlı etki gösterir ve serbest oksijen radikallerine karşı ilk savunma basamağı olabileceği belirtilmiştir (67).

Tablo 4. SOD



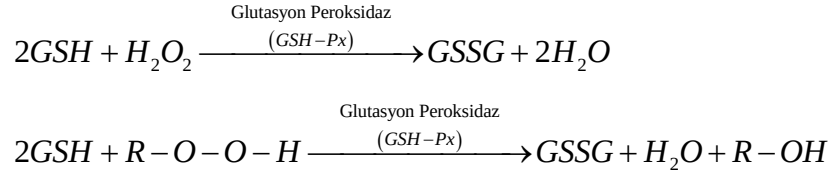
3.4.2. Katalaz

Katalaz memeli hücrelerinde farklı konsantrasyonda bulunur. Karaciğer ve böbrek dokularında katalaz miktarı kalp ve beyin dokularına göre daha fazla bulunmuştur. Molekül merkezinde Fe atomu bulundurulur ve SOD gibi hücre oksidatif strese maruz kaldığında indüklenerek 2 adet H_2O_2 'yi H_2O ve O_2 ' e çevirmektedir (67).

3.4.3. GSH-Px

Peroksitlerin indirgenmesinden sorumlu selenyum içeren sitozolik bir enzimdir. Karaciğerde yüksek, beyin, böbrek ve kalpte orta derecede aktivitede bulunan enzim aşağıdaki reaksiyonları katalizelemektedir (68).

Tablo 5. GSH-Px



3.4.4. GSH

Non-enzimatik bir antioksidan olan yapı, hücrelerin oksidatif strese ve radyasyona karşı korunmasında, ilaçların toksik artıklarının arındırılmasında, lokotrien ve prostglandin gibi endojenik moleküllerin metabolizasyonunda görev alır. Serbest radikallerle etkileşip GSH-Px'a substrat olarak antioksidan görev yapmaktadır (69).

Literatürlerden elde edilen bilgilere göre enginar antioksidan ve hücre koruyucu özellikleri olan bir bitkidir (86, 88, 90). Amanita phalloides zehirlenmelerine bağlı olarak meydana gelen hücre harabiyeti ve oksidatif stres yine literatürlerce gösterilmiştir (42, 44, 45). Çalışmamızda enginar yaprak ekstresinin bu zehirlenmede faydalı olup olmayacağının araştırılması amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM)'nde, gerekli etik kurulu izini alınarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, 8 haftalık, 200 ± 20 gram ağırlığında Sprague-Dawley cinsi 28 erkek rat kullanıldı. Deney öncesi ve deney sırasında tüm hayvanlar 12 saat ışık 12 saat karanlık foto periyodunda ve $22-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ sabit ısıdaki odalarda barındırıldı. Sprague-Dawley cinsi 28 rat rastgele alınarak, her grupta 7 rat olacak şekilde, 4 gruba ayrıldı.

4.1. Deney Protokolü

Grup 1: Kontrol (n=7) grubu olan ratlara serum fizyolojik (0.1 mL) periton içi (i.p.) yolla uygulandı. 10 gün dekapitasyonu takiben alınan örnekler, biyokimyasal olarak incelendi.

Grup 2: 2. Gruba (n=7) alfa-amanitin 3 mg/kg olacak şekilde tek doz uygulandı. 10 günün sonunda dekapitasyonu takiben alınan örnekler, biyokimyasal olarak incelendi.

Grup 3: 3. Gruba (n=7) sadece 10 gün boyunca 1 g/kg olacak şekilde enginar ekstresi gavajla (p.o.) günde 1 kere uygulandı. 10. günün sonunda dekapitasyonu takiben alınan örnekler, biyokimyasal olarak incelendi.

Grup 4: 4.grup ise yine 1 kere i.p. alfa amanitin 3 mg/kg uygulandıktan sonra 10 gün günde 1 kere olmak üzere enginar ekstresi 1 g/kg uygulandı. 10 günün sonunda dekapitasyonu takiben alınan kan ve doku örnekleri biyokimyasal olarak incelendi.

Çalışmada kullanılan Alfa amanitin AppliChem (ABD) firmasından en az yuzde 95 saflıkta temin edilmiştir. Enginar yaprak ekstresi ise Arı Mühendislik (Ankara) firmasından alınmıştır. Ekstrakt %6.5 caffeoylquinic asit (%3,7 monokefeol kinik asit ve % 2,6 dikafeol kinik asit) içerdiği firma tarafından belirtilmiştir. Her iki materyal de suda çözünmektedir.

Deney sonunda tüm gruptaki ratlara ketamin 75 mg/kg+xylozine 10 mg/kg intraperitonel (i.p.) uygulanarak anestezi altında dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından ratların kan ve karaciğer dokusu alındı. Dokuları hızla çıkarılarak 0,9 luk NaCl ile yıkanıp, daha sonra paketlenerek soğuk zincirde laboratuara ulaştırılarak $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de

derin dondurucuda çalışma gününe kadar saklandı. Karaciğer dokusunda MDA, SOD, katalaz, GSH, GSH-Px düzeyleri manuel olarak Erzurum Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'nda bakıldı.

4.2.Karaciğer Örneklerinin Hazırlanması

Karaciğer dokusu porselen havanda sıvı azot ile toz haline getirildi.



Şekil 18. Sıvı azotta toz haline getirilmiş karaciğer dokusu

4.3. MDA, Katalaz, SOD, GSH ve Protein Tayini İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması

Sıvı azotta toz haline getirilmiş karaciğer dokusu tartılarak % 1.15 KCl içerisinde buz içerisinde ika-T-18 ultraturrax homojenizatörle homojenize edilip 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlarda MDA, katalaz, SOD, GSH ve protein tayini yapıldı.

4.4. GSH-Px Tayini İçin Doku Örneklerinin Hazırlanması

Sıvı azotta toz haline getirilmiş karaciğer dokusu tartılarak % 1.15 KCl içerisinde buz içerisinde ika-T-18 ultraturrax homojenizatörle homojenize edilip 11.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantlarda GSH-Px tayini yapıldı.

4.5. MDA Tayini

Prensip: Karaciğer dokusu MDA tayin metodu Placer ve ark. (70) tarafından modifiye edilen yöntemle göre yapıldı. Bu yöntem lipid peroksidasyonunun aldehit ürünlerinden biri olan MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA)'in reaksiyonu temeline dayanmaktadır. Oluşan MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve bu çözeltinin absorbanşı 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek lipid peroksidasyonun derecesi saptanmıştır.

Materyal:

1. TBA Solüsyonu: 0.67 g Tiyobarbitürik Asit 80 ml %10'luk perklorik asit içinde çözülüp 100 ml'ye distile su ile tamamlandı.
2. Trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu: % 10'luk çözeltisi hazırlanıp oda ısısında karanlıkta muhafaza edildi.
3. Renk ayırıcı: 3 birim TCA ve 1 birim TBA kullanımdan hemen önce hazırlandı.

Metod:

Tablo 6. Doku lipid peroksidaz ölçümü

	Kör (ml)	Standart (ml)	Örnek (ml)
Örnek	-	-	0.25
Standart	-	0.25	0.25
Serum fizyolojik	0.25	-	-
Renk ayırıcı	2.25	2.25	2.25

1. Vortekste 5 dakika karıştırıldı.
2. Tüpler 100 °C su banyosunda 20 dakika kaynatılıp, soğutuldu.
3. Tüpler 5 dakika 2500 rpmde santrifüj edildi.
4. 532 nm 'de köre karşı okundu.

Dokuda lipid peroksidasyon düzeyinin hesaplanması:

$$\text{MDA} = \frac{\text{Örnegin Absorbansı}}{\text{Standartın Absorbansı}} \times \text{Standartın Konsantrasyonu}$$

Standartın Absorbansı

Dokudaki MDA düzeyi nmol/g doku olarak hesaplanır.

4.6. SOD Aktivitesinin Tayini

1. SOD ölçüm karışımı,

a) 0.3 mmol/L ksantin 9.13 mg alınıp 200 ml distile suda çözündürüldü.

b) 0.6 mmol/L Na₂EDTA 23 mg alınıp 100 ml distile suda çözündürüldü.

c) 150 µmol/L nitroblue tetrazolyum (NBT) 12.3 mg alınıp distile suda çözündürüldü.

d) 400 mmol/L Na₂CO₃ 2.54 g alınıp 60 ml distile suda çözündürüldü.

e) 1g/L bovine serum albumine (BSA) 30 mg alınıp 30 ml distile suda çözündürüldü.

Hepsi karıştırılıp koyu renkli şişede +4 °C'de saklandı.

2. Ksantin oksidaz (167 U/L) mililitresinde 0.167 U olacak şekilde 2M (NH₄)SO₄ içinde çözündürüldü.

3. 2 M (NH₄)SO₄ 2.64 g olacak şekilde tartılıp distile suyla 10 ml'ye tamamlandı.

4. 0.8mmol/L CuCl₂ 13.6 mg olacak şekilde tartılıp distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

Metod:

Prensip: Karaciğer SOD aktivitesi Sun ve arkadaşlarının yöntemine göre yapıldı (71). Bu yöntem ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikalının NBT'ü indirgeyerek renk oluşması esasına dayanır. Bu şekilde üretilen süperoksit radikalının NBT'ü indirgemesi 560 nm'de maksimum absorbans veren mavi renkli formazon oluşumu ile sonlanır. Ortamda enzim olmadığı durumda bu indirgenme maksimal olup, koyu mavi bir renk oluşmaktadır. Ortamda SOD varlığında ise enzim süperoksit anyonunu hidrojen peroksit'e çevirmekte böylece NBT indirgenmesi azalmakta ve renk değişikliği meydana gelmemektedir. Renkli formazon oluşumu

ortamın enzim konsantrasyonu ile ters orantılı olarak gerçekleşmektedir. Böylece oluşan formazonun 560 nm’de verdiği absorbanstan SOD aktivitesi hesap edilmektedir.

Tablo 7. SOD aktive ölçümü

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Reaksiyon çözeltisi	2.85	2.85
Süpernatant	-	0.10
Distile su	0.10	-
Ksantin oksidaz	0.05	0.05

20 dakika oda ısısında inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda tüm tüplere 1 ml CuCl₂ ilave edilerek reaksiyon durduruldu. 560 nm’de okundu.

Dokuda SOD aktivitesinin hesabı:

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{Absorbans (Kör)} - \text{Absorbans (Örnek)}}{\text{Absorbans (Kör)}} \times 100$$

1 Ünite SOD: %50’lik NBT inhibisyonu meydana getiren enzim miktarıdır.

$$\text{Ü/ml SOD} = \% \text{ inhibisyon}$$

$$\%50 \text{ inhibisyon}$$

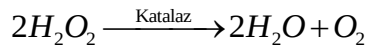
Dokuda Ü/mg protein olarak hesaplanır.

4.7. Katalaz Aktivite Tayini

Metod:

Prensip: Doku katalaz aktivitesini ölçmek için Aebi metodu kullanılmıştır (72). Katalaz aşağıdaki tepkimeye göre hidrojen peroksit (H₂O₂) yıkımını katalize eder. H₂O₂’in katalaz tarafından yıkım hızı, H₂O₂’in 240 nm dalga boyunda ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçülür.

Tablo 8. Katalaz



Metodun ayıraçları

1- 50 mM Fosfat Tamponu (pH: 7.0)

2- 30 mM H₂O₂: 0.34 ml %30'luk H₂O₂ fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır.

Tablo 9. Katalaz aktivitesinin ölçümü

	Kör (ml)	Örnek (ml)
Fosfat tamponu	1	-
Hidrojen peroksit	-	1
Homojenat	2	2

240 nm'de kör ile sıfır ayarı yapıldıktan sonra örneğin 0. (A1) ve 30. (A2) saniye içindeki absorbans farkı ölçülmek suretiyle katalaz aktivitesi hesaplanır.

Doku CAT aktivitesinin hesaplanması:

$$k = (2.3 / 30) \times (\log A1 / A2) \times \text{dilüsyon}$$

Doku için spesifik aktivite: k / mg protein

4.8. GSH-Px Tayini

Prensip: GSH-Px tayini aktivitesini ölçmek için Matkovics ve ark.yöntemine göre yapıldı (73).

Materyal:

1. Tampon 1: Tris HCl tamponu (50 mM, pH 7.6): 6.057 g Tris hidroksimetil aminometan, 0.372 g Na₂EDTA ve yaklaşık olarak 3.90 ml HCl balon jojeye konup hacim redistile su ile 1000 ml'e tamamlanır.

2. Tampon 2: Tris Tamponu (0.4 M pH 8.9): 48,46 g Tris hidroksimetil aminometan alınarak hacim redistile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. pH ise HCl ile 8.9'a ayarlanmıştır.

3. Red GSH solüsyonu: 6 mg Red GSH alınarak Tampon 1 ile hacim 10 ml'ye tamamlanır.

4. Cumen hidroperoksit (CHPO) solüsyonu: 5µl CHPO alınarak Tampon 1 ile hacim 10 ml'ye tamamlanır. Kahverengi şişede +4 °C'de saklanmıştır.

5. 5-5-Dithio-bis, 2-nitrobenzoik asid (DTNB) solüsyonu: 0.099 g 5 DTNB alınarak hacim Absolut metanol ile 25 ml 'ye tamamlanır. Kahverengi şişede +4 °C'de saklanmıştır.

6. Trikloroasetik asit solüsyonu (TCA): %10' luk hazırlanır ve kahverengi şişede bekletilmiştir.

Tablo 10. GSH-Px aktivite ölçümü

	Kontrol	Örnek
Süpernatant	0.5 ml	0.5 ml
Tampon 1	0.3 ml	0,3 ml
CHPO	-	0,1 ml
Red GSH	0.1 ml	0,1 ml (5'er sn aralıklarla)
37 °C 10 dk bekleme	37 °C 10 dk bekleme	37 °C 10 dk bekleme
TCA	1 ml	1 ml

Metod:

1. % 1.15'lik KCl ile dilue edilerek homojene edildi.
2. 1100 rpm'de santrifüj edildi.
3. 5 dk beklendikten sonra 2500 rpm'de santrifüj edildi.
4. Süpernatant 1 ml alınarak hazırlanan yeni tüplere konuldu.
5. Oda sıcaklığında 5 dk bekletilerek 412 nm'de dH₂O'ya karşı okundu.

Hesaplama: [E (kontrol)- E (örnek)] x 0.76989 / mg protein

4.9. GSH Tayini

Prensip:

GSH tayini aktivitesini ölçmek için Sedlak. ve ark. yöntemine göre yapıldı (74).

Materyal:

1. % 10'luk TCA hazırlandı.
2. 48,46 gr Tris hidroksimetil aminometan 1000 ml redistile suda çözündürülüp, HCl ile pH 8,9'a ayarlandı.
3. 0.099 g DTNB 25 Absolut metanolde çözüldü.

Metod:

1. Deney tüpüne 10 ml doku homojenatı alınıp 0.8 ml TCA solüsyonu eklenerek 20 dakika vortekste karıştırıldı.
2. 2500 rpm'de 5 sn santrifüj edilip 0.5 ml süpernatant alındı.
3. Üzerine 2 ml Tris Tamponu daha sonra da 0.1 ml DTNB solüsyonu eklendi.
4. Karıştırılıp 5 dk beklendikten sonra 412 nm'de distile suya karşı okundu.

Karaciğer doku protein tayini :

Prensip: Alkali bakır tartarat ayırıcı peptid bağları ile kompleks yaparak her 7 veya 8 aminoasit artığı 1 atom bakır bağlamaktadır. Bakır dahil edilmiş karışıma fenol ayırıcı eklendiğinde mor-mavi renk oluşur. Oluşan renk 650 nm'de okunur. Protein konsantrasyonu ile oluşan renk ile derişim arasında doğrusal bir ilişki olmadığından örnekler sulandırılıp ölçümler yapılır.

Doku homojenatındaki protein miktarı Lowry (75) yöntemine göre ölçüldü.

Kör (ml)	Örnek (ml)	Standart (ml)	
Alkali bakır ayırıcı	1.0	1.0	1.0
Örnek	-	1.0	-
Distile su	1.0	-	-
Standart	-	-	1.0

Tüpler iyice karıştırılır ve 10 dakika oda ısısında bekletilir.

Tablo 11. Karaciğer doku protein tayini

Fenol Ayıracı	4.0	4.0	4.0
----------------------	------------	------------	------------

Tüpler vorteksde karıştırılır ve 5 dakika 55 °C’de bekletilir. İnkubasyondan sonra musluk suyu altında hemen soğutulur. Daha sonra 650 nm’de standart ve örnek tüplerinin absorbansı kör tüpüne karşı okunur.

Hesaplama:

$\mu\text{g protein} / \text{ml} = (\text{Örnek Absorbans} / \text{Standart Absorbans}) \times \text{Standart Konsantrasyon} \times \text{Sulandırma}$

$\mu\text{g protein}$ değerleri hesaplamalar sırasında g protein’e çevrildi.

5. BULGULAR

MDA ve GSH deney sonuçları nmol/g doku cinsinden tablo 12 da gösterilmiştir.

Tablo 12. MDA VE GSH ölçüm sonuçları

Kontrol	MDA	Kontrol	GSH
1	125.43	1	6.68
2	115.14	2	6.74
3	118.93	3	6.33
4	142.35	4	7.5
5	110.24	5	6.9
6	133.33	6	6.72
7	107.33	7	7.12
Enginar		Enginar	
1	63.45	1	7.81
2	68.37	2	7.60
3	70.50	3	8.04
4	78.34	4	8.28
5	65.52	5	7.27
6	59.11	6	7.34
7	72.35	7	6.98
Alfa amanitin		Alfa amanitin	
1	431.16	1	5.81
2	425.18	2	4.96
3	427.32	3	5.46

4	438.65	4	5.57
5	445.80	5	5.79
6	409.25	6	5.97
7	412.13	7	5.35
Alfa amanitin +enginar		Alfa amanitin +enginar	
1	111.64	1	6.92
2	116.08	2	6.03
3	105.40	3	7.21
4	123.21	4	6.74
5	133.89	5	7.92
6	129.73	6	6.44
7	135.14	7	6.82

GSH-Px ve SOD aktivite ölçümleri tablo 13’de ünite/mg protein cinsinden gösterilmiştir.

Tablo 13. GSH-Px ve SOD ölçüm sonuçları

Kontrol	GSH-Px	Kontrol	SOD
1	3.01	1	23.64
2	3.96	2	20.19
3	2.89	3	18.22
4	3.57	4	22.43
5	3.61	5	17.24
6	3.21	6	21.75
7	3.52	7	23.46
Enginar		Enginar	
1	3.14	1	19.31

2	3.98	2	18.75
3	4.42	3	23.41
4	3.77	4	24.63
5	3.42	5	22.45
6	3.05	6	20.09
7	3.64	7	19.92
Alfa amanitin		Alfa amanitin	
1	1.23	1	10.83
2	0.96	2	14.73
3	0.76	3	13.57
4	1.07	4	9.86
5	0.89	5	12.73
6	0.91	6	13.14
7	1.31	7	11.57
Alfa amanitin + enginar		Alfa amanitin+ enginar	
1	1.97	1	18.83
2	2.31	2	16.45
3	1.76	3	17.15
4	2.45	4	15.67
5	2.15	5	16.31
6	1.89	6	15.86
7	2.04	7	14.36

Katalaz deney sonuçları k/mg protein cinsinden tablo 14’de gösterilmiştir.

Tablo 14. Katalaz ölçüm sonuçları

KONTROL	KATALAZ
1	2.53
2	2.06
3	2.50
4	2.25
5	2.78
6	2.92
7	2.29
Enginar	
1	2.23
2	2.02
3	2.97
4	2.39
5	2.47
6	2.66
7	2.22
Alfa amanitin	
1	1.25
2	1.22
3	2.26
4	1.26
5	1.14
6	1.33

7	1.31
Alfa amanitin+enginar	
1	1.91
2	2.25
3	2.12
4	1.74
5	1.53
6	1.99
7	1.88

5.1 İstatistiksel Analiz

Bu kısımda ilk aşama olarak kontrol grubu ile Enginar, Alfa amanitin ve Alfa amanitin + enginar grupları için yapılan sayısal ölçümlerin gruplar arası farklılığı incelenmiştir. Bu amaçla tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır.

Analize dahil edilen değişkenler için her bir gruba göre ayrı ayrı tanımlayıcı istatistikleri Tablo 15’de verilmiştir.

Tablo 15. Değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler

Değişken	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	Ortalama için %95 güven aralığı		Minimum	Maksimum
					Alt sınır	Üst sınır		
Kontrol	7	121.8214	12.67559	4.79092	110.0985	133.5444	107.33	142.35
Enginar	7	68.2343	6.29452	2.37910	62.4128	74.0557	59.11	78.34
MDA Alfaamanitin	7	427.0700	13.20371	4.99053	414.8586	439.2814	409.25	445.80
Aa+enginar	7	122.1557	11.49648	4.34526	111.5232	132.7882	105.40	135.14
Toplam	28	184.8204	144.56208	27.31967	128.7650	240.8757	59.11	445.80
Kontrol	7	20.9900	2.52157	.95307	18.6579	23.3221	17.24	23.64
Enginar	7	21.2229	2.26027	.85430	19.1325	23.3133	18.75	24.63
SOD Alfaamanitin	7	12.3471	1.68524	.63696	10.7886	13.9057	9.86	14.73
Aa+enginar	7	16.3757	1.38203	.52236	15.0976	17.6539	14.36	18.83
Toplam	28	17.7339	4.18445	.79079	16.1114	19.3565	9.86	24.63
Kontrol	7	6.8557	.37103	.14024	6.5126	7.1989	6.33	7.50
Enginar	7	7.6171	.45807	.17313	7.1935	8.0408	6.98	8.28
GSH Alfamanitin	7	5.5586	.34100	.12889	5.2432	5.8739	4.96	5.97
Aa+enginar	7	6.8686	.59589	.22522	6.3175	7.4197	6.03	7.92
Toplam	28	6.7250	.86650	.16375	6.3890	7.0610	4.96	8.28
Kontrol	7	3.3957	.37620	.14219	3.0478	3.7436	2.89	3.96
Enginar	7	3.6314	.48078	.18172	3.1868	4.0761	3.05	4.42
GSH-Px Alfamanitin	7	1.0186	.19617	.07414	.8371	1.2000	.76	1.31
Aa+enginar	7	2.0814	.24045	.09088	1.8591	2.3038	1.76	2.45
Toplam	28	2.5318	1.12137	.21192	2.0970	2.9666	.76	4.42
Kontrol	7	2.4757	.30325	.11462	2.1953	2.7562	2.06	2.92
Enginar	7	2.4229	.31611	.11948	2.1305	2.7152	2.02	2.97
Katalaz Alfaamanitin	7	1.3957	.38613	.14594	1.0386	1.7528	1.14	2.26
Aa+enginar	7	1.9171	.23803	.08997	1.6970	2.1373	1.53	2.25
Toplam	28	2.0529	.53567	.10123	1.8451	2.2606	1.14	2.97

ANOVA testi ile elde edilen sonuçlar Tablo 16’de verildiği gibidir.

Tablo 16. Anova test sonuçları

		Kareler toplamı	df	Kareler Ortalaması	F	p
MDA	Gruplar arası	561210.468	3	187070.156	1476.485	.000
	Grup içi	3040.793	24	126.700		
	Toplam	564251.261	27			
SOD	Gruplar arası	375.458	3	125.153	30.869	.000
	Grup içi	97.303	24	4.054		
	Toplam	472.761	27			
GSH	Gruplar arası	15.359	3	5.120	25.009	.000
	Grup içi	4.913	24	.205		
	Toplam	20.272	27			
GSH-Px	Gruplar arası	31.138	3	10.379	88.527	.000
	Grup içi	2.814	24	.117		
	Toplam	33.951	27			
Katalaz	Gruplar arası	5.362	3	1.787	17.979	.000
	Grup içi	2.386	24	.099		
	Toplam	7.748	27			

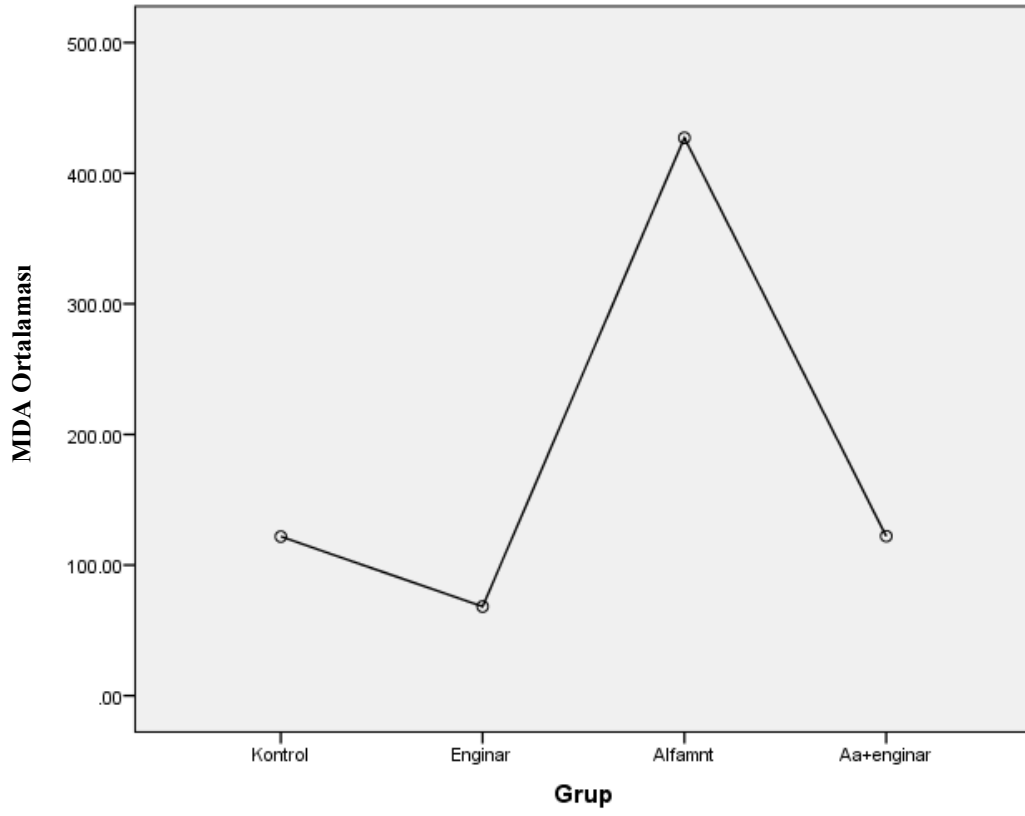
Tablo 16’deki sonuçlara göre gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığının anlaşılabilmesi için çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırma hatalarına karşı en tutucu test olan Scheffe testi uygulanmıştır. Sonuçlar Tablo 17’deki gibidir.

Tablo 17. Scheffe çoklu karşılaştırma testi sonuçları

Değişken	Kontrol	Enginar	Alfamnt	Aa+enginar
MDA	121.82 $\pm$ 12.67 a	68.23 $\pm$ 6.29 b	427.07 $\pm$ 13.20 c	122.15 $\pm$ 11.49 a
SOD	20.99 $\pm$ 2.52 a	21.22 $\pm$ 2.26 a	12.34 $\pm$ 1.68 b	16.37 $\pm$ 1.38 c
GSH	6.85 $\pm$ 0.37 a	7.61 $\pm$ 0.45 b	5.55c $\pm$ 0.34 c	6.86 $\pm$ 0.59 a
GSH-Px	3.39 $\pm$ 0,37 a	3,63 $\pm$ 0.48 a	1,01 $\pm$ 0,19 b	2,08 $\pm$ 0,24 c
Katalaz	2.47 $\pm$ 0,30 a	2,42 $\pm$ 0,31 a	1.39 $\pm$ 0,38 b	1,91 $\pm$ 0,23 c

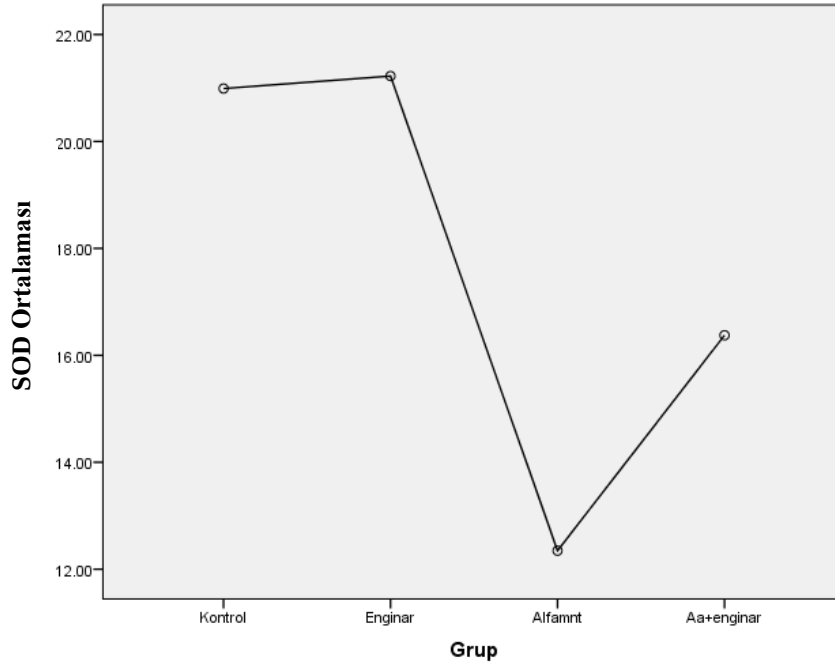
Tek bir sütundaki değişken için, aynı harfler gruplar arası farklılık olmadığını, farklı harfler gruplar arası farklılık olduğunu göstermektedir. Kontrol grubu ile kıyaslanırsa enginar grubu, sadece MDA ve GSH değişkenlerinde farklılık oluşturmuştur. Alfa amanitin, tüm değişkenlerde farklılık oluştururken, Alfa amanitin+enginar SOD, GSH-Px ve katalaz değerlerinde farklılık oluşturmuştur.

Bu değişkenlerin gruplara göre ortalama değişim grafikleri aşağıda verildiği gibidir.



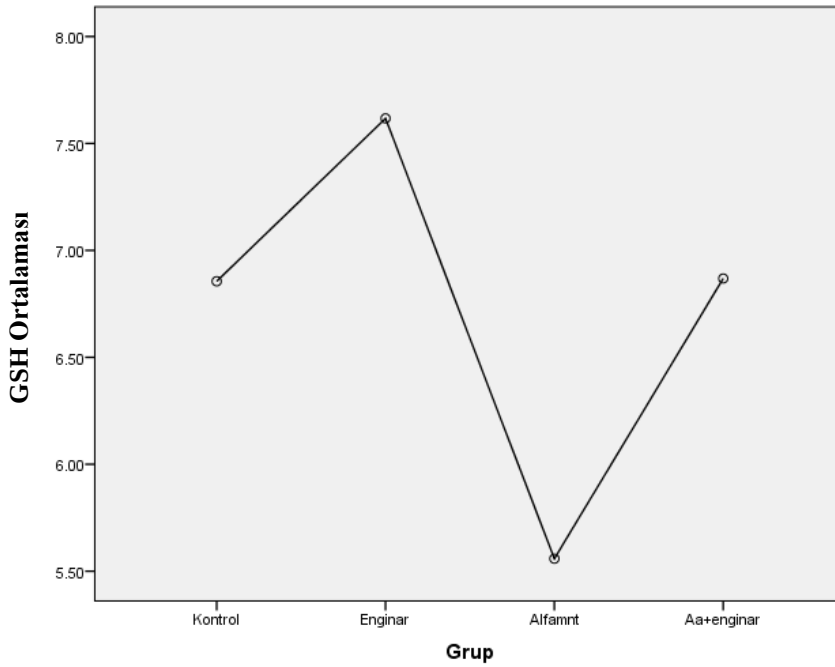
Şekil 19. MDA ortalama grafiği

Kontrol grubuna göre kıyaslandığında enginar MDA düzeyini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde aşağı çekmiştir. Alfa amanitin verilmesiyle aşırı anlamlı olarak yükselen MDA değerleri enginar tedavisiyle kontrol grubuna yakın seviyelere gelmiştir.



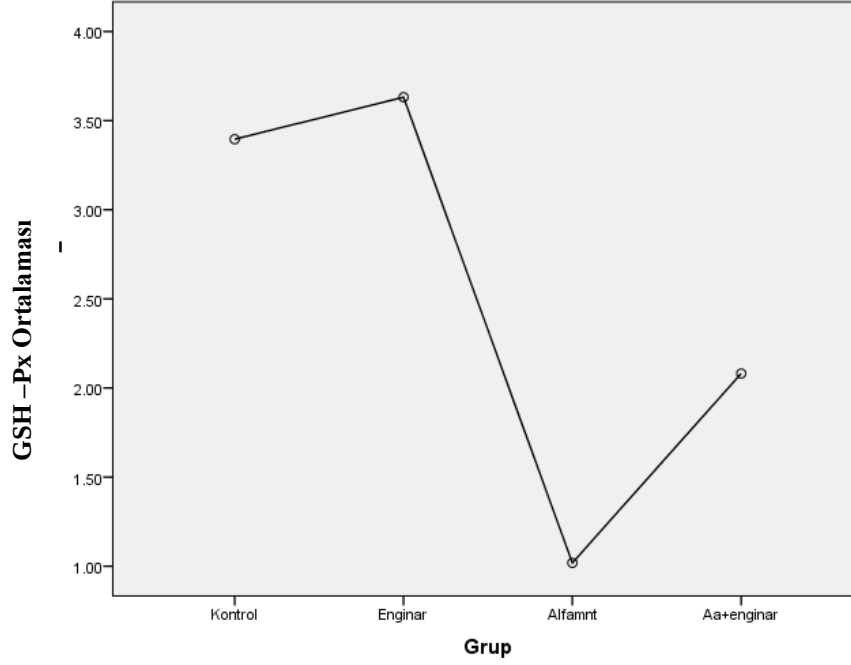
Şekil 20. SOD ortalama grafiği

SOD aktiviteleri bakımından kontrol ve sadece enginar grubu istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. Fakat alfa amanitin uygulamasıyla düşen aktivite enginar terapisiyle tekrar anlamlı bir şekilde yükselmiştir.



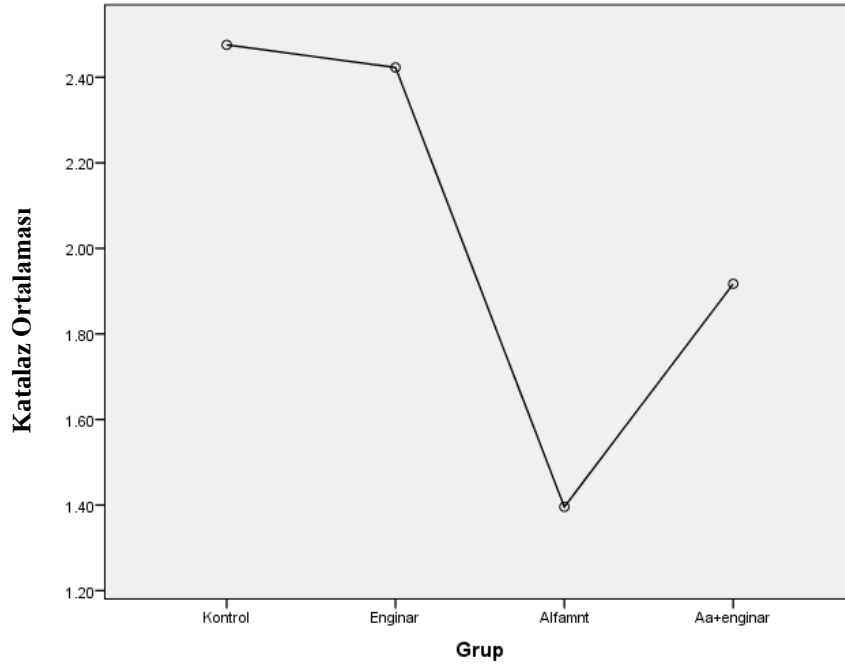
Şekil 21. GSH ortalama grafiği

GSH düzeyleri bakımından 4 grup da birbirinden farklı bulunmuştur. Enginar kontrol grubuna göre GSH seviyesini yükseltirken, alfa amanitin verilmesiyle oldukça düşen GSH düzeyleri enginarla kontrol grubu seviyesine yaklaşmıştır.



Şekil 22. GSH-Px ortalama grafiği

GSH-Px aktivitesi enginar verilmesiyle bir miktar yükselmiş olmakla beraber bu yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Fakat alfa amanitinle anlamlı şekilde düşmüş, tedaviyle düşen aktivite yükselmiştir.



Şekil 23. Katalaz ortalama grafiği

Enginar verilmesiyle katalaz aktivitesinde azalma görülmekle beraber, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Alfa amanitinle oldukça düşen aktivite enginar verilmesiyle anlamlı şekilde yükselmiştir.

6.TARTIŞMA

Dünyada 2000 çeşit aydınlatılmış mantar çeşidinden sadece 50 civarı insan ırkı için toksik olabileceği belirtilmiştir. Bu mantar çeşitlerinden en toksik ve ölümcül olarak bilineni ise *A. phalloides*'tir (76). *A. phalloides* zehirlenmelerinde iki farklı ısıya dayanıklı yapı esas toksisteden sorumludur. Bu toksinler diğer amanita çeşitleri içerisinde en çok *A. phalloides* çeşidinde bulunur.

Bunlardan ilki olan fallotoksinler bisiklik heptapeptid yapıda olup enterosit ve hepatosit hücre membranlarında değişikliğe neden olurlar. Fallotoksinler amatoksinlere göre daha az zehirli bir grup olup en bilinenleri fallodin, fallasidin, fallolislin ve fallindir. Bunun sebebi ise sindirime ve ısıya daha az dayanıklı oluşudur. Diğer toksin olan amatoksinler ise 10-20 kat daha zehirli olup, bisiklik oktapeptid yapıdadır. Hepatosit, enterosit ve proksimal renal hücrelerde protein sentezinin transkripsiyon safhasını RNA polimeraz II enzimini inhibe ederek durdurur ve hücrelerde nekroz oluşumuna neden olur (77, 78).

Amatoksinler yavaş etki eden zehirler olup en bilinenleri alfa amanitin, beta amanitin, amaninamide, amanin ve amanullindir. Alfa amanitin ilk saflaştırılan yapı olup, küçük dozlarda bile karaciğer ve böbreklerden elemine edilmeye çalışılırken hücre ölümlerine ve organ yetmezliklerine neden olmaktadır (78,79).

Günümüzde, Alfa amanitin zehirlenmelerinde antidot olmadığından, eliminasyonu ve zehirin hücre içine girmesini engelleyici çeşitli spesifik farmakolojik tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. *Silybum marianum* bitkisinden elde edilen silibinin türevi suda çözünen bir madde olan silibinin, pensilin G gibi amatoksinlerin hücre içine alınmasını azaltarak hepatoprotektif özellik gösterir ve tedavide kullanılır (79,80).

Vogel ve ark. Beagle cinsi köpekler üzerinde yaptığı çalışmada silibinin amatoksinlerin neden olduğu klinik olgulara faydası olduğu ve bu zehirlenmelerde hayat kurtarıcı olabileceği göstermiştir (81).

Yine Magdalan ve ark.'nın hepatosit kültürü üzerinde yaptığı araştırmada, silibininin karaciğer hücreleri üzerinde koruyucu özelliğini göstermişlerdir(82).

Enginar, geleneksel tıpta yüzyıllar boyunca spesifik bir karaciğer ve safra kesesi ilacı olarak kullanılmaktadır. Enginarın asıl etkin maddesi sinarin olup tüm bitkide bulunmasına rağmen en yüksek oranda yaprak kısmında bulunmaktadır (83,84). Bu yüzden enginar içerikli ilaçlar ve ekstreler daha çok yapraklardan hazırlanmaktadır. Çalışmamızda kullanılan ekstre de kurutulmuş yapraklardan hazırlanmıştır.

Sinarin bir fenolik asit bileşiği olup, silibinine benzer şekilde karaciğeri koruyucu ve yenileyici etkiden sorumlu yapıdır. Kolagog ve koleretik özellik gösterip, safra salınımıyla karaciğerin detoksifikasyonunu sağlamaktadır (84,85).

1987’de Adzet ve ark. yaptığı çalışmada, karaciğer toksikasyonu oluşturan karbon tetra klorürün (CCl_4) hepatositlerdeki olumsuz etkisi üzerinde sinarinin etkileri araştırılmış ve hepatoprotektif özelliği gösterilmiştir (86).

Yine bir başka çalışmada Mehmetçik ve ark. CCl_4 ile oluşturulmuş karaciğer toksitesi üzerinde enginar yaprak etkisinin karaciğer enzimleri (ALT, AST) ve antioksidan parametreler üzerindeki olumlu etkileri gösterilmiştir. Tedavi sonucunda ALT, AST seviyeleri ve MDA düzeyleri anlamlı derecede düşmüştür (87)

Antonio Jimeñez-Escrig ve ark. araştırmasında enginarın aktif maddelerinden polifenoller ekstre edilip ratlar üzerinde denenmiş ve SOD, GSH, GSH-Px ve bir protein oksidasyon parametresi olan 2-Aminoadipic semialdehitte kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar bulunmuştur(88).

Gebhardt ve Fausel’in ratlar üzerinde yaptığı çalışmada tert-butil hidroperoksit (t-BHP)’in sebep olduğu laktat dehidrojenaz sızıntısı ölçülerek belirlenen sitotoksitede ve malondialdehit seviyeleri ölçülerek belirlenen lipid peroksidasyonda anlamlı düşüşler tespit edilmiştir(89).

Küçükgergin ve ark. yüksek kolesterolü dietle beslenen ratlar üzerinde çalışmış, yüksek kolesterolün neden olduğu hepatik ve kardiyak oksidatif stres ve hasarın enginar yaprak ekstresi ile düşürülebileceğini belirtmişlerdir (90).

Çalışmamızda antidotu bulunmayan, semptomatik ve zehirin absorpsiyonunu azaltılmasına dayanan, Amanita phalloides toksikasyonu tedavisinde Silybum marianum bitkisinin faydasından esinlenilerek yine hepatoprotektif özelliği literatürlerce gösterilmiş enginar bitkisi denenmiştir.

Alfa amanitin zehrinin neden olduğu oksidatif stres ve tahribat tüm gruplarda aşırı anlamlı olarak görölmüştür. Bakılan antioksidan parametrelerin hepsinde alfa-amanitin ve alfa-amanitin+enginar grupları arasında anlamlı değışikler görölmüş, enginarın toksisite üzerinde olumlu etkisi olduğu ve hücre hasarını azaltabileceği olarak yorumlanabilir. Ayrıca MDA ve GSH seviyeleri bakımından kontrol ve sadece enginar grupları arasındaki anlamlı düşüş enginarın antioksidan özelliğini gösterebilir. Yine özellikle MDA ve GSH seviyelerindeki kontrol ve alfa amanitin+enginar grupları arasındaki istatistiksel anlamsızlık enginarın zehrin olumsuz etkilerini giderebileceği konusunda fikir oluşturmıştır. Diğer parametreler olan SOD, GSH-Px ve Katalaz seviyelerinde alfa amanitin grubundaki kontrol grubuna göre görölen aşırı anlamlı yükseliş ve enginar tedavisiyle anlamlı düşüşü enginarın bu tahribatta yardımcı olabileceğini göstermiştir. Bu çalışmayla tıpkı silimarinde olduğu gibi enginarın esas etken maddesi olan sinarinin de izole olarak uygun dozda verilmesi alfa amanitin zehirlenmesinde etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca ileride yapılacak çalışmalarla diğer alfa amanitin zehiri tedavilerine destek olabileceği inancındayız.

7. KAYNAKLAR

1. Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. Mycophyta In Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. (Editors). Farmasotik Botanik. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. 1978: 57-83.
2. Boztok K, Atilla F. Zehirli Mantarlar. Türk Farmakoloji Derneği Klinik Toksikoloji Çalışma Grubu. 2012: 1-12.
3. Baytop A. Mantarlar. In: Baytop A. (Editor). Farmasötik Botanik Ders Kitabı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları. 1991: 3367-3389.
4. Karamanoğlu K. Mantarlar. In: Karamanoğlu K.(Editor). Farmasotik Botanik Ders Kitabı, Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. 1977: 355-379.
5. Boztok K. Mantar Üretim Tekniği. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları. 1990:168.
6. Tanker M, Tanker N. Cynara Scolymus. In: Tanker M, Tanker N (Editors). Farmakognozi Cilt I. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. 1985:42.
7. Tanker M, Tanker N. Antibiotikler. In Tanker M, Tanker N. Farmakognozi Cilt II. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları. 1990: 220-268.
8. http://tr.wikipedia.org/wiki/C%C4%B1v%C4%B1k_mantar. 21.01.2015.
9. http://en.wikipedia.org/wiki/Mucor_mucedo. 07.05.2014.
10. Mattila P, Könkö K, Euvola M et al. Contents of vitamins, mineral elements and some phenolic compound in cultivated mushrooms. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001; 42: 2449-53.
11. Eitenmiller RR, Wakil JR, Shani KM. Production and Properties of Pencillium Roqueforti Lipase. Food And Science. 1970; 35: 130-135.
12. Alexander Fleming. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. Influenza. British Journal of Experimental Pathology. 1929; 10: 226-236..

13. Helena Hulvová, Petr Galuszka, Jitka Frébortová and et al. Parasitic fungus *Claviceps* as a source for biotechnological production of ergot alkaloids. *Biotechnology Advances*. 2011; 31: 79-89.
14. <http://en.wikipedia.org/wiki/Saccharomycetaceae>. 29.01.2014.
15. http://en.wikipedia.org/wiki/Penicillium_chrysogenum. 12.05.2015.
16. http://en.wikipedia.org/wiki/Claviceps_purpurea. 01.03.2015.
17. http://en.wikipedia.org/wiki/Agaricus_campestris. 30.10.2013.
18. <http://en.wikipedia.org/wiki/Chanterelle>. 17.02.2015.
19. http://en.wikipedia.org/wiki/Lactarius_deliciosus. 05.03.2015.
20. http://en.wikipedia.org/wiki/Boletus_edulis. 27.02.2015.
21. Ergüven M, Çakı S, Deveci M. Mantar zehirlenmesi: 28 vakanın değerlendirilmesi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*. 2004; 47: 249-253.
22. Arıcı A. Farmakoloji Derneği Klinik Toksikoloji Çalışma Grubu. 2012; 2: 26-34.
23. Kalkan Ş, Tunçok Y, Güven H. İlaç ve Zehir Danışma Merkezine bildirilen olgular. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2010; 12: 275-83.
24. Berger JK, Guss AD. Mycotoxin revisited. *The Journal of Emergency Medicine*. 2005; 28: 53-62.
25. Goldfrank LR. Mushrooms. *Toxicologic Emergencies*, 1998; 8: 1564-1569.
26. Grimes GL, Gillman L, Smith A and et al. Mushroom Poisoning. Diagnosis and Treatment. Rumack BH, Salzman E (Editors). Florida: CRC Press Inc. 1978: 181-186.
27. https://en.wikipedia.org/wiki/Amanita_muscaria. 10.03.2015.
28. Razaq A, Vellinga EC, Ilyas S, Khalid AN. *Lepiota brunneoincarnata* and *L. subincarnata*: distribution and phylogeny. *Mycotaxon*, 2013; 126: 133–41.
29. https://en.wikipedia.org/wiki/Lepiota_brunneoincarnata. 03.10.2014.
30. https://en.wikipedia.org/wiki/Amanita_virosa. 11.03.2015.

31. Antonyuk VO, Yu Klyuchivaska O, Stoika RS. Cytotoxic proteins of *Amanita virosa* Secr. mushroom: Purification, characteristics and action towards mammalian cell. *Toxicon*. 2010; 55: 1297-1305.
32. Mat A. Türkiye'de Mantar Zehirlenmeleri, *Farma Bülten*. 1992; 2: 38-42.
33. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. In Kayaalp SO (Editor). 9 th ed. Ankara: Hacettepe-TAŞ Kitapçılık. 2000: 345-346.
34. Kurtoglu S, Zehirlenmeler (teşhis ve tedavi), Kayseri Erciyes Üniversitesi Yayınları. 1992; 30: 209-232.
35. Hocaoglu N, Kalkan Ş, Tunçok Y. Mushroom poisonings reported to the Dokuz Eylul University drug and poison information center. *Turk J Emerg Med* 2010; 10(3): 119-125.
36. Bonnet MS, Basson PW. The toxicology of *Amanita phalloides*. *Homeopathy*. 2002; 91: 249–254.
37. Bresinsky A, Besl H. A Colour Atlas of Poisonous Fungi. In: Bresinsky A, Besl H. London: Wolfe Publishing, 1990: 26-29.
38. http://en.wikipedia.org/wiki/Amanita_phalloides. 25.02.2015.
39. Vetter J. Toxin of *A.phalloides*. *Toxicon*. 1998; 36(1): 13-24.
40. Letschert K, Faultstich H, Keller D. Molecular Characterization and Inhibition of Amanitin Uptake Into Human Hepatocytes. *Toxicol Sci*. 2006; 91(1): 140-149.
41. Himmelmann A, Mang G, Schonorf-Huber S. Lethal ingestion of stored *A.phalloides* mushrooms. *Swiss Med Wkly*. 2001; 131(41-42): 616-617.
42. Özbek H, Cengiz N, Bayram İ ve ark. Alfa-amanitinle oluşturulmuş böbrek ve karaciğer toksisitesinde alfa-pinen ve silibininin etkisinin sıçanlar üzerinde araştırılması. *Genel Tıp Derg*. 2008; 18(4): 159-164.
43. Zanobbio L, Palazzo M, Gariboldi S. Intestinal glucose uptake protects liver from lipopolysaccharide and D-galactosamine, acetaminophen, and alpha-amanitine in mice. *Am J Pathol*. 2011; 175(3): 140-149.

44. Nicholson FB, Korman MG. Death from Amanita poisoning. J Med. 1997; 27: 448-449.
45. Olesen LL. Amatoxin Intoxication. Scand J Urol Nephrol. 1990; 24: 231-234.
46. Kurtoğlu S, Anar H. Mantar Zehirlenmesi ve Tedavisi Yeni Tıp Dergisi. 1985; 2(4): 16-24.
47. Sem EH, Gietemab JA, Bronsvelda W and et al. Amanita phalloides, a potentially lethal mushroom: its clinical presentation and therapeutic options. Netherlands Journal of Medicine. 1996; 49: 19-23.
48. Alves A, Gouveia M, Paulo JF and et al. Mushroom poisoning with Amanita phalloides-a report of four cases. European Journal of Internal Medicine. 2001; 12. 64-66.
49. Yafetaji D, Çalışkan S. Amanita phalloides zehirlenmesi. İst. Çocuk Kl. Dergisi. 1992; 27: 76-80.
50. Vale JA, Meredith TJ. Poisoning: Diagnosis and Treatment, Thetford: Lowe and Brydone Printers Ltd. 1981: 114-117.
51. Poucheret P, Fons F, Dore JC and et al. Amatoxin poisoning treatment decision making, pharma-therapeutic clinical strategy assessment using multidimensional multivariate statistical analysis. Toxicon. 2010; 15;55(7): 1338-45.
52. Saller R, Brignoli R, Melzer J and et al. An updated systematic review with meta-analysis for the clinical evidence of silymarin. Forsch Komplementmed. 2008; 15(1): 9-20.
53. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Devedikenî>. 14.10.2014.
54. Tanker M, Tanker N. Farmakognozi. In: Tanker M, Tanker N (Editors). Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları Cilt 1, 1991: 218-219.
55. Escrig JA, Dragsted LA, Daneshvar B and et al. In Vitro Antioxidant Activities of Edible Artichoke (Cynara scolymus L.) and Effect on Biomarkers of Antioxidants in Rats, J. Agric. Food Chem. 2003; 51: 5540-5545.
56. <http://en.wikipedia.org/wiki/Artichoke>. 23.02.2015.

57. Mehmetçik G, Ozdemirler G, Koc N and et al. Effect of pretreatment with artichoke extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2008; 60: 475-480.
58. Holtmann G, Adam B, Haag S and et al. Efficacy of artichoke leaf extract in the treatment of patients with functional dyspepsia: A six-week placebo-controlled, double-blind, multicentre trial. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2003; 18: 1099-1105.
59. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. 04.08.2014.
60. Guo-Chung Dong. Blocking Effect of an Immuno-Suppressive Agent, Cynarin, on CD28 of T-Cell Receptor. *Pharmaceutical Research*. 2009; 26(2): 375-381.
61. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. In: Akkuş İ. Konya: Mimoza Yayınları. 1995: 3-95.
62. Florence TM. The role of free radicals in disease. *Aust N Z J Ophthalmol*. 1995; 23(1): 3-7.
63. Mansuy D, Sassi A, Dansette PM and et al. A new potent inhibitor of lipid peroxidation invitro and in vivo, the hepatoprotective drug anisylthiolthione, *Biochem Biophys Res Commun*. 1986; 28; 135(3): 1015-1023.
64. Kavas GÖ, Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri*. 1989; 9(1): 1-8.
65. Feeney L, Berman ER. Oxygen Toxicity. Membran damage by free radicals, *Invest Ophthalmol*. 1976; 15(10): 789-792.
66. Michiels C, Raes M, Toussaint O and et al. Importance of Sa-glutathione peroxidase, catalase, Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 1994; 17(3): 235-248.
67. Metin S, Gökmen SS, Ayhan MS ve ark. Streptozotosin (stz) ile diyabet oluşturulmuş ratlarda doku arginaz aktivitesi ve ornitin düzeyindeki değişiklikler. *Türk Biokimya Dergisi*. 2002; 27(4): 129-134.

68. Poli G. Liver damage due to free radicals. *British Med Bulletin*. 1993; 49: 604-620.
69. Aksoy Y. Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *T Klin Tıp Bilimleri*. 2002; 22: 442-448.
70. Placer ZA, Cushman L, Johnson BC. Estimation of products of lipid peroxidation (malonyl dialdehyd) in biological fluids. *Anal Biochem*. 1996; 16: 359-364.
71. Sun Y, Oberley WL, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase, *Clin Chem*. 1988; 34(3): 497-500.
72. Aebi H. Catalase, In vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105: 121-126.
73. Matkovics, B, Szabo, L, Varga, LS. Determination of enzyme activities in lipid peroxidation and glutathione pathways. *Laboral. Diagn*. 1988; 15: 248-249.
74. Sedlak, J, Lindsay, RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem*. 1968; 25:192-205.
75. Lowry, OO, Rosebrough, NJ, Farr, AL and et al. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193: 265-275.
76. Escudié L, Francoz C, Vinel JP and et al. Amanita phalloides poisoning: Reassessment of prognostic factors and indications for emergency liver transplantation. *Journal of Hepatology*. 2007; 46(3), 466-473.
77. H. Faulstich. Mushroom poisoning. *Lancet*. (1980; 2: 794-795.
78. Kaya E, Yılmaz B, Sinirlioglu ZA and et al. Amanitin and phallotoxin concentration in Amanita phalloides var. alba mushroom. *Toxicon*. 2013; 76,: 225-233.
79. Pringle A, Vellinga EC. Using literature to explore the biogeography and invasion biology of the death cap mushroom Amanita phalloides. *Link Biol Invasions*. 2006; 8:1131-1144.
80. Enjalbert F, Rapior S, Soulé JN and et al. Treatment of Amatoxin poisoning: 20-year retrospective analysis. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2002; 40: 715-757.

81. Vogel G, Faulstich H, Kommerel B. The anti-amanita effects of silimarin. In: Vogel G, Faulstich H, Kommerel B. Amanita toxins and poisoning Witzstrock: Baden-Baden. 1980: 232–236.
82. Magdalana J, Ostrowska A, Piotrowskab A and et al. Benzylpenicillin, acetylcysteine and silibinin as antidotes in human hepatocytes intoxicated with a-amanitin. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2010; 62: 367–373.
83. Aksu Ö, Altınterim B. Hepatoprotective effects of artichoke (*Cynara scolymus*). *Tunceli Üniversitesi Bilim ve Gençlik Dergisi*. 2013; 1(2): 44-47.
84. Speroni E, Cervellati R, Govoni P and et al. Efficacy of different *Cynara scolymus* preparations on liver complaints. *Journal of Ethnopharmacol*. 2003; 86(2-3): 203-11.
85. Kewensis, I. Cynarin and chlorogenic acid content in germinanting seeds of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal of Genetic Breeding*. 1992; 46: 63-69.
86. Adzet T, Camarasa J, Carlos Laguna J. Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl₄ toxicity in isolated rat hepatocytes. *Journal of Natural Products*. 1987; 50: 612-617.
87. Mehmetcik G, Ozdemirler G, Toker N and et al. Effect of pretreatment with artichoke extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2008; 60: 475-480.
88. Escrig AJ, Dragsted LO, Daneshvar B and et al. In Vitro Antioxidant Activities of Edible Artichoke (*Cynara scolymus* L.) and Effect on Biomarkers of Antioxidants in Rats. *J. Agric. Food Chem*. 2003; 51: 5540-5545.
89. Gebhardt R. Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1997; 144: 279-286.
90. Küçükgergin C, Aydın AF, Özdemirler G and et al. Effect of Artichoke Leaf Extract on Hepatic and Cardiac Oxidative Stress in Rats. Fed on High Cholesterol Diet. *Biol Trace Elem Res*. 2010; 135:264-274.