

**T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ  
PROJE KESİN RAPORU**

**Proje Başlığı**

Alfa amanitin ile oluşturulmuş karaciğer toksisitesi üzerine nigella sativa ve punica granatum yağının koruyucu etkilerinin araştırılması

**Proje Yürütücüsünün İsmi**

Doç. Dr. Sevil Özger İlhan

**Araştırmacıların İsmi**

Dr. Fatih Sezer

**Proje Kodu**

**Başlama-Bitiş Tarihi**

**Rapor Tarihi**



**T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ  
KESİN RAPOR FORMU**

**İÇİNDEKİLER**

**Sayfa**

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| Proje Özeti.....                            | 3  |
| 1- Projenin Amacı ve Kapsamı.....           | 4  |
| 2- Projenin Materyal ve Yöntemi.....        | 5  |
| 3- Projenin Bulguları.....                  | 6  |
| 4- Projenin Sonucu ve Öneriler.....         | 10 |
| 5- Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkılar..... | 11 |
| 6- Kaynaklar.....                           | 12 |
| 7- Ekler.....                               | 12 |



**T.C.**  
**GAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ**  
**KESİN RAPOR FORMU**

**Proje Adı:** Alfa amanitin ile oluşturulmuş karaciğer toksisitesi üzerine nigella sativa ve punica granatum yağının koruyucu etkilerinin araştırılması

**Proje Özeti:** Mantar zehirlenmeleri ülkemizde özellikle ilkbahar ve sonbahar aylarında sıklıkla karşılaşılan; ölümlere ve organ hasarlarına yol açabilen önemli halk sağlığı sorunlarında biridir. Ülkemizde mantar zehirlenmelerinin büyük kısmından Amanita Falloides türü mantarlar sorumludur. Toksisiteden amatoksinler sorumludur ve en önemlisi alfa amanitindir.

Nigella sativa(çörek otu) dünya genelinde ve ülkemizde sıklıkla kullanılan antiinflamatuvar, antioksidan, immün stimulan bir bitkidir. Punica granatum (nar) Akdeniz ikliminin hakim olduğu ülkelerde ve ülkemizde sıklıkla yetiştirilen antiinflamatuvar, antioksidan bir meyvedir. Yapılması planlanan çalışmada mantar zehirlenmelerinde nigella sativa ve punica granatumun karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Çalışmamızda 36 adet sprague dawley sıçan kullanıldı. Her grup 6 hayvandan oluşmaktaydı. Birinci gruba tek doz ip serum fizyolojik (0.1 ml), diğer 2 gruba ise 7 gün süreyle gavaj ile yağlar (2 ml / kg / gün) verildi. Diğer 3 gruba tek doz ip alfa amanitin (0.3 mg / kg), 2 gruba ise 7 gün süreyle gavajla yağlar(2 ml / kg / gün) verildi. Alfa amanitin verilen her grupta birer hayvan öldü.

Cleaved kaspaz 3 aktivitesi punica granatum(nar) çekirdeği yağı verilen grupta alfa amanitin grubuna göre daha düşük bulundu. Alfa amanitin grubu ile nigella sativa yağı ve alfa amanitin verilen grup arasında anlamlı bir fark yoktu. Bu sonuçlar, nar çekirdeği yağının mantar zehirlenmesinde faydalı olabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Alfa Amanitin, Karaciğer Toksisitesi, Nigella Sativa, Punica Granatum



T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ  
KESİN RAPOR FORMU

**Title:** Investigation of the protective effects of nigella sativa and punica granatum oil on liver toxicity generated by alpha amanitin

**Abstract:** Mushroom poisoning is frequently encountered in Turkey, especially in spring and autumn that is one of the major public health problems that leads to deaths and organ damage. Amanita Falloides is responsible for most of the mushroom poisonings. Amatoxines are responsible for toxicity and the most important is alpha amanitin.

Nigella sativa is an antiinflammatory, antioxidant and immunostimulant plant that is widely used in the world. Punica granatum (pomegranate) is an antiinflammatory, antioxidant substance that is commonly grown in the countries where Mediterranean climate is dominant. In the planned study, it was aimed to examine the protective effect of nigella sativa and punica granatum against liver damage in mushroom poisoning

36 sprague dawley rats were used in our study. Each group consisted of 6 animals. A single dose of ip saline (0.1 ml) was given to the first group and oils (2 ml / kg / day) were given to the other 2 groups by gavage for 7 days. One dose of ip alpha amanitin (0.3 mg / kg) was given to the other 3 groups and oils (2 ml / kg / day) were given to 2 groups by gavage for 7 days. One animal died in each group given alpha amanitin.

Cleaved caspase 3 activity was found to be lower in the group given pomegranate seed oil than the alpha amanitin group. There was no significant difference between the alpha amanitin group and the group given nigella sativa oil and alpha amanitin. These results showed that pomegranate seed oil may be beneficial in mushroom poisoning.

**Keywords:** Alpha Amanitin, Liver Toxicity, Nigella Sativa, Punica Granatum

## 1. Projenin Amacı ve Kapsamı

Doğada bilinen 5000 tür mantardan 100 kadarı insanlar için toksiktir ve Amanita türleri insanlardaki mantar zehirlenmeleri vakalarının büyük kısmından sorumludur.(1) Mantar zehirlenmeleri mantar toplamanın yaygın olduğu Türkiye gibi ülkelerde bitki kaynaklı zehirlenmelerin en sık sebebidir.(2)

Mantar zehirlenmeleri mantarların türüne bağlı olarak hafif gastrointestinal semptomlardan ölüm ve organ yetmezliğine neden olan ciddi sonuçlara kadar uzanabilir.(3) Türkiye’de literatürde yayımlanan ilk mantar zehirlenmesi vakası 1973 yılındadır.(4)

Amanita phalloides dünya genelinde mantar yenilmesini takiben gerçekleşen ölümlerin büyük kısmından sorumludur. (5) Amanita phalloides zehirlenmelerinden amatoksinler sorumludur.(6)

*Nigella sativa*(Çörek otu) bitkisi Ranunculaceae (Düğün çiçeğigiller) ailesinde yer alan; Hindistan Yarımadası'nda, Arap Ülkeleri ve Avrupa'da yetişen; mutfaklarda baharat olarak ve geleneksel tıbbi amaçlı kullanılan yıllık bir bitkidir. (7) *Nigella sativa* bitkisi antiinflamatuvar, antioksidan, immün stimulan, hepatoprotektif özellikler göstermektedir.(8)

*Punica Granatum*(nar) Orta Doğu, Akdeniz iklimine sahip ülkeler, Anadolu coğrafyası, Güney Asya, Orta Asya ve Kuzey Amerika'da üretilen; punica ailesi içerisinde yer alan; çok eski zamanlardan beri yetiştirilen yerel meyveli bitkilerden biridir.(9)

Nar bitkisinin meyvesi, yaprakları, kabuğu, suyu ve çekirdeğinin yağı analjezik, antiinflamatuvar, antioksidan, antikanser, ateroskleroz azaltıcı, antihipertansif, antidiyabetik, antilipidemik, antiviral, immünstimulan, hepatoprotektif, etkiler göstermektedir.(10)

Yapılması planlanan çalışmada ülkemizde sıklıkla görülen mantar zehirlenmelerinde *nigella sativa* ve *punica granatum*un karaciğer hasarına karşı koruyucu etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Projenin Materyal ve Yöntemi

Çalışma 8 haftalık 36 adet Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlar (150-200 gr) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Deney esnasında tüm hayvanlar 12 saat ışık, 12 saat karanlık periyodunda ve 20-24 derece sıcaklıktaki odalarda barındırılmıştır. Deney hayvanları rastgele seçilerek her biri 6 hayvandan oluşan 6 gruba ayrılmıştır.

1. gruba ilk gün kontrol amaçlı intraperitoneal serum fizyolojik(0,1 ml) verilmiştir.
2. gruba kontrol amaçlı 7 gün boyunca gavajla *punica granatum* yağı 2ml/kg/gün verilmiştir.
3. gruba kontrol amaçlı 7 gün boyunca gavajla *nigella sativa* yağı 2ml/kg/gün verilmiştir.
4. gruba alfa amanitine ilave olarak 7 gün boyunca gavajla *nigella sativa* yağı 2 ml/kg/gün verilmiştir.
5. gruba alfa amanitine ilave olarak 7 gün boyunca gavajla *punica granatum* yağı 2 ml/kg/gün,
6. gruba toksisite oluşturmak amacıyla ilk gün tek doz alfa amanitin 3 mg/kg intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

Hayvanların ağırlıkları uygulamalar öncesinde tartılmıştır.

8. gün tüm hayvanlar ketamin ve ksilazin(70 mg/kg ip ve 10 mg/kg ip) anestezisi altında kalp kanı alınarak sakrifiye edilmiştir. Hayvanlardan kan ve karaciğer dokusu örnekleri alınmıştır. Kan örnekleri santrifüj edilerek serum elde edilmiş ve elde edilen serum ependorflara alınarak -80 derecede incelemeler yapılana kadar saklanmıştır.

Karaciğer hasarı için ratlardan alınan kandan elde edilen serumda ticari Elisa kitleri kullanılarak ALT, AST değerleri ölçülmüştür. Oksidatif stresi değerlendirmek için serumdaki TNF $\alpha$  ve IL-6 değerleri ticari Elisa kitleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Elisa ölçümleri için serumdaki protein standardizasyonu yapılmıştır.

Alınan serum örneklerinden otoanalizör yardımıyla ALT, AST, ALP ve total protein seviyelerine de bakılmıştır.

Karaciğer sağ üst lobdan alınan dokunun küçük bir kısmı serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra western blot işlemi yapılmak üzere ependorf tüplerine alınmış ve inceleme yapılmak üzere -80 derecede saklanmıştır. Deneyin yapıldığı gün 100 mg karaciğer dokusu alınarak, buz üzerinde bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldıktan sonra 1000 µl RIPA (parçalama) çözeltisi ile 10 µl proteinaz inhibitör kokteyli eklenerek homojenizatör yardımıyla 10 sn boyunca buz üzerinde parçalandıktan sonra, örnekler +4 °C’de, 20 dakika 12.000 rpm’ de santrifüj edilecek ve üst kısım bir başka mikrosantrifüj tüpüne aktarılarak doku örneklerinden protein izole edilmiştir. Elde edilen protein lizatlarından, total protein miktarı BCA Protein Assay kiti kullanılarak ölçülmüştür. Cleaved Caspase 3 protein düzeyleri Western Blot (WB) yöntemiyle belirlenmiş ve housekeeping protein olarak GAPDH proteini kullanılmıştır. Karaciğer dokusundaki hücre hasarı ve apoptotik süreçleri değerlendirmek için Western Blot yöntemiyle cleaved caspase 3 değerlerine bakılmıştır.

Karaciğer dokusu sağ üst loblardan alınarak bir kısmı histopatolojik incelemeler için ayrılmış; %10 formaldehit içerek solüsyona konularak fiske edilmiş ve Patoloji Anabilim Dalı’na gönderilmiştir. Dokular hematoksilin eozin ile ışık mikroskopunda hücre hasarı açısından incelenecektir. Karaciğerde dejenerasyon, steatoz, apoptoz, nekroz oluşumu skorlanarak değerlendirilecektir. Histopatolojik incelemelere başlanılmış ve sonuçlar tamamlanmak üzeredir.

### 3. Projenin Bulguları

#### a. Elisa Sonuçları

Serum örneklerinde yapılan ELİSA incelemesinde alfa amanitin verilen gruptaki TNF alfa düzeylerinin serum fizyolojik verilen gruptan anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür.(p değeri 0.01)

#### *TNF Alfa seviyeleri(pg/mL)*

|                                           | <b>TNF-<math>\alpha</math></b> |
|-------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>1. GRUP(SF)</b>                        | 199,18                         |
| <b>2. GRUP(NÇY)</b>                       | 372,41                         |
| <b>3. GRUP(ÇÖY)</b>                       | 272,57                         |
| <b>4. GRUP(<math>\alpha</math>-A+ÇÖY)</b> | 173,80                         |
| <b>5. GRUP(<math>\alpha</math>-A+NÇY)</b> | 184,23                         |
| <b>6. GRUP(<math>\alpha</math>-A)</b>     | 64,84                          |

Serum örneklerinde yapılan ELİSA incelemesinde alfa amanitin verilen gruptaki IL-6 düzeyleri serum fizyolojik verilen gruptan yüksek çıkmıştır; ancak anlamlı fark olmadığı görülmüştür.(p değeri 0.07)

Çörek otu yağı ve nar çekirdeği yağı verilen gruplarda IL-6 seviyelerinin verilmeyen gruplara göre yüksek olduğu; alfa amanitin verilmeyen gruplarda bu yüksekliğin anlamlı olduğu(p<0.05), alfa amanitin verilen gruplarda ise bu yüksekliğin anlamlı olmadığı görülmüştür.(p>0.05)

**IL-6 Seviyeleri(pg/mL)**

|                                           | <b>IL-6</b> |
|-------------------------------------------|-------------|
| <b>1. GRUP(SF)</b>                        | 1295,07     |
| <b>2. GRUP(NÇY)</b>                       | 2375,24     |
| <b>3. GRUP(ÇÖY)</b>                       | 2872,87     |
| <b>4. GRUP(<math>\alpha</math>-A+ÇÖY)</b> | 2675,82     |
| <b>5. GRUP(<math>\alpha</math>-A+NÇY)</b> | 3726,31     |
| <b>6. GRUP(<math>\alpha</math>-A)</b>     | 1451,20     |

Serum örneklerinde yapılan ELİSA incelemesinde alfa amanitin verilen gruptaki ALT düzeylerinin serum fizyolojik verilen gruptan anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür.(p değeri 0.017)

**ALT Seviyeleri(nmol/min/ml = mU/ml)**

|                                           | <b>ALT(30-60 dakika)</b> | <b>ALT(0-60 dakika)</b> | <b>Ortalama</b> |
|-------------------------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------|
| <b>1. GRUP(SF)</b>                        | 11,12                    | 8,14                    | 9,63            |
| <b>2. GRUP(NÇY)</b>                       | 12,20                    | 9,89                    | 11,05           |
| <b>3. GRUP(ÇÖY)</b>                       | 11,14                    | 9,71                    | 10,42           |
| <b>4. GRUP(<math>\alpha</math>-A+ÇÖY)</b> | 10,33                    | 7,98                    | 9,15            |
| <b>5. GRUP(<math>\alpha</math>-A+NÇY)</b> | 12,23                    | 10,05                   | 11,14           |
| <b>6. GRUP(<math>\alpha</math>-A)</b>     | 8,67                     | 6,32                    | 7,50            |

Serum örneklerinde yapılan ELİSA incelemesinde alfa amanitin verilen gruptaki AST düzeylerinin serum fizyolojik verilen gruptan düşük olduğu ancak bu düşüklüğün anlamlı olmadığı görülmüştür.(p değeri 0.12)

**AST Seviyeleri(nmol/min/ml = mU/ml)**

|                                           | <b>AST(30-60 dakika)</b> | <b>AST(0-60 dakika)</b> | <b>Ortalama</b> |
|-------------------------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------|
| <b>1. GRUP(SF)</b>                        | 4,14                     | 4,74                    | 4,44            |
| <b>2. GRUP(NÇY)</b>                       | 4,33                     | 4,96                    | 4,64            |
| <b>3. GRUP(ÇÖY)</b>                       | 4,30                     | 5,29                    | 4,79            |
| <b>4. GRUP(<math>\alpha</math>-A+ÇÖY)</b> | 4,46                     | 4,79                    | 4,62            |
| <b>5. GRUP(<math>\alpha</math>-A+NÇY)</b> | 4,60                     | 5,11                    | 4,86            |
| <b>6. GRUP(<math>\alpha</math>-A)</b>     | 3,83                     | 4,40                    | 4,11            |

ALT ve AST düzeylerinin alfa amanitin verilen gruplarda kontrol gruplarına (serum fizyolojik) göre daha düşük çıkması üzerine toksisite oluşturulup oluşturulmadığını değerlendirme ve ELİSA kitlerinin sonuçlarını teyit etmek için otoanalizörle serum örneklerinin yeniden çalışılmasına karar verilmiştir.

### **b. Otoanalizör Sonuçları**

Otoanalizör ile ALT, AST, ALP ve total protein seviyeleri incelenmiştir. Serum örneklerinde hemoliz görülmesi ve elde edilen sonuçların gruptaki diğer örneklerden belirgin sapmalar göstermesi nedeniyle 1. Gruptaki 2 nolu örnek çalışmadan çıkarılmıştır.

ALT ve AST değerlerinin ELİSA sonuçlarıyla benzer şekilde alfa amanitin gruplarında serum fizyolojik gruplarına göre daha düşük olduğu görülmüştür. (p değeri ALT ve AST için 0.25)

Total protein düzeylerinin serum fizyolojik verilen gruba göre sadece alfa amanitin verilen grupta anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür. (p değeri 0.01) Bu sonuçla verilen alfa amanitin toksik etki gösterdiği kanaatine varılmış ve diğer incelemelere geçilmiştir. Çünkü alfa amanitin temel etki mekanizması enzimatik ve yapısal protein sentezlerini geri dönüşsüz olarak inhibe etmek olduğunda alfa amanitin toksisitesinin göstergelerinden biri total protein seviyelerindeki düşüklüktür. (11)

Alfa amanitine ilave olarak çörek otu yağı ve nar çekirdeği yağı verilen gruplarda total protein düzeylerinin sadece alfa amanitin verilen gruplara göre anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür. (p değeri çörek otu yağı ve nar çekirdeği yağı grupları için 0.03)

|                                           | ALT(U/L) | AST(U/L) | ALP (U/L) | Total Protein(g/dL) |
|-------------------------------------------|----------|----------|-----------|---------------------|
| <b>1. GRUP(SF)</b>                        | 52,20    | 130,00   | 312,20    | 6,04                |
| <b>2. GRUP(NÇY)</b>                       | 65,00    | 156,17   | 485,83    | 6,17                |
| <b>3. GRUP(ÇÖY)</b>                       | 56,50    | 143,67   | 411,17    | 6,22                |
| <b>4. GRUP(<math>\alpha</math>-A+ÇÖY)</b> | 52,40    | 127,60   | 394,20    | 6,26                |
| <b>5. GRUP(<math>\alpha</math>-A+NÇY)</b> | 69,80    | 179,00   | 426,80    | 6,09                |
| <b>6. GRUP(<math>\alpha</math>-A)</b>     | 47,20    | 106,20   | 347,00    | 5,50                |

### **c. Western Blot Sonuçları**

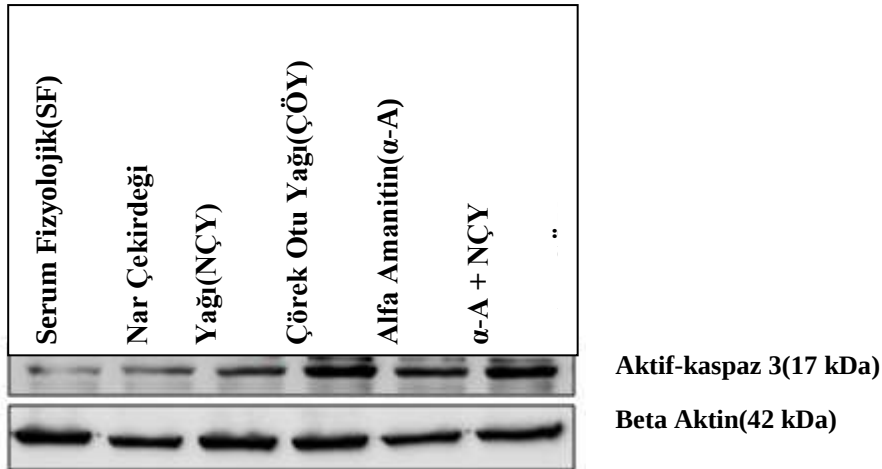
Yapılan western blot işlemi sonucunda cleaved caspase 3 aktivitesinin alfa amanitin verilmeyen gruplar arasında anlamlı farklılık oluşturmadığı görülmüştür. (p değeri nar çekirdeği yağı için 0.68; çörek otu yağı için 0.20)

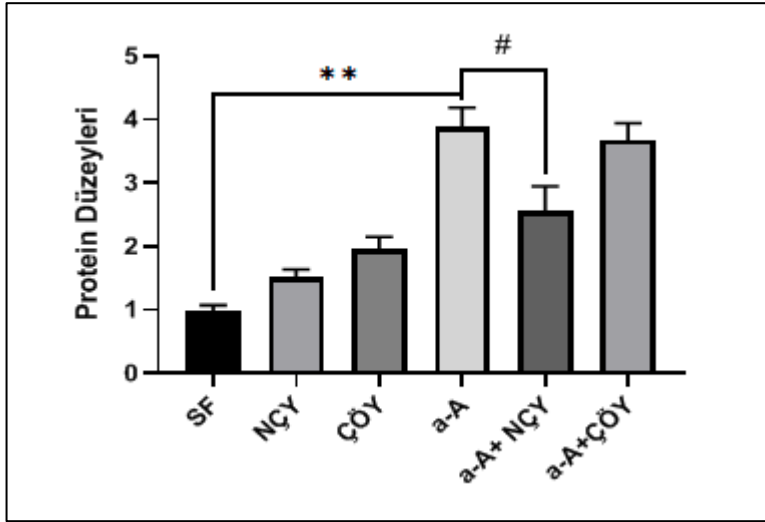
Alfa amanitin verilen gruptaki cleaved caspase 3 aktivitesi serum fizyolojik verilen kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksektir (p değeri 0.01) Bu durum verilen alfa amanitin ile toksisite

oluşturulduğuna işaret etmektedir otoanalizördeki total protein ölçüm sonuçlarını destekler niteliktedir.

Alfa amanitin verilen gruplarda ise alfa amanitin ile alfa amanitin ve çörek otu yağı verilen grup arasında fark olmadığı(p değeri 0.98); alfa amanitin ile alfa amanitin ve nar çekirdeği yağı verilen grup arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür.(p değeri 0.03)

| Tukey's Multiple Comparisons Test                           | Anlamlı Fark | P değeri      |
|-------------------------------------------------------------|--------------|---------------|
| SF vs. NÇY                                                  | YOK          | 0,6855        |
| SF vs. ÇÖY                                                  | YOK          | 0,2063        |
| <b>SF vs. <math>\alpha</math>-A</b>                         | <b>VAR</b>   | <b>0,0015</b> |
| SF vs. $\alpha$ -A+ NÇY                                     | VAR          | 0,0336        |
| SF vs. $\alpha$ -A+ÇÖY                                      | VAR          | 0,0023        |
| NÇY vs. ÇÖY                                                 | YOK          | 0,8186        |
| NÇY vs. $\alpha$ -A                                         | VAR          | 0,0046        |
| NÇY vs. $\alpha$ -A+ NÇY                                    | YOK          | 0,1682        |
| NÇY vs. $\alpha$ -A+ÇÖY                                     | VAR          | 0,0074        |
| ÇÖY vs. $\alpha$ -A                                         | VAR          | 0,0129        |
| ÇÖY vs. $\alpha$ -A+ NÇY                                    | YOK          | 0,5923        |
| ÇÖY vs. $\alpha$ -A+ÇÖY                                     | VAR          | 0,0222        |
| <b><math>\alpha</math>-A vs. <math>\alpha</math>-A+ NÇY</b> | <b>VAR</b>   | <b>0,0381</b> |
| $\alpha$ -A vs. $\alpha$ -A+ÇÖY                             | YOK          | 0,9889        |
| $\alpha$ -A+ NÇY vs. $\alpha$ -A+ÇÖY                        | YOK          | 0,1292        |





**\*\*p<0.01; SF grubuna göre**

**#p<0.05; a-A grubuna göre**

**Tek yönlü ANOVA post hoc Tukey Testi**

*GraphPad Prism Version 8.0.2*

#### **d. Histopatolojik İncelemeler**

Karaciğer dokularının Patoloji Anabilim Dalı'nda incelenmesine başlanılmış ve sonuçlar tamamlanmak üzeredir.

#### **4. Projenin Sonucu ve Öneriler**

Proje için 04.05.2018 tarihinde Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri başvurusu yapılmıştır. Onay alındıktan sonra ilk talep formları 27.07.2018 tarihinde verilmiştir. Talep edilen malzemelerin temini 17.12.2018 tarihinde tamamlanabilmiştir. Aralık ayında deney gruplarına başlanmış, 6 gruptan oluşan 36 hayvan üzerinde yapılan çalışmalar 2019 yılının Mayıs ayı başında tamamlanabilmiştir.

Elde edilen kan ve doku örneklerinin çalışılması, patoloji örneklerinin hazırlanarak okunabilmesi ve verilerin analizi için 6 ay ek süre talebinde bulunulmuş ve bu talep kabul edilmiştir.

Serum örneklerinde yapılan incelemelerde, Aralık 2018 tarihinde serum fizyolojik uygulaması yapılan 1 numaralı negatif kontrol grubunun karaciğer hasarı göstergelerinin (ALT, AST düzeyleri), Mayıs 2019 tarihinde alfa amanitin uygulanan 6 numaralı pozitif kontrol grubunun ALT, AST düzeylerinden düşük olduğu görülmüştür.

Alfa amanitin uygulanan 6 numaralı hayvan grubunun karaciğer enzimlerinin serum fizyolojik uygulanan 1 numaralı hayvan grubunun karaciğer enzimlerinden daha düşük olması deney hayvanları arasında standardizasyon sorunları olduğunu düşündürmüştür. Elisa sonuçları

elde edildikten sonra negatif ve pozitif kontrol grupları arasında beklenen sonuçlar elde edilemediğinden sarf malzemeleri BAP aracılığı ile temin edilen Western Blot işlemlerine başlanılmamıştır.

İstenilen tür(Sprague Dawley), cinsiyet(erkek) ve kilodaki(150-200gram) deney hayvanlarının çok uzun sürede(5 ay) temin edilebilmesi ve kontrol grupları arasında beklenenin aksi yönde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunması nedeniyle deneyin tekrarlanması planlanmış ve ek bütçe talep edilmiştir. Ancak Bilimsel Araştırma Projeleri(BAP) proje süresi bitmiş olduğundan ek bütçe ve malzeme verilmesinin uygun olmadığına karar vermiştir.

Ek bütçe talebinin kabul edilmemesi üzerine 6 numaralı hayvan grubunda yapılan işlemlerin dış merkezde kendi imkanlarımız ile yenilenmesi planlanmıştır. 20.12.2019 tarihinde Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan 6 adet Sprague Dawley rat talep edilmiş ancak talebimiz reddedilmiştir.

Ek bütçe talebinin kabul edilmemesi ve hayvan talebimizin reddedilmesi üzerine elde edilen serum örnekleri Biyokimya Laboratuvarında otoanalizörde ALT, AST, ALP ve total protein değerleri çalışılmıştır. ALT ve AST değerleri daha önce çalışılan ELİSA sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Total protein değerleri ise literatür bulguları(11) ile uyumlu olarak alfa amanitin verilen grupta düşük; serum fizyolojik, nigella sativa yağı ve punica granatum yağı verilen gruplarda yüksek bulunmuştur.

Bu sonuçlarla alfa amanitin verilen gruplarda toksisiteye bağlı karaciğer hücrelerinin yıkıma uğradığı ve buna bağlı olarak örnek alınan günde karaciğer hasar enzimlerinin düşük çıktığı düşünülmüştür. Alfa amanitine ilave olarak yağ verilen gruplarda total protein düzeylerinde anlamlı olarak yükselme görülmüştür.

Bu sonuçlar sonrasında western blot işlemine başlanılmıştır. Western blot işlemi sonucunda alfa amanitin verilmeyen gruplar arasında cleaved caspase 3 aktivitesinin anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Alfa amanitin verilen gruptaki cleaved caspase 3 aktivitesi serum fizyolojik verilen kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksektir. Bu durum verilen alfa amanitin ile toksisite oluşturulduğuna işaret etmektedir.

Alfa amanitin verilen gruplarda ise alfa amanitin ile alfa amanitin ve çörek otu yağı verilen grup arasında fark olmadığı; alfa amanitin ile alfa amanitin ve nar çekirdeği yağı verilen grup arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür.(p değeri 0.03)

## **5. Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkıları**

Yapılan çalışmada cleaved kaspaz 3 aktivitesi punica granatum(nar) çekirdeği yağı verilen grupta alfa amanitin grubuna göre daha düşük bulunmuş; nigella sativa yağı verilen grup ile alfa amanitin verilen grup arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır.

Amanita Phalloides türü mantarlarda bulunan alfa amanitin karaciğere alınması organik anyon taşıyıcı polipeptidler(OATP) ile gerçekleştirilmektedir.(6) Tedavide kullanılan silibinin maddesi de OATP inhibisyonu ile toksinin karaciğere taşınmasını azaltarak etki

göstermektedir. (12) Narın karaciğerde yer alan organik anyon taşıyıcı polipeptidelerin taşınımını inhibe ettiği tespit edilmiştir.(13)

Çalışmanın sonucunda nar çekirdeği yağının mantar zehirlenmesinde faydalı olabileceği gösterilmiştir. Narın içerdiği bazı maddelerin gelecekte *Amanita phalloides* türü mantar zehirlenmelerinin tedavisinde kullanılabileceği düşünülmüştür.

## 6. Kaynaklar

1. Berger KJ, Guss DA. Mycotoxins revisited: Part I. The Journal of emergency medicine. 2005;28(1):53-62.
2. Smith MR, Davis RL. Mycetismus: a review. Gastroenterology report. 2016;4(2):107-12.
3. Eren SH, Demirel Y, Ugurlu S, Korkmaz I, Aktas C, Güven FM. Mushroom poisoning: retrospective analysis of 294 cases. Clinics (Sao Paulo, Brazil). 2010;65(5):491-6.
4. Kaygusuz O, Gezer K, Çelik A, Dursun B. Mushroom poisoning of death cap (*Amanita phalloides*) from Denizli (Turkey). BioDiCon. 2013;6(2):22-5.
5. Vo KT, Montgomery ME, Mitchell ST, Scheerlinck PH, Colby DK, Meier KH, et al. *Amanita phalloides* Mushroom Poisonings - Northern California, December 2016. MMWR Morbidity and mortality weekly report. 2017;66(21):549-53.
6. Letschert K, Faulstich H, Keller D, Keppler D. Molecular characterization and inhibition of amanitin uptake into human hepatocytes. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology. 2006;91(1):140-9.
7. Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. Phytotherapy research : PTR. 2003;17(4):299-305.
8. Yimer EM, Tuem KB. *Nigella sativa* L. (Black Cumin): A Promising Natural Remedy for Wide Range of Illnesses. 2019;2019:1528635.
9. Shaygannia E, Bahmani M, Zamanzad B, Rafieian-Kopaei M. A Review Study on *Punica granatum* L. Journal of evidence-based complementary & alternative medicine. 2016;21(3):221-7.
10. Johanningsmeier SD, Harris GK. Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. Annual review of food science and technology. 2011;2:181-201.
11. Magdalan J, Ostrowska A, Podhorska-Okotów M, Piotrowska A, Izykowska I, Nowak M, et al. Early morphological and functional alterations in canine hepatocytes due to alpha-amanitin, a major toxin of *Amanita phalloides*. Archives of toxicology. 2009;83(1):55-60.
12. Mengs U, Pohl RT, Mitchell T. Legalon® SIL: the antidote of choice in patients with acute hepatotoxicity from amatoxin poisoning. Current pharmaceutical biotechnology. 2012;13(10):1964-70.
13. Ali Y, Shams T, Wang K, Cheng Z, Li Y, Shu W, et al. The involvement of human organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug-herb/food interactions. 2020;15:71.

## 7. Ekler

-Proje Bütçesi