



T. C
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

***Amanita phalloides* EKSTRAKLARININ ANTİMİKROBİYAL
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sabire KARAYAKALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Nuri Cenk COŞKUN

İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Ertuğrul KAYA

DÜZCE, 2022

BEYAN

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

31/12/2021

Sabire KARAYAKALI

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminin boyunca desteği ve hoşgörüsünü her zaman hissettiğim ve tez çalışmamda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nuri Cenk COŞKUN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam için gerekli mantar materyalini temin eden ve bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum ikinci tez danışmanım Prof. Dr. Ertuğrul KAYA'ya ve gerekli mikroorganizmaları temin etmemde yardımcı olan ve bilgi ve tecrübelerinden yararlanma fırsatı bulduğum Doç. Dr. Emel ÇALIŐKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda bana yardımcı olan Düzce Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çalışan asistan doktorlarımıza, Düzce Üniversitesi GETAT çalışanlarına ve doktora öğrencilerine teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca desteğini ve sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen anneme teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 2019.04.03.1018 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Sabire KARAYAKALI

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	İ
RESİM LİSTESİ	İV
TABLO LİSTESİ	V
ŞEKİL LİSTESİ	VI
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ	VII
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. <i>Amanita</i> Cinsi Mantarlar	5
2.2. <i>Amanita phalloides</i>	6
2.2.1. Taksonomi.....	6
2.2.2. Tanımlama	7
2.2.3. Dağılım ve habitat	8
2.2.4. <i>Amanita phalloides</i> toksisitesi ve tedavisi.....	8
2.3. <i>Amanita phalloides</i> Toksinleri.....	11
2.3.1. Amatoksinler	12
2.3.2. Phallotoksinler	18
2.3.3. Virotoksinler	20
2.4. <i>Amanita phalloides</i> Toksinlerinin Analiz Yöntemleri	21
2.5. Antimikrobiyal Tedavi İlkeleri	22
2.5.1. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları	23
2.5.2. Antibiyotik direncinin ortak mekanizmaları	26
2.6. Antimikrobiyal Etki Çalışmalarında Kullanılan Mikroorganizmalar	27
2.6.1. Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>	27
2.6.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	28
2.6.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
2.6.4. <i>Escherichia coli</i>	28
2.6.5. <i>Enterococcus faecalis</i>	29
2.6.6. <i>Candida albicans</i>	29
2.6.7. <i>Candida parapsilosis</i>	29
3. GEREÇ ve YÖNTEM	31
3.1. Gereç.....	31
3.1.1. Mantar numunesi.....	31
3.1.2. Kullanılan test mikroorganizmaları.....	31
3.1.3. Laboratuvar koşulları	31
3.1.4. Kullanılan kimyasallar	31
3.1.5. Cihazlar ve teknik materyaller	32
3.2. Yöntem.....	32
3.2.1. Mantar ekstraktının hazırlanışı.....	32
3.2.2. Ekstraksiyon verimi	35
3.2.3. Antimikrobiyal aktivite tayini	35
3.2.4. <i>Amanita phalloides</i> ekstraktlarında alfa ve beta amanitin tayini.....	36

4. BULGULAR	38
4.1. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları	38
4.2. <i>Amanita phalloides</i> Ekstraktlarında Alfa ve Beta Amanitin Tayini Bulguları.....	46
4.2.1. Alfa ve beta amanitin tayini	46
4.2.2. Alfa ve beta amanitin miktar analizi	47
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	49
6. SONUÇ	54
7. KAYNAKLAR	55
8. ÖZGEÇMİŞ	60



RESİM LİSTESİ

Resim 2.1. <i>Amanita phalloides</i> ¹²	6
Resim 3.1. Çalkalamalı etüv	33
Resim 3.2. Filtrelenen ekstraktlar	34
Resim 3.3. Rotary evoparatör	34
Resim 3.4. Liyofilizatör	34
Resim 3.5. Çalışmada kullanılan HPLC cihazı	37
Resim 4.1. <i>MSSA</i> (ATCC 29213) türüne karşı bitki ekstraktlarının, negatif ve pozitif kontrollerin inhibisyon zonları	38
Resim 4.2. <i>MRSA</i> (ATCC 43300) türüne karşı bitki ekstraktlarının, negatif ve pozitif kontrollerin inhibisyon zonları	39
Resim 4.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (klinik izolat) türüne karşı bitki ekstraktlarının, negatif ve pozitif kontrollerin inhibisyon zonları	39
Resim 4.4. <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212) türüne karşı bitki ekstraktlarının, negatif ve pozitif kontrollerin inhibisyon zonları	40
Resim 4.5. <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) türüne karşı bitki ekstraktlarının, negatif ve pozitif kontrollerin inhibisyon zonları	40
Resim 4.6. <i>Candida albicans</i> (klinik izolat) türüne karşı bitki ekstraktlarının, negatif ve pozitif kontrollerin inhibisyon zonları	41
Resim 4.7. <i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019) türüne karşı bitki ekstraktlarının, negatif ve pozitif kontrollerin inhibisyon zonları	41

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Amatoksin zehirlenmesinin klinik özellikleri ^{11,25}	9
Tablo 2.2. Kemoterapiklerin etki mekanizmalarına göre gruplandırılması ve bazı örnekler ⁹	25
Tablo 2.3. Mikroorganizmalarda antibiyotik direnç mekanizmaları ^{4,9}	27
Tablo 4.1. <i>Amanita phalloides</i> mantarının antimikrobiyal aktivitesi	42
Tablo 4.2. Metanol ve distile su ile hazırlanan ekstrele ait alfa ve beta amanitin dalgalarının tutulma zamanı.	47
Tablo 4.3. Mantar ekstrelerindeki alfa ve beta amanitin miktarı (mg/ml)	48



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Amatoksinlerin kimyasal yapısı ^{24,26,29,44}	14
Şekil 2.2. α -amanitin ile kompleks halinde 10 alt birim RNA polimeraz II'nin kristal yapısı ²⁵	16
Şekil 2.3. Phallotoksinlerin kimyasal yapısı ^{26,29,44}	19
Şekil 2.4. Virotoksinlerin kimyasal yapısı ^{25,26}	21
Şekil 4.1. <i>A. phalloides</i> ekstraktlarının Metisilin Direçli <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)'a karşı inhibisyon zon çapları	44
Şekil 4.2. <i>A. phalloides</i> ekstraktlarının Metisilin Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)'a karşı inhibisyon zon çapları	44
Şekil 4.3. <i>A. phalloides</i> ekstraktlarının <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'ya karşı inhibisyon zon çapları	45
Şekil 4.4. <i>A. phalloides</i> ekstraktlarının <i>Escherichia coli</i> 'ye karşı inhibisyon zon çapları	45
Şekil 4.5. <i>A. phalloides</i> ekstraktlarının <i>Enterococcus faecalis</i> 'e karşı inhibisyon zon çapları	46
Şekil 4.6. SE1'e ait kromatogram	47



KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

A	Aseton
ADC	Antikor-İlaç Konjugatları
AE	Aseton Ekstraktı 150 mg/ml
CFU	Colony Forming Unit
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Institute
DNA	Deoksiribonükleikasit
DÜGETAM	Düzce Üniversitesi Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GİS	Gastrointestinal Sistem
HPLC	Yüksek Basınçlı (Performanslı) Sıvı Kromatografisi
HPTLC	Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi
ip	İntraperitoneal
K	Kloroform
KE	Kloroform Ekstraktı 150 mg/ml
LC	Sıvı Kromatografisi
LC-MS	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometre
LC/ESI-TOF-MS	Sıvı Kromatografisi- Elektrosprey İyonizasyon Uçuş Süresi- Kütle Spektrometrisi
LD ₅₀	Lethal Doz
M	Metanol
MDR	Çoklu İlaç Direnci
ME	Metanol Ekstarktı 150 mg/ml
mg	Miligram
MHA	Mueller-Hinton Agar
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
ml	Mililitre
MRSA	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin Susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Kütle Spektrometrisi
ng	Nanogram

RNA	Ribonükleik Asit
RP-HPLC	Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
S	Distile su
SE1	Distile Su Ekstarktı 150 mg/ml
SE2	Distile Su Ekstarktı 300 mg/ml
SE3	Distile Su Ekstarktı 600 mg/ml
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
UV	Ultraviöle
μL	Mikrolitre
μg	Mikrogram
ρg	Pikogram



ÖZET

Amanita phalloides EKSTRAKTLARININ ANTİMİKROBİYAL ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Sabire KARAYAKALI

Yüksek Lisans Tezi, Farmakoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Nuri Cenk COŞKUN
Ocak 2022,60 sayfa

En zehirli mantar türlerinden olan *Amanita phalloides* isimli şapkalı mantar türünün kloroform, aseton, metanol ve distile su ile hazırlanan ekstraktlarının, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, Metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA), *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) türlerine karşı antimikrobiyal etkisi araştırıldı. Yöntem olarak in vitro disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Bulgulara göre; en yüksek antibakteriyel aktivitesi MRSA ve MSSA türlerine karşı bulunmakla birlikte diğer bakterilere karşı da farklı seviyelerde antibakteriyel aktivite gösterdiği saptandı. Sonuç olarak; sadece *Amanita phalloides*'in distile su ile hazırlanan ekstraktının bakterilere karşı etkisi olduğu fakat antifungal etki göstermediği saptandı.

Anahtar Kelimeler: *Amanita phalloides*, Antibakteriyel, Disk difüzyon, Ekstrakt, MRSA

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF *Amanita phalloides* EXTRACTS

Sabire KARAYAKALI

Master of Science, Department of Pharmacology

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Nuri Cenk COŞKUN

Ocak 2022, 60 pages

The antimicrobial effect of *Amanita phalloides* extracts, one of the most poisonous mushroom species, prepared with chloroform, acetone, methanol and distilled water were investigated against *Candida parapsilosis*, *Candida albicans*, Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA), *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) species. In vitro disc diffusion method was used as a method. According to the findings; While the highest antibacterial activity was against MRSA and MSSA species, it was determined that it showed different levels of antibacterial activity against other bacteria. As a result; It was determined that only the extract of *Amanita phalloides* prepared with distilled water had an effect against bacteria but did not show an antifungal effect.

Key Words :*Amanita phalloides*, Antibacterial, Disc diffusion, Extract, MRSA

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Antibiyotikler, mikrobiyal enfeksiyonlar ile mücadelede temel tedavi kaynağıdır¹. Ülkemizde kullanılan ilaçlar arasında antibiyotikler ilk sırada yer alır². Günümüzde çeşitli antibiyotiklerin toplumda tüketiminin, immun sistemi zayıflamış hastaların sayısının ve yoğun bakım ünitelerinin sayısının artması ile gıda ve hayvancılık endüstrisinde antibiyotik kullanılması gibi nedenlerle mikroorganizmalardaki antibiyotik direnci giderek artmaktadır^{3,4}. Antibiyotik direnci; bir mikroorganizma türünün bazı suşlarının antibiyotikten etkilenmemesi ya da antibiyotiğe duyarlı bir suşun çeşitli direnç mekanizmalarından biri ile dirençli hale gelmesi olarak tanımlanmaktadır. Direnç gelişmesi tedaviyi güçleştirmekte ve başta mortalite ve morbidite artışı ile birlikte ekonomik kayba neden olmaktadır². Antibiyotiklere karşı direncin artması ve yayılması bireyleri ve toplumu tehdit eden enfeksiyonların riskini daha da arttırmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan rapora göre antibakteriyel direnç nedeniyle her yıl, 2050 yılına kadar 10 milyon insanın hayatını kaybedeceği bildirilmiştir. Antimikrobiyal direnç yakın gelecekteki en büyük tehditlerden biri olarak kabul edilmektedir. Yeni antibakteriyel ilaçların geliştirilmesi, bu sorunun üstesinden gelmenin temel taşlarından biri olarak kabul edilmektedir^{5,6}.

Doğal ürünler, 20. yüzyılın ortalarındaki antibiyotiklerin altın çağından bu yana patojenik bakterilere karşı güçlü terapötikler olarak hizmet etmektedir⁴. Mantarların tedavi edici özellikleri binlerce yıldır insanlar tarafından bilinmektedir. Bazı mantar türleri içerdikleri bileşenler sayesinde antitümör, bağışıklık düzenleyici, kardiyovasküler ve antimikrobiyal özelliğe sahiptirler^{6,7}. Mantarlar protein, polisakkarit bileşikleri (polisakkarit-K, polisakkaritpeptid ve lentinan), ikincil metabolitler (terpenler, alkaloidler ve laktonlar) ve enzimler (lakkaz, glukozoksidaz ve peroksidaz) gibi terapötik özelliğe sahip birçok karmaşık madde içerirler⁷. Makrofungusların antimikrobiyal etkileri; fungal yapıda sentezlenen ve çoğunlukla organizmaya özgü bazı fenolik bileşikler, pürinler, primidinler, kinonlar, terpenoidler ve fenilproponoid türevi gibi antagonistik maddelerden kaynaklanmaktadır^{7,8}. Antimikrobiyal etki mekanizmaları ise; hücre duvarı biyosentezinin inhibe edilmesi ve litik enzimlerin aktive edilmesi, sitoplazma membranının permeabilitesinin artırılması, protein

sentezinin engellenmesi, DNA replikasyonunun engellenmesi veya DNA kontrolündeki mRNA sentezinin bozulması, intermediyer metabolizmayı bozmak şeklinde beş grup halinde belirtilir^{4,9}. Kullanılan antibiyotiklerin pek çoğu mikrofunguslardan ve aktinomisetlerden izole edilerek hazırlanmaktadır. Ülkemizde makrofungusların tespitine yönelik çalışmaların yanısıra onların farmakolojik, endüstriyel ve tıbbi özelliklerinin de ortaya çıkarılması gerekmektedir⁸. Mantarların antimikrobiyal etkinliklerinin araştırılarak yeni antimikrobiyal ajanların keşfedilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır⁶.

Dünyanın birçok bölgesinde ve ülkemizde bol miktarda yetişen *Amanita phalloides* mantarı ölümcül mantar zehirlenme vakalarının % 95'den fazlasından sorumludur¹⁰. Ülkemizde köygöçüren, evcik yıkan, yeşil şeytan; dünyada ise "Death Cap" veya "White Cap" gibi isimlerle bilinen bu mantarda toksisiteden sorumlu 3 grup toksin tanımlanmıştır. Bunlar amatoksinler, phallotoksinler ve virotoksinler olarak adlandırılmıştır¹¹⁻¹³. Hücrelerde protein sentezinin ilk basamağı olan transkripsiyonu RNA polimeraz enzimi gerçekleştirir. Bu enzimin üç türü RNA polimeraz I,II ve III olarak vardır. Ökaryotik hücrelerde RNA polimeraz II enzimi bu görevi gerçekleştirir. Amatoksin grubundan olan alfa amanitin bu enzimin spesifik inhibitörüdür ve protein sentezini inhibe etmesi sonucu hücrelerin bir süre sonra ölümüne sebep olur¹⁴. Bu nedenle alfa amanitin antiparaziter veya antifungal ilaç olarak değerli olabilir¹⁰.

Bu çalışmamızda ki amacımız; *Amanita phalloides* mantarının farklı çözücülerdeki ekstraktlarının disk difüzyon metodu ile antimikrobiyal etkinliğinin araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

Mantarlar, tedavi edici değeri olan bazı özel bileşenler içerir ve eski çağlardan beri insan hastalıklarına çare olarak kullanılmıştır¹⁵. Gıda ve ilaç endüstrilerinin birçok alanında büyük ilgi görmektedirler. Dünya çapında mantar çeşitliliği yaklaşık olarak 0.14 milyon olarak hesaplanmaktadır¹². 2000'den fazla türün güvenli olduğu düşünülmektedir ve yaklaşık 700 tür mantar farklı biyolojik aktiviteler sergilemektedir^{12,16}. Mantarlardan elde edilebilen görece büyük miktarda metabolit nedeniyle antimikrobiyal, antioksidan veya antiviral ajanların doğal kaynaklarıdır¹⁵. Mantarlar temel olarak antitümör, antifungal, antioksidan, antiviral, antibakteriyel, antiparazitik, hepatoprotektif, antiinflamatuvar, immünomodülatör, antidiyabetik, hipolipidemik, antitrombotik, antioksidan, kardiyovasküler, antihiperkolesterolemik ve hipotansif aktiviteler gibi tıbbi özelliklere sahiptir. Tıbbi mantarlardan izole edilen çeşitli biyolojik olarak aktif bileşikler üzerinde Faz-I, II ve III klinik deneyleri çalışıldı ve kanser dahil çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanıldı. Tıbbi mantarlar, yararlı biyoaktif bileşiklerin fazlalığı ve ilaç keşfi ve geliştirme bağlamında ilaç endüstrileri için arzu edilen doğal ürünler olarak yetiştirilir¹².

2.1. *Amanita* Cinsi Mantarlar

Amanita cinsinin, dünya çapında görülen yaklaşık 900-1000 tanımlanmış türü vardır¹². Bu cins mantarlar içinde çok lezzetli yenilen türler olduğu gibi ölümcül zehirlenmelere neden olan bazı türler de bulunduğundan insanlar için önemlidir^{13,17}. Ölümcül zehirlenmelere neden olan türler arasında *Amanita phalloides*, *Amanita verna*, *Amanita bisporigera*, *Amanita virosa*, *Amanita ocreata*, *Amanita suballiacea*, *Amanita tenuifolia*, *Amanita hygrosopica*, *Amanita muscaria*, *Amanita phalloides var. alba* ve *Amanita panterina* yer alır¹⁶⁻¹⁸. Ölümcül amanitalar tüm ölümcül mantar zehirlenmelerinin %90-95'inden sorumludur^{17,19}. Ölümcül zehirlenmelerin en sık nedeni ise *Amanita phalloides* türüdür¹³.

Amanita türlerinin en önemli özelliği, büyük miktarda toksik bileşiğe sahip olmalarıdır. Amatoksin zehirlenmesi dünya çapında bir sorundur. Batı Avrupa'da yılda 50-100 ölümcül vaka bildirilmiştir¹⁶. *Amanita* mantarlarının zehirlenmesi üç kategoriye ayrılabilir. Sendromik sınıfa göre nörotoksisite, nefrotoksisite ve hepatotoksisite.

Amanita muscaria, *Amanita pantherina* gibi nörotoksik *Amanita* türleri, halüsinojenik etkilere neden olan ibotenik asit ve muscimol içerir. *Amanita smithiana*, *Amanita proxima* ve *Amanita pseudoporphyria* gibi nefrotoksik *Amanita* türlerinde, akut böbrek yetmezliği indüklenebilir. Avrupa ve Kuzey Amerika’da *Amanita phalloides*, *Amanita verna* ve *Amanita virosa* gibi hepatotoksik *Amanita* türleri ve Doğu Asya’da *Amanita exitialis*, *Amanita fuliginea* ve *Amanita subjunquillea* insanların karaciğer yetmezliği ve ölümünden sorumludur. Ölümcül olan *Amanita* türü mantarlar *Amanita* ailesinin siklopeptit içeren grubudur¹⁷. Şimdiye kadar, *Amanita* türlerinden yaklaşık yirmi iki siklopeptid toksini tanımlandı. Bunlar üç ana gruba ayrılır: amatoksinler, phallotoksinler ve virotoksinler^{17,20}. *Amanita* cinsi mantarlarda da *Amanita phalloides* ağırlıkça en yüksek toksin içeriğine sahiptir¹⁶.

2.2. *Amanita phalloides*

Amanita phalloides 1727 yılında ilk olarak Fransız botanikçi Sébastien Vaillant tarafından tanımlandı²¹.

2.2.1. Taksonomi

Amanita phalloides (Fr.) Link. “Evcikkıran” “Köygöçüren” “Yeşil şeytan”^{22,23}

Sınıf: *Basidiomycetes*

Takım: *Agaricales*

Familiya: *Amanitaceae*

Cins: *Amanita*



Resim 2.1. *Amanita phalloides*¹²

2.2.2. Tanımlama

2.2.2.1. Makroskopik özellikleri

A. phalloides mantarının şapkası 5-10 cm çapındadır. İlk önce beyaz bir örtü ile kaplı ve yumurtamsı şekilde olup daha sonra örtüyü yırtıp çıkmaktadır. Önce yarıküresel sonra konik-konveks bir hal alır. Yüzeyi kuru havalarda saten gibi; nemli havalarda ise biraz yapışkandır. Ayrıca yüzeyinde ince ve radyal olarak düzenlenmiş bir fibrilöz yapı vardır. Rengi değişiklik göstermektedir. Sarımsı yeşilden koyu zeytin yeşiline veya zeytin kahverengisine kadar değişebilir, hatta bazı varyetelerde soluk krem-beyazdır. Kenarları düzgün ve akuttur²²⁻²⁵.

A. phalloides mantarının sapı 5-10 (12) × 1-1,5 cm, silindirik, dip kısma doğru kalınlaşıp bulboz şeklini alır. İçi önce dolgun iken yaşlanınca oyuklu veya tünel şeklinde boşluklu olup elastiki yapıdadır. Yüzeyi beyazımsı bir zemin üzerinde az veya çok belirgin yeşilimsiden kahverengiye kadar renklerde olur. Annulus beyaz renkte zarımsı, sapın üst kısmında ve sarkık tipte, üst yüzeyi çizgilidir. Volva beyaz renkte zarımsı, vaginat, üst kısmından bazen yarıya kadar 3-4 segmentlidir²². Volva bazı mantarlarda bulunan kök veya dip kısmını oluşturan kupa şeklindeki kitledir ve *Amanita phalloides* ayırımında çok önemlidir^{21,24,25}.

A. phalloides mantarının eti beyaz, kütikülanın altı sarımsı, kokusu başlangıçta hoş, yaşlandıkça kötüleşir ve tadı fındıksıdır^{22,25}.

A. phalloides mantarının lamelleri ise önce beyaz iken yaşlandıkça sarımsı bir renk alır. Lamelleri 8 mm kadardır ve kenarları düzgündür. Bazen lamelciklere rastlanır. *Amanita phalloides* mantarının lamelleri spor kitlesinden farklı olarak sülfürik asitle soluk leylak veya pembe renge boyanır^{21,22}.

2.2.2.2. Mikroskopik özellikleri

A. phalloides mantarının sporları renksiz ve saydam, küresimsi-enli eliptik, amiloid, düzgün çeperlidir. Spor baskısı beyazdır. İyotla lekeli mavi renk alan sporların boyutları 8 – 10 µm civarındadır^{21,22}. Bazidyum 30-55 × 10-15 µ ve 4 sterigmalıdır. Kütikula 2-6 µ kalınlığında periklinal liflerden ibarettir²².

2.2.3. Dağılım ve habitat

Amanita phalloides Avrupa'ya özgü bir mantardır ve bu alanda yaygın olarak bulunur. Kuzeyde İskandinavya'nın güney kıyılarından batıda İrlanda'ya, doğuda Polonya ve Batı Rusya'ya kadar olan bölgelerde ve güneyde Balkanlar boyunca ayrıca İtalya'da, İspanya'da, Portekiz'de, Fas ve Cezayir'de *Amanita phalloides*'e rastlanmıştır. Avrupa dışında diğer ülkelerde örneğin: ABD, Afrika, Arjantin, Avustralya, Hindistan, Malezya, Meksika, Şili, Tanzanya, Uruguay, Doğu Asya ve Batı Asyanın Kuzey İran ormanlarında da varlığı rapor edilmiştir^{17,21,25,26}.

Ülkemizdeki yayılışı ise Adana, Adapazarı, Ankara, Artvin, Balıkesir, Bartın, Bingöl, Çorum, Denizli, Düzce, Elazığ, İstanbul İzmir, Kastamonu, Nevşehir, Ordu, Samsun, Trabzon ve Uşak illerinde belirlenmiştir^{8,18,21,22,27,28}.

Genellikle yaprak döken ağaçlarla, özellikle de meşe ve kayın ormanlarında nadiren de çam ormanlarında, bazen de gürgenler, kestane, atkestanesi, huş, fındık altında veya ormanların dışında tek tek ya da gruplar halinde yetişir. Yaz ve sonbahar aylarında ortaya çıkarlar²¹⁻²⁵. Orta Avrupa'da Temmuz ayından Ekim ayının sonuna kadar yetişir²⁴. Bu mantarın geniş bir yaşam alanı vardır ve uygun iklim şartlarını yakaladığında bol olarak yetişebilir^{10,22}.

2.2.4. *Amanita phalloides* toksisitesi ve tedavisi

Amanita phalloides etkisi geç başlayan zehirlenmeye sebep olan bir türdür²⁹. Bu tür üç ana toksin grubu içerir: amatoksinler, phallotoksinler ve virotoksinler^{11,12,25}. Amatoksinler esas olarak klinik zehirlenmeden sorumlu ajanlardır. Amatoksinler yavaş etkili, phallotoksinler ve virotoksinler hızlı etkili zehirlerdir. Amatoksinler, phallotoksin ve virotoksinlerden 10-20 kat daha toksiktir. Bu nedenle, klinik uygulamada toksikolojik bir araştırma için sadece amatoksinler ilgi çekicidir^{16,20,24,30}. Phallotoksinler, karaciğer ve kas hücreleri için oldukça toksik olmasına rağmen, gastrointestinal sistem tarafından absorbe edilmedikleri için amanita ile ilişkili toksisiteye hafifçe katkıda bulunurlar²⁰. Virotoksinler de bağırsak hücreleri tarafından emilmedikleri için insan zehirlenmelerinde rol oynamazlar^{11,17}. Amatoksinlerin letal dozunun insanda 0.1 mg / kg , phalloidininin 1-2 mg/kg olduğu, ayrıca *Amanita phalloides*'in yaklaşık 50 gramının insanı öldürmeye yeterli olduğu bildirilmiştir^{29,31}.

Amatoksinler az miktarda ancak hızlı bir şekilde gastrointestinal sistemden emilir ve hepatositler tarafından büyük miktarda alınarak enterohepatik dolaşıma katılırlar^{11,20}. Toksikite, özellikle hücre yenilenmesinin hızlı olduğu gastrointestinal sistem epitel hücreleri, hepatositler ve böbrek epitel hücrelerinde gözlenir. Bu durum hücre nekrozuna yol açan amatoksinler tarafından RNA sentezinin inhibisyonundan kaynaklanmaktadır^{11,32}.

Amatoksin zehirlenmesinin klinik belirtileri dört fazda incelenebilir¹¹ (Tablo 2.1).

Çoğunlukla asemptomatik seyreden birinci fazı, mantar alımından 4–6 saat sonra ciddi gastrointestinal semptomların (bulantı,kusma, karın ağrısı) ortaya çıktığı ikinci faz izler. Karaciğer hasarı oluşturmayan diğer toksik mantarların alımı sonrasında da benzer gastrointestinal semptomlar 1–2 saat içinde gelişir. Bu yüzden geç ortaya çıkan semptomlar amatoksin zehirlenmesi şüphesini artırır. İkinci faz olan gastroenterik fazda oligüri, elektrolit ve asit-baz dengesizliği ve buna bağlı renal hasar oluşabilir. Eş zamanlı olarak, nadir durumlarda ölümcül olabilen hipoglisemi gelişir. Üçüncü faz mantar alımından 24–72 saat sonra görülür ve klinik seyir kısmen iyidir ancak asemptomatik transaminaz yüksekliği mevcuttur. Dördüncü faz 4-9. günler içerisinde görülür. Bu dönemde belirgin akut karaciğer yetmezliğine böbrek yetmezliği, ensefalopati ve koma eşlik edebilir ve ölümlerle sonuçlanabilir^{11,24}.

Tablo 2.1. Amatoksin zehirlenmesinin klinik özellikleri^{11,25}

Faz	Başlangıç	
	Süresi	Klinik Bulgular
1 Latent	0-24 saat	Asemptomatik dönem
2 Gastroenterit	6-24 saat	Bulantı, kusma, ishal, karın ağrısı, hematüri
3 Rölatif İyileşme	24-72 saat	Asemptomatik hepatik enzim yükselmesi
4 Karaciğer Yetmezliği	4-9 gün	Hepatik ve renal hasar, ensefalopati, koma, ölüm

Amatoksin zehirlenmesinde tanı, tanımlanan klinik belirtilerin yanı sıra idrarda alfa amanitinin tespit edilmesiyle konur. Amatoksinler kısıtlı oranda proteine bağlandıklarından plazmada düşük konsantrasyonda bulunurlar^{11,25}. Ayrıca basit ve yeni bir teknoloji olan amatoksin test kitleri kullanılabilir. Alfa amanitinin idrardaki

konsantrasyonu ile hepatik hasarın ciddiyeti arasındaki ilişki zayıftır, bu yüzden idrar amanitin düzeyi prognoz takibi için kullanılmaz¹¹.

A. phalloides zehirlenmeleri % 10 ile % 20 arasında bir mortalite düzeyine yol açabilir. Çocuklarda mortalite düzeyi çok daha yüksektir^{12,16,33}. Erken tedavi prognozu önemli ölçüde iyileştirdiğinden, hastalar genellikle maruziyet onaylanmadan amatoksin zehirlenmesi için agresif bir şekilde tedavi edilir³⁴.

Amanita zehirlenmesinin etkili tedavisi mümkün değildir, çünkü amatoksinler hedef hücrelerine girdikten sonra çekirdeklerdeki reseptör enzimlerinden ayrılmaları zordur. Bu nedenle amaç, henüz bağlanmamış toksin konsantrasyonunu en kısa sürede en düşük seviyeye indirmek olmalıdır. Zehirlenmenin şiddeti, alınan zehir miktarına ve dolayısıyla kandaki konsantrasyonuna bağlıdır^{24,29,35}. Amatoksinler idrarla hızla atıldığından, radyoimmünolojik testler birkaç saat içinde zehirlenmenin şiddeti hakkında bilgi sağlayabilir³⁶. Bu yöntem 50 pikogram (pg) kadar az amatoksin saptanmasına izin verir³⁷. Hastayı amatoksinlerden tamamen kurtarmak için tedaviye mümkün olduğunca erken başlanmalıdır²⁴. *A. phalloides* grubu mantar zehirlenmelerinin antidotu yoktur; semptomaya yönelik destekleyici tedavi uygulanır^{29,35}. Günümüzde ise tedavi olarak; toksin emilimini azaltmak için aktif kömür uygulaması, midenin yıkanması ve enterohepatik döngüyü kırmak için duodenal drenaj uygulaması yapılmaktadır^{25,29,35}. Sıvı-elektrolit replasmanı yanında 300.000-1.000.000 U/kg/gün dozunda damar içi (iv) kristalize penisilin G ve 20 mg/kg/gün iv yoldan silibinin kullanılmaktadır^{20,25,29,33,38}. Silibininin karaciğeri koruyucu etki mekanizması belli değildir. Ancak amanitinlerin enterohepatik dolanımı ile birlikte hem phalloidin hem de alfa-amanitin hepatosit membranına bağlanmasını ve hücreye girişini engellediği deneysel olarak gösterilmiştir. Hepatoprotektif etkisi olduğu öne sürülen diğer bir madde ise tioktik asittir (α lipoik asit), fakat terapötik değeri tartışmalıdır^{20,29}. Chang ve arkadaşları (1984) tarafından *Aucuba japonica*'da bir glikozit olan aucubin'in panzehir olarak rapor edildiği bir çalışma vardır.²⁴ Ayrıca rifampisin, prednisolon, polimiksin B, N-asetilsistein, vitamin C ve etanol gibi çeşitli terapötik ajanlar tedavi için denenmiştir, ancak bu ajanların etkinliği hala tartışmalıdır^{20,25,35}. Bunlardan başka hemodiyaliz ve hemoperfüzyon tedavileri de kullanılmakta ancak bunların da yararının tartışmalı olduğu bildirilmektedir^{25,29,38}. *Amanita phalloides* zehirlenmesinin klinik belirtilerinden biri de genellikle hepatik hasarla ilişkili hipoglisemi oluşmasıdır ve hipogliseminin

düzeltilmesi ile hastanın durumunun dengelenmesi sağlanabilir^{24,26,39}. Ölümüne neden olan ise mantar miktarının yutulmasının ardından 3. ve 7. günler arasında meydana gelen geri dönüşümsüz karaciğer hasarıdır^{24,25,35,38}. Bu nedenle son çare olarak da karaciğer transplantasyonu önerilmektedir^{25,29,35}.

2.3. *Amanita phalloides* Toksinleri

Amanita phalloides en zehirli mantar toksinlerini üretir ve *Amanita* cinsi mantarlar içinde en yüksek toksin içeriğine sahiptir^{12,16,26}. *Amanita phalloides* mantarının zehirli bileşiklerinin araştırılmasına 19. yüzyılda başlanmıştır²². Siklopeptid sınıfına ait olan *Amanita phalloides* toksinleri; amatoksinlere, phallotoksinlere ve virotoksinlere ayrılabilen üç grup siklik peptid toksinden oluşur^{12,19,26,30}. Tüm toksin grupları, indol halkasının 2. pozisyonunda bir sülfür atomu ile ikame edilmiş bir triptofan kalıntısı içerir^{25,26}. Amatoksinler, mRNA, mikroRNA ve küçük nükleer RNA sentezinde hayati bir enzim olan ve protein sentezinin kesintiye uğramasına ve hücre ölümüne yol açan RNA polimeraz II'nin güçlü ve seçici inhibitörleridir^{10,20}. Amatoksinler karaciğere, böbreklere ve beyne zarar verebilir ve sonunda ölümüne neden olabilir. Phallotoksinler, aktini güçlü bir şekilde bağlar, karaciğer ve kas hücreleri için oldukça toksik olmasına rağmen, gastrointestinal sistem tarafından absorbe edilmedikleri için amanita ile ilişkili toksisiteye hafifçe katkıda bulunurlar. Phallotoksinler gibi virotoksinlerin de oral maruziyetten sonra sınırlı toksik etkileri vardır. Phallotoksinlerden bile daha zayıf olan aktin ile etkileşimleri aktin monomerleri arasındaki bağları stabilize eder ve mikrofilamanların depolimerizasyonunu önler. *A. phalloides*, hemolize yol açan toksik lektinleri de üretir. Ayrıca şu an için toksisiteyle ilgisiz olduğu düşünülen monosiklik, dekapeptid olan antamanid izole edilmiştir. Antamanid, phallotoksinlere ve amatoksinlere karşı güçlü antidot aktivitesi için kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Antitoksik aktivitesini açıklamak için, antamanid'in phallotoksin phalloidin ve amatoksin alfa-amanitin için bir hepatosit membran taşıyıcısını rekabetçi bir şekilde antagonize ettiği öne sürülmüştür^{24,40}.

Amanita phalloides mantarındaki toksin miktarı iklim ve çevre koşullarına göre değişmektedir. Ayrıca, toksin miktarının, mantarın farklı kısımlarında ve farklı büyüme aşamalarında da farklı olduğu bulunmuştur^{16,41}. Örneğin genç meyve gövdesi daha

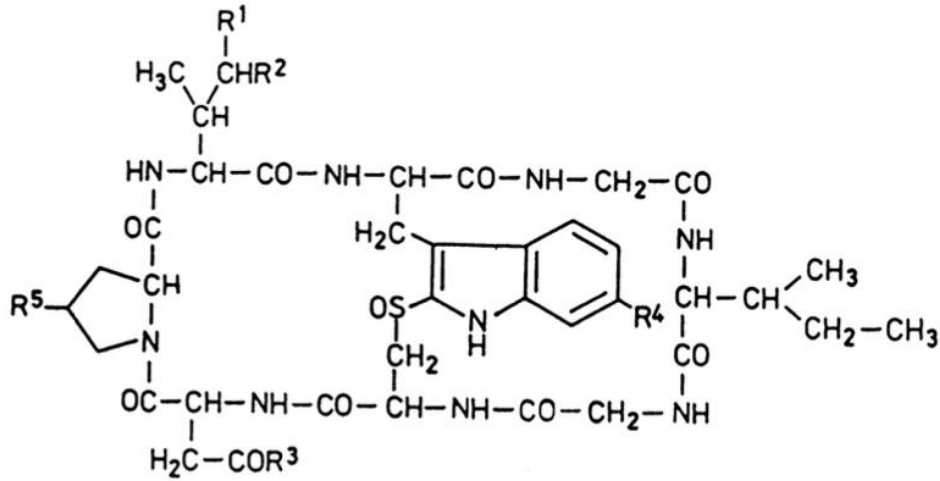
düşük, iyi gelişmiş mantar ise daha yüksek konsantrasyonda toksin içerir. Mantarda phallotoksinler nedeniyle de volva en zehirli kısımdır^{25,26}.

2.3.1. Amatoksinler

Amatoksinler ilk olarak *A. phalloides* mantarından 1941 yılında Münih Üniversitesi üyeleri olan Heinrich O. Wieland ve Rudolf Hallermayer tarafından izole edilmiştir^{17,24}. Amatoksinler yaklaşık 900 g / mol moleküler ağırlığa sahiptir ve üç sıra dışı amino asit; dihidroksiizolösin, hidroksitriptofan ve hidroksiprolin içeren bisiklik oktapeptitlerdir^{12,22,25,26,30,31,42}. Amatoksinler renksiz ve genellikle kristalize maddeler olup su ve metanol gibi polar çözücülerde çözünürler²². Bugüne kadar yapısı aydınlatılmış dokuz farklı amatoksin vardır^{12,22,24,26,31}. Bunlar amanin, α -amanitin, β -amanitin, γ -amanitin, ϵ -amanitin, amanullinik asit, amaninamid, proamanullin ve amanullindir^{12,31,34,41}. Bunlardan α -amanitin, γ -amanitin, amaninamid, amanullin ve proamanullin nötr amatoksinler olarak; β -amanitin, ϵ -amanitin, amanin ve amanüllik asit asidik amatoksinler olarak sınıflandırılır²⁵. Amatoksinlerin yapıları Şekil 2.1'de gösterilmektedir. En toksik formlar α -, β - ve γ -amanitindir³⁴. Amanitinin etki etmesi için, toksinin bisiklik bir yapıya sahip olması gerekir³⁵. α ve β -amanitin son derece yüksek farmakolojik güçleri (LD₅₀ (p.o. insan): 0.1 mg / kg vücut ağırlığı) ve alışılmadık derecede yüksek kimyasal ve termal stabiliteleri ile bilinir^{20,24,34,35,38,43}. Amanitin, örneğin pişirmeyle yok edilmez, 0 ° C'nin altında uzun süreli saklamadan sonra gıda maddelerinde aktif bulunur ve sindirim sistemindeki enzimler ile etkilerini kaybetmezler^{11,14,20,25,31,34,35,38,42}. *Amanita phalloides* α , β ve γ amanitinin yüksek doğal konsantrasyonu nedeniyle (sırasıyla ortalama 8, 5 ve 0,5 mg / 100 g ıslak mantar) özel dikkat gerektirir³⁸. Örneğin orta büyüklükte bir mantar 10 ila 12 mg amatoksin içerir ve bu yetişkin bir insanı öldürmek için yeterli bir dozdur³¹. Amanitinler, ökaryotik RNA polimeraz II'ye, onu bloke ederek ve DNA transkripsiyonunu ve protein sentezini durdurarak hücre ölümüne neden olmak için yüksek bir seçicilik derecesi ile geri dönüşümsüz olarak bağlanır. Bu da transkripsiyon ve protein sentezinde 1000 kattan fazla dramatik bir azalmaya neden olur^{24,42}. Memeli türlerinin çoğunda, amatoksinlerin plazmadan somatik hücrelere penetrasyonu oldukça yavaştır. Ancak karaciğer hücrelerinde durum farklıdır. Karaciğer hücrelerinde OATP1B3, OATP2B1 ve OATP1B1 gibi proteinler, toksinlerin sinüzoidlerden sitoplazmaya kolayca girmelerini kolaylaştırır. Bu nedenle, *A. phalloides* ile zehirlenmelerde, toksinlerin hedef aldığı ana

organ karaciğerdir. Alınan miktar, karaciğer hasarının derecesini belirleyen en önemli faktördür^{12,26,31,35,38,41}.

A. phalloides mantar zehirlenmesi hepatik nekroza ayrıca kısmen de böbreklerin nekrozuna neden olur ve bu mantar siklopeptid mantarlarında güçlü hepatotoksin olarak kabul edilir^{12,24,26,29}. Karaciğer yetmezliği, insanda amanitin zehirlenmesinin yaygın ölüm nedenidir³⁸. Amanitinin biyokimyasal etkisi hakkında ayrıntılı bilgi, RNA içeriğinin α -amanitin ile ilk 24 saatlik zehirlenmeler sırasında aşamalı olarak azaldığı sonuçlarından elde edilmiştir. Eklenen amanitin (10 ng / ml), RNA polimerazının aktivitesini % 60 \pm 70 oranında inhibe etmiştir. Üç çeşit ökaryotik RNA polimeraz vardır ve amatoksinlere duyarlılıklarında geniş ölçüde farklılaşır. Üç tipten (I, II ve III), form II en duyarlı olanıdır. Memeli hücrelerinden ve ayrıca balıklardan ve böceklerden izole edilen RNA polimeraz II aynı zamanda α -amanitine karşı oldukça hassastır. Bununla birlikte, memeli olmayan polimerazlar biraz daha az hassasiyet gösterir. Mantarlarda, RNA polimeraz II'nin toksine karşı 50 kat daha az duyarlı olduğu tespit edildiği gösterilmiştir. *Amanita phalloides*, kendi inhibitörüne karşı dirençlidir²⁶.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	LD ₅₀ (mg/kg)*
α-Amanitin	CH ₂ OH	OH	NH ₂	OH	OH	0,3-0,6
β-Amanitin	CH ₂ OH	OH	OH	OH	OH	0,5
γ-Amanitin	CH ₃	OH	NH ₂	OH	OH	0,2-0,5
ε-Amanitin	CH ₃	OH	OH	OH	OH	0,3-0,6
Amanin	CH ₂ OH	OH	OH	H	OH	0,5
Amanin Amid	CH ₂ OH	OH	NH ₂	H	OH	0,5
Amanullin	CH ₃	H	NH ₂	OH	OH	20
Amanullinic Asit	CH ₃	H	OH	OH	OH	20
Proamanullin	CH ₃	H	NH ₂	OH	H	20

Şekil 2.1. Amatoksinlerin kimyasal yapısı^{24,26,29,44}

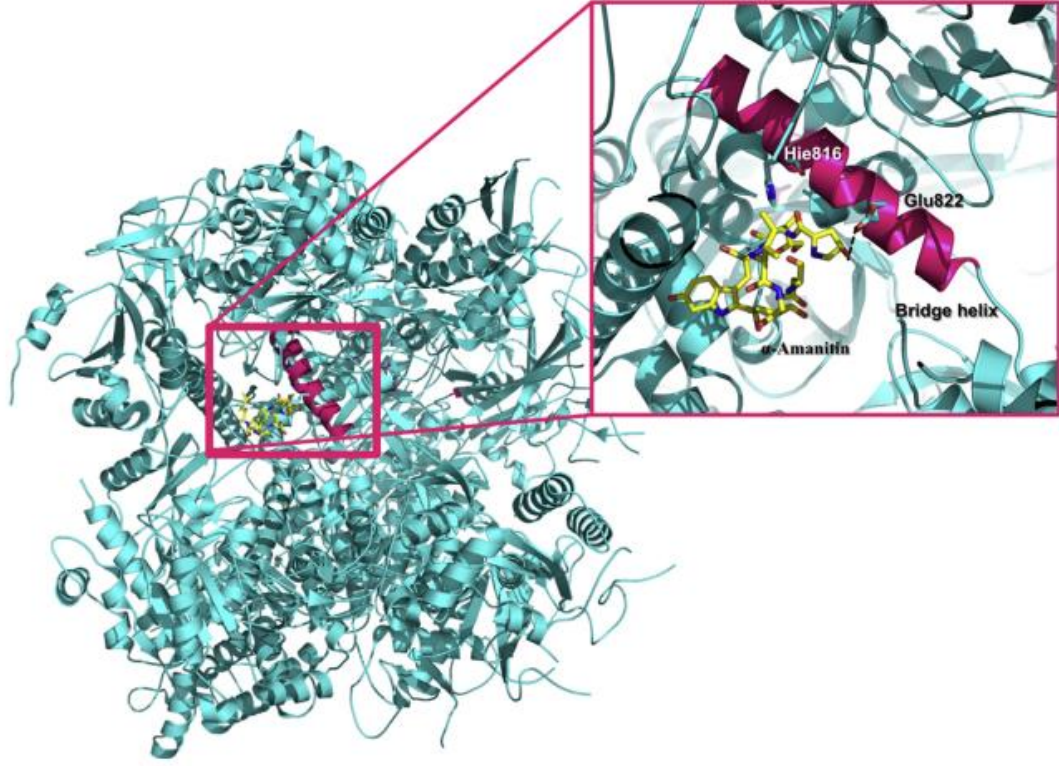
* farelerde intraperitoneal LD₅₀ (mg/kg)²⁵

2.3.1.1. Alfa amanitin

Alfa-amanitin siklik bir oktapeptiddir^{12,21,26,29,31} Amanitinler içinde en fazla araştırılan ve ilk saflaştırılan toksin olmuştur. Mantar içinde en fazla oranda bulunan amanitin grubu toksindir ve günümüzde yüksek saflıkta kolaylıkla elde edilebilir^{16,34,41,45}. Alfa-amanitin mide-barsak kanalından kolayca absorbe edilmekte ve plazma proteinlerine zayıf bir şekilde bağlanmaktadır. Karaciğer hücresine safra asitlerinin transportunu yapan taşıma sistemi aracılığı ile girerek kolayca hücre içine

nüfuz etmektedir²⁹. Alfa amanitin hücrelerde protein sentezinin ilk basamağı olan transkripsiyonu gerçekleştiren RNA polimeraz II enzimine bağlanarak protein sentezini inhibe ettiği bilinmektedir. Alfa amanitinin ayrıntılı etki şekli ve kristal yapısı gösterilmiştir^{25,46}. (Şekil 2.2) Protein sentezini gerçekleştiremeyen hücre, mevcut proteinler bitene kadar birkaç gün daha yaşar ve sonra ölür. Bu etki nükleus içeren tüm hücrelerde oluşmasına rağmen, alfa amanitin emilim sonrası hemen karaciğerde birikmekte ve yoğun enterohepatik dolaşım geçirmekte olduğundan asıl toksik etki karaciğer hücrelerinde görülmektedir. Bu toksinlerin etki süresi insanlarda yaklaşık 10-15 saattir^{20,45}. Ayrıca toksin böbreklerden atıldığı için, karaciğer kadar olmasa da böbrek toksisitesi de görülmektedir⁴⁵. İn vitro ve in vivo yapılan çalışmalar alfa amanitinin aynı zamanda apoptotik hücre ölümüne de yol açabileceğini düşündürmektedir⁴⁷. İnsanlarda oral yoldan uygulanan alfa-amanitin ölümöl dozu 0.1 mg / kg'dır²⁰.

Deneysel araştırmalarda RNA polimeraz II inhibisyonu için çoğunlukla alfa amanitin kullanılmaktadır ve bu amaçla en sık kullanılan ajandır. Ayrıca *Amanita phalloides* mantar zehirlenmesini modellemek amacıyla da hücre kültürü ve hayvan modellerinde de kullanılmaktadır⁴⁵.



Şekil 2.2. α -amanitin ile kompleks halinde 10 alt birim RNA polimeraz II'nin kristal yapısı²⁵.

* Kristal yapı, RNA polimeraz II inhibisyonuna katkıda bulunan bazı önemli atomik temasları açıklar. α -amanitin ile etkileşime giren RNA polimeraz II (magenta), α -Amanitin (sarı)²⁵

2.3.1.2 Alfa amanitinin terapötik potansiyeli

Canlı organizmalar için toksik olan bazı maddeler de terapötik amaçlar için kullanılabilir. Terapötik bir ajan olarak bir toksini kullanırken kritik nokta, vücut üzerinde olumsuz bir etkisi olmamasıdır. Alfa amanitin, ökaryotik hücrelerin çoğunda öldürücü bir etkiye sahip olduğundan, bir antiparaziter veya antifungal ilaç olarak değerli olabilir. Son çalışmalara göre, *A. phalloides* tarafından üretilen bir toksin olan alfa amanitin, patojenik mikroorganizmalara karşı umut verici bir antimikrobiyal ilaç kaynağıdır. Antifungal duyarlılığın araştırılması, alfa amanitin, insan ve hayvan sağlığını tehdit eden bazı patolojik mantarlar üzerinde terapötik etkiler sağlayabileceğini göstermiştir. α -amanitin için yapılan deneylerde α -amanitin'in deriden emiliminin olmadığı tespit edilmiştir. Bu durum α -amanitin'in harici preparatlarda antimikrobiyal ajan olarak veya ektoparazitlere karşı kullanılabilmesine olanak sağlayabilir¹⁰.

Ayrıca amanitinler tümör hücrelerini yok etmek için uygun bir antikor-ilaç konjugatıdır (ADC). Amanitin bazlı ADC, RNA Polimeraz II'nin inhibisyonuyla onkoloji terapisine yeni bir etki tarzı getirmektedir. Toksinin yüksek gücü, oldukça etkili ADC'lere yol açar. Bu gelişmeler amanitin bazlı ADC'lerin yeni bir etki tarzı ve uygun bir terapötik indeks ile bir toksin kullanarak klinik gelişimini desteklemektedir⁴².

Amatoksinler, ADC oluşturmak için bir toksinin ön koşullarını mükemmel bir şekilde yerine getirir: sitotoksik potansiyelini azaltmadan bir bağlayıcı bağlama olasılığı, düşük konsantrasyonlarda hücre öldürmek için yüksek bir sitotoksik potansiyelinin ve onu ortaya çıkarmak için hedef hücre içindeki sitotoksik potansiyelinin olması gibi. Umut verici etkinlik profilinin yanı sıra, amanitin bazı olumlu fizikokimyasal özellikler gösterir. Tipik olarak ADC olarak kullanılan diğer tüm toksinlerin aksine, molekül çok hidrofiliktir. Bu, sulu tamponlarda konjugasyonu kolaylaştırır ve ADC'nin birikmesini önler, bu da işlemeyi kolaylaştırır ve immünojenisite potansiyelini azaltır. Amanitinin, çoklu ilaç direnci (MDR) işlemlerinin başlatılması için çok zayıf bir substrat olduğu ve amanitin konjugatlarının MDR sahip tümör hücrelerinde oldukça güçlü olduğu da gösterilmiştir. Amanitin plazmada oldukça karardır ve düşük moleküler ağırlığı ve hidrofilikliği nedeniyle böbrek yoluyla çok hızlı bir şekilde temizlenir, bu da diğer dokularda birikmesini mümkün kılmaz. Bir başka güvenlik özelliği de pasif alım yoluyla normal hücrelere girememesidir. Serbest toksin, amanitin ile konjüge edilmiş bir antikora kıyasla 20,000 kat azaltılmış sitotoksosite gösterir. İlginç bir şekilde, bir antikora konjüge edilen amanitin, artık OATP1B3 aracılı hücre alım için bir substrat değildir ve bu nedenle Amanitin-ADC'lerin karaciğer toksisitesi önemli ölçüde azalır. Son olarak ve belki de bir ADC'deki tıbbi uygulaması için en uygun olan amanitin, hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri aktif olarak öldürme yeteneğine sahiptir. Bu durum Amanitin-ADC'nin uzun vadede metastaz ve tümör nüksetmesini önlemek için uyuyan tümör hücrelerini yok etmesini sağlayabilir⁴².

2.3.1.3. Alfa amanitinin deriden emilimi

Alfa-amanitin'in deri yoluyla emilimi veya α -amanitin'in deri yoluyla emiliminin neden olduğu zehirlenme ile ilgili yeterli çalışma yapılmamıştır. Şimdiye kadar, bilinen tüm α -amanitin zehirlenme vakaları, α -amanitin içeren mantar türlerini yenmesi ile gastrointestinal sistem yoluyla meydana geldiği bildirilmiştir. α -amanitin hakkında

kapsamlı bir veri gövdesi içeren Uluslararası Kimyasal Güvenlik Programına göre, toksinin deriden veya gözlerden difüzyonu hakkında hiçbir bilgi yoktur¹⁰.

Kaya ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışmada alfa amanitinin deriden emilimini araştırılmış ve farelerin derileri üzerine uygulanan alfa amanitinin, deri üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisinin gözlemlenmediği, deri uygulaması yapılan hayvanların kan, karaciğer ve böbrek örneklerinde alfa amanitine rastlanmadığı ayrıca intraperitoneal uygulamalardaki fare karaciğer hücrelerinin nekrotik değişime uğramasına rağmen deri uygulaması yapılan farelerin karaciğerlerinde herhangi bir sitotoksik etkinin gözlemlenmediği belirtilmiştir. Toksinin deri yoluyla vücuda geçmemesi yakın bir gelecekte yeni bir dış parazit ilacı olarak alfa amanitinden yararlanmamızı sağlayabilir. Alfa amanitin, özellikle her geçen gün daha fazla direnç mekanizması geliştiren patojenlerin yüzeysel enfeksiyon yapan türlerine karşı etkili bir ajan veya bir ilaç kombinasyonunda önemli bir bileşen olabilir.¹⁰

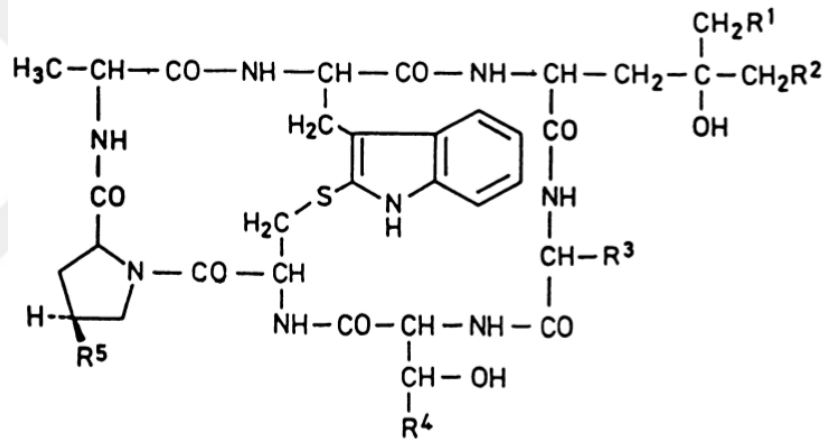
2.3.2. Phallotoksinler

Phalloidin (900 Da MW) ilk kez 1937'de Wieland tarafından *A. phalloides*'te tanımlanırken, phallotoksinler ilk kez 1974'te *A. virosa*'da bulundu^{20,24}. Phallotoksinler bisiklik heptapeptit yapısındadır³⁰. Su ve metanolde çözünen, renksiz ve kristalize bileşiklerdir. Bilinen 7 phallotoksinin formülü Şekil 2.3'de gösterilmektedir^{20,22} Bunlar phalloidin, phalloin, prophallin, phallisin, phallacin, phallacidin ve phallisacindir²⁶. Phalloidin, phalloin, prophallin ve phallisin nötral phallotoksinler olarak sınıflandırılırken; phallacin, phallacidin ve phallisacin asidik phallotoksinlerdir²⁵.

Phallotoksinlerden olan phalloidin'in toksisitesi 1938'den beri araştırılmaktadır. Bugün, phallotoksinlerin F-aktin'e spesifik olarak bağlandığı bilinmektedir, ki bu filamentlerin yapısını kuvvetli bir şekilde stabilize eder. Başlangıçta, aktin sadece kas biyokimyasında (ince filamentler) biliniyordu, ancak çeşitli biyolojik kaynaklarda hücre iskeleti proteini olarak da tespit edildi. Phallotoksinler, G-aktin polimerizasyonunu, özellikle düşük koşullar altında uyarır ve F-aktin filamentlerini stabilize eder. Mantar peptitleri F-aktin'e sıkıca bağlanır, ancak G-aktin'e bağlanmaz. F-aktinin phallotoksinlerle stabilizasyonu birkaç çalışmada gösterilmiştir. Phallotoksinler için aktin bağlama bölgesi, tavşan kası F-aktininin kimyasal olarak farklı, asit etiketli phallotoksinlerle kovalent etiketlenmesiyle belirlenmiştir. Her iki phallotoksin, F-aktin

için güçlü bir yeterliliğe sahiptir. Phallotoksinlerin proteinleri F-aktin ile etkileşiminin, uzaysal formülün sol tarafında küçük, 15 üyeli halka vasıtasıyla gerçekleştiği sonucuna varılabilir^{25,26}.

Karaciğer hücrelerinin phallotoksinlerle teması sonrasında toksin, hücre zarından taşıma sistemi tarafından geçer ve hemen lipid çift katmanının altındaki aktin ile reaksiyona girer²⁶. Phallotoksinler bağırsak hücreleri tarafından emilmedikleri için insan zehirlenmelerinde rol oynamazlar. Phallotoksinler hafif zehirlerdir, çünkü ısı veya sindirim yoluyla kolayca bozunmaktadırlar^{13,16}. Phallotoksinler 2 ± 5 saat içinde öldürücüdür ve amatoksinlerden daha az toksiktir. ($LD_{50} 2 \pm 3$ mg / kg, ancak sadece enjekte edildiklerinde). 100 g taze *Amanita phalloides* ortalama 10 mg phalloidin ve phalloin izleri içerir³⁸.



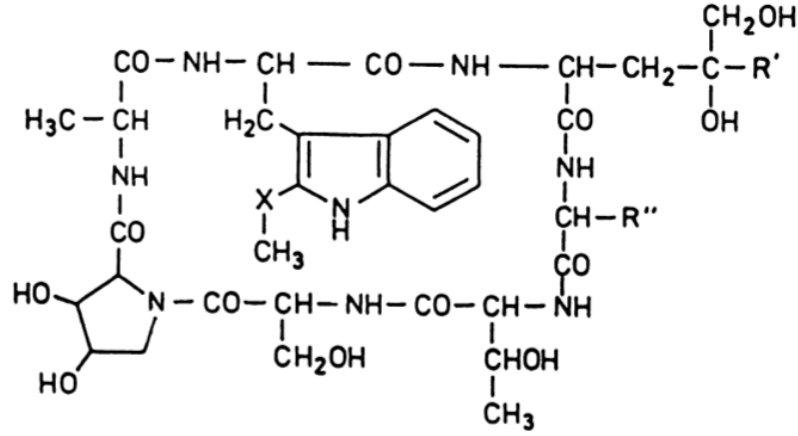
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	LD ₅₀ (mg/kg)*
Phalloidin	OH	H	CH ₃	CH ₃	OH	2,0
Phalloin	H	H	CH ₃	CH ₃	OH	1,5
Prophallin	H	H	CH ₃	CH ₃	H	>20
Phallisin	OH	OH	CH ₃	CH ₃	OH	2
Phallacin	H	H	CH(CH ₃) ₂	COOH	OH	1,5
Phallacidin	OH	H	CH(CH ₃) ₂	COOH	OH	1,5
Phallisacin	OH	OH	CH(CH ₃) ₂	COOH	OH	4,5

Şekil 2.3. Phallotoksinlerin kimyasal yapısı^{26,29,44}

* farelerde intraperitoneal LD₅₀ (mg/kg)²⁵

2.3.3. Virotoksinler

Virotoksinler ilk olarak *A. virosa* türünden izole edilmiştir^{17,24}. Virotoksinler, en az beş farklı bileşik tarafından oluşturulan monosiklik peptitlerdir: viroidin, desoxiviroidin, alaviroidin, aladesoxiviroidin ve viroisin (Şekil 2.4)²⁶. Amatoksin ve phallotoksinlerden farkı 2-metilsülfoniltriptofan veya 2- metilsülfoksitriptofan ve dihidroksiprolin içermeleri ve monosiklik olmalarıdır^{22,30}. Yapıları ve biyolojik aktiviteleri phallotoksinlerinkine benzer, bu durum ortak öncü yolları paylaştıklarını gösterir^{20,25}. Moleküler düzeyde, phallotoksinler gibi, aktin ile etkileşirler, aktin monomerleri arasındaki bağları stabilize ederler ve mikrofilamentlerin depolimerizasyonunu önlerler. Bununla birlikte, aktin ve virotoksinler arasındaki etkileşimin ultraviyole spektrumu, aktin phallotoksinlerinkinden farklıdır, bu da farklı bir moleküler etkileşimi düşündürür. Virotoksinler, phallotoksinlere göre daha esnek bir yapıya sahiptir ve iki ek hidroksil grubunun varlığı farklı reaktivite sağlayabilir. Virotoksinlerin intraperitoneal LD₅₀'si farelerde 1.0 ila 5.1 mg/kg aralığındadır ve bunların ana toksikolojik özelliği, virotoksinlerin hepatositin dış yüzeyi ile bilinmeyen mekanizmalar yoluyla etkileşiminin neden olduğu hemorajik hepatik nekrozdur²⁵. Bu noktada, virotoksinlerin insan toksisitesindeki rolü belirsizliğini korumaktadır. Ancak oral absorpsiyonunun zayıf olması nedeniyle bu toksin sınıfına çok az klinik önem verilmektedir^{17,24,25}.



	X	R'	R''	LD ₅₀ (mg/kg)*
Viroidin	SO ₂	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	1
Desoxiviroidin	SO	CH ₃	CH(CH ₃) ₂	
 Ala¹ Viroidin	SO ₂	CH ₃	CH ₃	3,7
 Ala¹ Desoxiviroidin	SO	CH ₃	CH ₃	
Viroisin	SO ₂	CH ₂ OH	CH(CH ₃) ₂	1,68
Desoxiviroisin	SO	CH ₂ OH	CH(CH ₃) ₂	

Şekil 2.4. Virotoksinlerin kimyasal yapısı^{25,26}

* farelerde intraperitoneal LD₅₀ (mg/kg)²⁵

2.4. *Amanita phalloides* Toksinlerinin Analiz Yöntemleri

A. phalloides örneklerinde amatoksinlerin ve phallotoksinlerin tanımlanması ve miktar tayini için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Toksinlerin analizinde ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC), kütle spektrometrisi (MS) ile birleştirilmiş kapiler elektroforez, MS veya tandem MS ile birleştirilmiş sıvı kromatografisi (LC), LC elektrosprey iyonizasyon uçuş süresi-MS (LC/ESI-TOF-MS), ince tabaka kromatografisi (TLC) veya yüksek performanslı TLC (HPTLC) gibi yöntemler kullanılmaktadır^{17,25,30,44} LC-MS yöntemi en güvenilir ve hassas sonuçları veriyor gibi görünse de, RP-HPLC en sık kullanılan yöntemdir²⁵. Enjalbert ve arkadaşları tarafından (1992) geliştirilen; UV absorbansı ile birleştirilmiş yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemi, sekiz adede kadar amatoksin ve phallotoksini aynı anda belirleyebilir. UV absorbansı veya kütle spektrometrisi ile birleştirilen HPLC

yöntemi, *A. phalloides* gibi Avrupa ve Kuzey Amerika türleri de dahil olmak üzere çeşitli *Amanita* mantarlarında yaygın olarak uygulanmıştır^{13,17,41,44,48-52}.

A. phalloides mantarındaki siklopeptidlerin tanınması için renk reaksiyonu (Wieland testi) ve kromatografik yöntemler kullanılır. Renk reaksiyonunda (Wieland testi) taze mantardan küçük bir parça alınıp gazete kağıdının baskısız yerinde ezilir ve meydana gelen leke kuruduktan sonra üzerine HCl damlatılır. Eğer mantar suyunda amatoksin varsa, leke yeşil-mavi daha sonrasında mavi renk alır. Bu reaksiyon indollerin aromatik aldehitlerle renkli bileşikler vermesi esasına dayanır. Kromatografik metodlarda ince tabaka kromatografisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılır. İnce Tabaka Kromatografisinde (TLC) kuru veya taze mantar metanol ile iki kez ekstrakte edilir. Metanollü kısımlar birleştirilir, rotavaporda kuruluğa kadar uçurulup bakiye üzerine metanol eklenerek çözülür ve silica gel plağına tatbik edilir. Plak, kloroform-metanol-glasiyal asetik asit-su çözücü sistemiyle yükseltilir. Belirteç olarak sinnamaldehidin metanoldeki çözeltisi püskürtülür ve plak kuruduktan sonra HCl buharları ile doyurulmuş bir tanka konur. 10-15 dakika sonra lekeler belirginleşir amatoksinler mor, fallotoksinler mavi, virotoksinler kahverengimsi-yeşil veya renksiz olurlar ve oluşan renkler kısa sürede kaybolur. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisinde TLC de uygulanan yöntem ile hazırlanan kuru bakiye metanolde çözülür ve bu çözülden çözücü sisteminin metanol:su (40:60, v/v) olduğu, çözücü akış hızınının 1 ml/dak., dedektör dalga boyunun 303 nm olarak ayarlandığı çalışma koşullarında 20 µl C₁₈ kolonuna enjekte edilir. Oluşan pikler değerlendirilerek amatoksin ve phallatoksinler tanımlanır²².

A. phalloides mantarından α , β ve γ amanitinin saflaştırmasına yönelik yapılan çalışmalarda preparatif HPLC sistemi kullanılarak α , β ve γ amanitin elde edilmiş sonrasında analitik HPLC sisteminde C₁₈ (150×4.6 mm; 5 µm partiküllü) analitik kolonuna α , β ve γ amanitin standartları verilerek kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve kalibrasyon denklemine, analizlerde elde edilen pik alanları uygulanarak madde miktarı ölçümleri yapılmıştır^{35,45,53}.

2.5. Antimikrobiyal Tedavi İlkeleri

Kemoterapi, vücudu istila eden mikroorganizmaları veya parazitleri konakçıya zarar vermeden öldürebilen ilaçlarla yapılan tedavidir. Vücuda giren ve hastalık etmeni olan

organizmalar çok çeşitli olduğu için (bakteriler, funguslar, virüsler, protozoonlar vb.) kemoterapide kullanılan ilaçlar da yapıcı ve etki spektrumunu bakımından o oranda çeşitlilik gösterir. Kemoterapötikler vücut sıvılarında oluşturdukları konsantrasyonlarda mikroorganizmalar üzerinde yaptıkları etkinin derecesine göre iki gruba ayrılır. Bakteriostatik olanlar bakteri hücrelerinin gelişmesini ve üremesini önlerler. Bu durumda bakterilerin tamamen elimine edilmesi konak organizmanın immun sisteminin yeterli olup olmamasına bağlıdır^{9,54,55}. Bakterisid olanlar bakteri hücrelerini öldürürler. Antibiyotikler ve antibakteriyel kemoteropatikler eş anlamlı olarak kullanılmaktadır⁹. Antibiyotikler, bakteriler funguslar ve aktinomisetler gibi çeşitli mikroorganizma türleri tarafından biyosentezlenen ve diğer mikroorganizmaların gelişmesini önleyen ya da onları öldüren kimyasal maddelerdir^{9,55}. Antibiyotiklerin yirminci yüzyılın başlarında keşfedilmesi ile bulaşıcı hastalıklardan kaynaklanan mortalite ve morbidite oranlarında ciddi bir düşüş yaşanmıştır. 1937 yılında ilk etkili antibiyotik olarak bilinen sulfonamidlerin tanıtılmasından bu yana gelişen direnç mekanizmaları, antibiyotiklerin tedavi amaçlı kullanımının en önemli problemi olmuştur⁵⁴.

Alexander Fleming tarafından 1928 ve 1940 yıllarında penisilinin keşfedilmesi ile 1941 yılında penisilin insanlarda tedavi amaçlı kullanılmaya başlandı. Ancak penisilinin törepatik amaçlı kullanımından yıllar önce penisilini keşfeden ekip tarafından penisiline karşı direnç mekanizması olan bakteriyel penisilinaz tespit edilmiştir⁵⁴.

2.5.1. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları

Bakterilerin direnç mekanizmalarının anlaşılabilir olması için antibiyotiklerin etki mekanizmalarının iyi anlaşılması gerekmektedir. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları; hücre duvarı biyosentezinin inhibe edilmesi ve litik enzimlerin aktive edilmesi, sitoplazma membranının permeabilitesinin arttırılması, protein sentezinin engellenmesi, DNA replikasyonunun engellenmesi veya DNA kontrolündeki mRNA sentezinin bozulması, intermediyer metabolizmayı bozmak şeklinde beş grup halinde belirtilir^{4,9}. (Tablo 2.2)

2.5.1.1. Hücre duvarı biyosentezinin inhibe edilmesi ve litik enzimlerin aktive edilmesi

Bakteri hücresi bütün hücrelerde bulunan sitoplazma membranına ek olarak hücre duvarına sahiptir. Hücre duvarının görevi bakteri sitoplazmasındaki yüksek osmotik basınca direnerek hücre bütünlüğünü korumaktır. Bu duvar herhangi bir nedenle zayıflayacak olursa veya üretilemezse hücre şişer ve parçalanır⁹. Penisilin ve sefalosporinler dahil olmak üzere β -laktamlar, hücre duvarı öncüsü olan peptidoglikanın transpeptidasyon çapraz bağlama adımını inhibe ederek hücre duvarının sentezini bozarak etki gösterirler⁴. Ayrıca penisilinlere duyarlı bakterilerde, otolizinler veya murein hidrolazlar denilen litik enzimler bulunur. Penisilinler ve sefalosporinler doğal otolizin inhibitörlerini bloke ederek otolizinlerin etkinliğini arttırmaları ve hücrenin lizis suretiyle ölmesine sebep olurlar⁹. Vankomisin ayrıca transpeptidazın terminal D-Ala-D-Ala peptidil kuyruğunu çapraz bağlamasını bloke ederek peptidoglikan sentezini hedefler. Bir enzimi hedeflemek yerine, vankomisin ve diğer glikopeptidler bu kuyruğa güçlü bir hidrojen bağlama ağı yoluyla bağlanarak hücre duvarı yapısının ilerlemesini engeller⁴.

2.5.1.2. Sitoplazma membranının permeabilitesinin artırılması

Sitoplazma membranı, osmotik bir bariyer görevi yapar. Deterjan özelliğine sahip antibiyotikler ve bazı antiseptikler sitoplazma membranının permeabilitesini arttırarak, sitoplazma içindeki bileşiklerin hücreden dışarı sızmasına neden olarak bakterisid etki oluştururlar⁹.

2.5.1.3. Protein sentezinin engellenmesi

Birkaç antibiyotik sınıfı, bakteriyel ribozomda protein sentezini hedef alır. Eritromisin dahil olmak üzere doğal üründen türetilmiş makrolid ailesi, polipeptit çıkış tüneline bağlanan daha büyük 50S alt birimini hedefler. Linezolid dahil oksazolidinonlar gibi sentetik olarak türetilen antibiyotikler de 50S alt birimine bağlanır. Doğal ürünlerden türetilen başka bir antibiyotik sınıfı olan tetrasiklinler, yapı bloklarını içeren aminoasil-tRNA için alıcı bölgesinde daha küçük 30S alt birimine bağlanır⁴.

2.5.1.4. DNA replikasyonunun engellenmesi veya DNA kontrolündeki mRNA sentezinin bozulması

Bu grup antibiyotiklerin ana hedefi, nükleik asit replikasyonu ve onarım mekanizmalarıdır. Siprofloksasin dahil sentetik antibiyotik kinolon sınıfı, kopyalanmış DNA'nın çözülmesine yardımcı olan DNA girazı (DNA topoizomeras II) hedefler. Bu girazlar, kopyalanan süper bobindeki burulma baskısını hafifletmek için DNA'nın her iki ipliğinde de kesikler yapar. Kinolonlar bu bölünme bölgelerine bağlanarak DNA'yı stabilize eder ve böylece sistemin daha fazla onarılmasını önler⁴.

2.5.1.5. İntermediyer metabolizmayı bozmak

Bakterilerin metabolizması için gerekli metabolitlerin sentezini önler^{4,9}. Bakterilerdeki folik asit yollarını hedefleyen sülfametizol dahil olmak üzere sülfonamid (sülfa) ilaçları folat biyosentezini engelleyerek etki gösterir. Bu ilaçlar, folik asit biyosentezinde anahtar bir öncü olan p- aminobenzoik asidin yapısal taklitleridir⁴.

Tablo 2.2. Kemoterapiklerin etki mekanizmalarına göre gruplandırılması ve bazı örnekler⁹

1. Hücre duvarı biyosentezinin inhibe edilmesi ve litik enzimlerin aktive edilmesi	3.Ribozomlarda protein sentezini bozanlar
Penisilinler	Kloramfenikol
Sefalosporinler	Eritromisin ve diğer makrolidler
Aztreonam	Tetrasiklinler
İmipenem	Kuinipristin-dalfopristin
Basitrasin	Linezolid
Vankomisin	Aminoglikozidler
Teikoplanin	4.Bakteri genetik materyali üzerinde etki yapanlar
2. Sitoplazma membranının permeabilitesini bozanlar	Rifampisin ve diğer rifamisinler
Polimiksinler	Nalidiksik asit
Gramisidin	Flurokinolonlar
Nistatin	5.İntermediyer metabolizmayı bozanlar
Amfoterisin B	Sulfonamidler, trimetoprim
Ketakonazol ve diğer antifungal imidazoller	Sulfonlar
Flukonazol ve diğer antifungal triazoller	İzoniazit, etambutol,PAS

2.5.2. Antibiyotik direncinin ortak mekanizmaları

Antibiyotik direnci; bir mikroorganizma türünün bazı suşlarının antibiyotikten etkilenmemesi ya da antibiyotiğe duyarlı bir suşun çeşitli direnç mekanizmalarından biri ile dirençli hale dönmesi olarak tanımlanır³. Bazı bakteri türleri, belirli antibiyotiklere doğal olarak dirençlidir ve bu duruma doğal direnç denir. Direncin ikinci türü ise kazanılmış dirençtir. Kazanılmış dirençte mikroorganizmaların kemoterapötik ile ilk temasında dirençli olmamasına rağmen temas süresi ve sıklığında artma sonucunda direnç görülmesidir. Kazanılmış direnç bakterinin kromozomlarında oluşan mutasyon sonucu veya bakterinin ortamdan ya da diğer bakterilerden, transdüksiyon, transformasyon ve konjugasyon olaylarından biri vasıtasıyla, direnç yapan gen paketini almasıyla meydana gelir⁹.

Mikroorganizmalarda kazanılmış antibiyotik direncinin mekanizmaları Tablo 2.3'de gösterilmiştir^{4,9}. Direnç gelişmesi tedaviyi güçleştirmekte ve ekonomik kayba neden olmaktadır². Antibiyotiklere karşı direncin artması ve yayılması hem bireyleri hem de toplumu tehdit eden enfeksiyonların riskini daha da arttırmaktadır. Patojenler, mevcut direnç mekanizmalarına ek olarak, yeni direnç mekanizmaları da geliştirmektedirler. Antibiyotiklerin aşırı kullanılması birçok mikroorganizma grubunda çoklu ilaç direncine sahip suşların ortaya çıkması ve yayılması için temel faktör olmuştur. Çoklu ilaç direncine sahip bakteriyel enfeksiyonlar; ölümlerin artmasına, hastanede daha uzun süreli kalmaya ve tedavi süresince daha yüksek maliyete yol açar¹. Bu nedenle enfeksiyonların ortadan kaldırılmasını sağlayacak antibiyotiklerin yanı sıra, dirençli patojenlere karşı da yeni antibiyotiklere gereksinim duyulmaktadır⁵⁶. Yeni antibiyotiklerin keşfi ve geliştirilmesi, ilaca dirençli patojenik bakterilerin sürekli ortaya çıkması nedeniyle hala çok önemlidir⁶.

Tablo 2.3. Mikroorganizmalarda antibiyotik direnç mekanizmaları^{4,9}

Direnç Mekanizması	Etkilediği Antibiyotikler
Kemoterapötik ilaç parçalayıcı enzim salınması	Penisilinler, sefalosporinler
İlacın bakteri hücresi içinde enzimatik modifikasyonu sonucu etkinliğinin azaltılması	Aminoglikozidler
Kemoterapötik ilacın hedefine bağlanmasının azaltılması ve enzim süstitüsüyonu	Aminoglikozidler, penisilinler, rifampisin
Bakteri hücre çeperinin ilaca permeabilitesinin ve ilacı içine almasının azaltılması	Penisilinler, tetrasiklinler kloramfenikol
İlacı dışarı pompalayan aktif eflüks proteini sentezlenmesi	Penisilinler, tetrasiklin, eritromisin

2.6. Antimikrobiyal Etki Çalışmalarında Kullanılan Mikroorganizmalar

2.6.1. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

Gram pozitif bakterilerden olan Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (*MRSA*) en iyi bilinen süper bakterilerlerden biridir^{57,58}. *MRSA*'ya karşı etkili özel sefalosporinler dışındaki β -laktam antibiyotiklerin düşük afinite gösterdiği ek bir penisilin-bağlayan proteine (PBP2a veya yeni keşfedilen PBP2c) sahip olan *S. aureus* izolatlarıdır⁵⁹. İlk yıllarda hastane enfeksiyonu oluşturan bir mikroorganizma olarak kabul edilen *MRSA* enfeksiyonu artık toplumdan kazanılmış bir enfeksiyon haline dönüşmüştür. Toplumda gösterdiği geniş yayılım nedeniyle *MRSA* enfeksiyonları toplumsal-kaynaklı *MRSA* (*TK-MRSA*) ve hastane kaynaklı *MRSA* (*HK-MRSA*) olmak üzere ikiye ayrılmıştır. *TK-MRSA* enfeksiyonları *HK-MRSA* enfeksiyonlarına göre daha ürkütücü boyutlara ulaşmıştır ve sayıları her geçen gün artmaktadır. Diğer taraftan, *HA-MRSA* sıklıkla bakteriyemi, sepsis, pnömoni, cerrahi alan ve yara enfeksiyonlarına yol açmaktadır⁵⁷. *MRSA* hem hastane hem de toplumda endemik olan tüm dünyada morbidite ve mortalitenin başlıca nedenleri arasında yer alır⁵⁹. *MRSA* suşları tedavi seçeneklerinin kısıtlılığı, tedavide kullanılan antibiyotikler ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin maliyeti nedeniyle tüm dünyada halen ciddi bir sağlık sorunudur. *MRSA* suşları tüm beta-laktam grubu antibiyotiklere (beşinci kuşak sefalosporinler olan seftarolin ve seftobiprol hariç) dirençli olmakla birlikte makrolidler, linkozamidler, kinolonlar ve aminoglikozidlere de direnç gösterebilmektedir. Son yıllarda artış gösteren bu çoklu antibiyotik direnci, ciddi

MRSA enfeksiyonlarında antimikrobiyal tedavi seçeneklerini kısıtlayabilecek boyutlara ulaşmıştır⁶⁰.

2.6.2. *Staphylococcus aureus*

Gram pozitif bakterilerden olan *Staphylococcus aureus* toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların en önemli etkenlerinden olup, lokal ve sistemik birçok hastalığa sebep olabilir. *Staphylococcus aureus* türünün oluşturduğu belli başlı enfeksiyonlara; başta deri ve mukoza lokalizasyonları olmak üzere, yaygın deri döküntüleri ile seyreden enfeksiyonlar, sepsis ve endokarditler, sistem ve organ enfeksiyonları ve besin zehirlenmeleri örnek olarak verilebilir^{60,61}.

2.6.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Gram negatif bakterilerden olan *Pseudomonas aeruginosa* türü insanlarda ve özellikle çeşitli nedenlerle savunma mekanizmaları aksamış kimselerde önemli hastalıklar oluşturur⁶¹. Hastane enfeksiyonlarının en sık rastlanan etkenlerinden olan *Pseudomonas aeruginosa* antibiyotiklere dirençli olması nedeni ile ve oluşturduğu enfeksiyonlara bağlı yüksek mortalite ve morbidite ile önemli sorun oluşturmaktadır⁶². Antiseptiklerin birçoğuna ve antibiyotiklere dirençli olduğu için hastane ortamında kolayca yuvalanır ve çeşitli hastane enfeksiyonlarına neden olur. Yaptığı başlıca enfeksiyonlara yanık yarası enfeksiyonları, kronikleşmeye eğimli idrar yolları enfeksiyonları, menenjitler, kornea ülseri, panoftalmi, bronşit, bronkopnömoni, septisemi, orta kulak enfeksiyonları, çocuklarda diyareler ayrıca sistik fibrozis ve diğer enfeksiyonlar örnek verilebilir⁶¹.

2.6.4. *Escherichia coli*

Gram negatif bakterilerden olan *Escherichia coli* normal bağırsak florasının baskın patojenik olmayan üyelerindedir. Bununla birlikte, bazı *E. coli* suşları en sağlam insan konakçılarda bile gastrointestinal, üriner veya merkezi sinir sistemi hastalıklarına neden olma yeteneği geliştirmişlerdir⁶³. Patojenik olan *E. coli* suşları bağırsak dışı enfeksiyonlara (ekstraintestinal) ve bağırsak enfeksiyonlarına (intestinal) neden olanlar olarak ikiye ayrılmaktadır⁶⁴. Patojenik *E. coli* suşları diyare, peritonitis, mastitis, gastroenteritis, septisemi, neonatalmenenjit, üriner sistem enfeksiyonu, hemolitik üremik sendrom, solunum sistemi enfeksiyonu, ishal, apse, sinüzit ve pnömoniye sebep olur^{65,66}.

2.6.5. *Enterococcus faecalis*

Gram pozitif bakterilerden olup memeli gastrointestinal florasının her yerinde bulunan *Enterococcus faecalis*, hastane enfeksiyonlarının önde gelen bir nedeni ve büyüyen bir halk sağlığı sorunudur. Bu enfeksiyonlardan sorumlu enterokoklar genellikle birden fazla antibiyotiğe dirençlidir ve antibiyotik dirençleri edinme ve yayma yetenekleriyle ün salmışlardır⁶⁷. *Enterococcus faecalis*, MRSA gibi tamamen farklı bir diğer bakteriye başarılı bir şekilde direnç genlerinin geçişini sağlayabilen bir bakteridir⁵⁷. *Enterococcus faecalis*, komplike olmayan idrar yolu ve yara enfeksiyonlarına neden olabilen, aynı zamanda enfektif endokardit gibi komplike ve ciddi enfeksiyonlara da neden olabilen patojendir⁶⁸.

2.6.6. *Candida albicans*

Candida albicans, sıklıkla cilt ve mukoza florasının iyi huylu bir üyesi olan kommensal bir mantardır. Bununla birlikte, *C. albicans*, mukozal membranların hastalığına neden olabilir⁶⁹. *C. albicans* türünün çarpıcı bir özelliği, tek hücreli tomurcuklanan bir maya olarak veya filamentli yalancı hif ve hif formlarında büyüme yeteneğidir. Hifal formu, epitel hücrelerini istila ederek ve doku hasarına neden olarak hastalığa neden olmada önemli bir role sahiptir. *C. albicans* vulvovajinal kandidiyazisine, oral ve özofagus kandidiyazisine, yanıklarda ve yeni doğan (özellikle prematüre) bebekler de cilt enfeksiyonlarına neden olur. Yoğun bakım ünitelerindeki hassas hasta gruplarında ve immün sistemi zayıf hastalarda, *C. albicans* enfeksiyonu iç organlara yayıldığında yayılmış kandidiyaza dönüşebilen kandidemi olarak bilinen bir kan dolaşımı enfeksiyonuna neden olabilir. Farklı araştırmalarda kandidemi ve yaygın kandidiyazis, %30-50 arasında belgelenen ölüm oranlarıyla son derece ciddi tıbbi durumlardır; bazı araştırmalar, bunların hastane enfeksiyonlarından kaynaklanan ikinci en yaygın ölüm nedeni olduğunu bulmuştur⁶⁹.

2.6.7. *Candida parapsilosis*

Maya mantarı olan *C. parapsilosis* hücreleri oval, yuvarlak veya silindirik şekiller gösterir. *C. parapsilosis* gerçek hif oluşturmaz ve maya fazında veya psödohifal formda bulunur. *C. parapsilosis* tipik olarak insan derisinin bir kommensalidir ve patojenitesi sağlam deri ile sınırlıdır. *C. parapsilosis*, total parenteral beslenmede büyüme ve kateterler ve diğer implante edilmiş cihazlar üzerinde biyofilm oluşturma, elle taşıma ile

nozokomiyal yayılma ve hastane ortamında kalıcılığı ile ünlüdür. *C. parapsilosis*, kritik hastalığı olan yenidoğanlarda özel bir endişe kaynağıdır ve Birleşik Krallık'ta düşük doğum ağırlıklı bebeklerde görülen tüm invaziv mantar enfeksiyonlarının dörtte birinden fazlasına ve Kuzey Amerika'da yenidoğan *Candida* kan dolaşımı enfeksiyonlarının üçte birine neden olur. Ek olarak, sıklıkla neonatal mortalite ile ilişkili olduğu birçok yenidoğan yoğun bakım ünitesinde izole edilen baskın mantar organizmasıdır⁷⁰.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Mantar numunesi

Amanita phalloides mantarları Düzce/Gümüşova/Yeşilyayla Kasabası ormanlık alanlarından 16.11.2011 yılında Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ertuğrul Kaya tarafından toplanmış, teşhis edilmiş, 50-60° C hava akımı altında 12 saatte kurutulup öğütülerek toz haline getirilmiştir ve çalışmamızda kullanılmak üzere tarafımıza sağlanmıştır.

3.1.2. Kullanılan test mikroorganizmaları

Antimikrobiyal çalışmalarda kullanılan test mikroorganizmaları beş bakteri ve iki maya suşundan oluşmaktadır. *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida albicans* (klinik izolat), metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA-ATCC 29213), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (klinik izolat), metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA-ATCC 43300) Düzce Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi (Merkezi) Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

3.1.3. Laboratuvar koşulları

Çalışmamızda mantar ekstraksiyonu için Düzce Üniversitesi Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜGETAM) laboratuvarları, antimikrobiyal etkinlik testleri için Düzce Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi (Merkezi) bakteriyoloji laboratuvarı ve alfa-beta amanitin madde ve miktar tayini için Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji ana bilim dalı laboratuvarları kullanılmıştır.

3.1.4. Kullanılan kimyasallar

Kloroform: Fluka

Aseton: Sigma Aldrich

Metanol: Fisher Chemical

Amonyum asetat: Merck

Asetonitril: Sigma-Aldrich
Asetik asit: Sigma-Aldrich
Alfa amanitin standardı: Sigma-Aldrich
Beta amanitin standardı: Enzo Life Sciences

3.1.5. Cihazlar ve teknik materyaller

Antibiyotikli ve boş diskler: Bioanalyse (Ankara, Türkiye)
Müller hinton agar: Becton (Dickinson,Almanya)
McFarland Cihazı: Densicheck plus
Etüv: Dihan Scientific İncubatör
Çalkalamalı etüv: Kmstech Laboratory Instruments
Rotary Evaporatör: Kmstech Laboratory Instruments
Liyofilizatör: Christ Alpha 1-2 LO plus
Hassas terazi: Weightlab Instruments
Membran Filtre: Welch Materials (0.22 µm)
Distile su cihazı: Human Power I
pH metre: XS Instruments
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC): Shimadzu (Japonya)
Santrifüj: DLAB Scientific
Vortex: Four E'S Scientific
Otomatik mikropipetler: Brand
Mikroenjektör: Hamilton
Buzdolabı
Ependorf tüpler
Petri kabı, eküvyon çubuğu
Balon joje, erlen, saat camı, mezür vb cam malzemeler

3.2. Yöntem

3.2.1. Mantar ekstraktının hazırlanışı

50-60° C hava akımı altında 12 saatte kurutulup öğütülerek toz haline getirilmiş mantar numunesinden her çözücü için 25 er gram tartılarak üzerine 250 şer ml (1/10 oranında) kloroform, aseton, metanol ve distile su ilave edildi. Çeşitli fizikokimyasal özelliklere sahip bileşikleri çıkarmak için polaritesi farklı dört çözücü kullanıldı. Oda sıcaklığında

48 saat çalkalamalı etüve koyuldu. (Resim 3.1) İki kez filtre kağıdı ile süzüldü. (Resim 3.2) Kloroform, aseton ve metanol çözücüleri içeren ekstraktlar rotary evaporatöre takılarak 30° C de 10 ml kalıncaya kadar uçuruldu⁷¹. (Resim 3.3) Distile su içeren ekstrakt derin dondurucuda dondurulduktan sonra liyofilizatöre takılıp suyun tam kuruluğa kadar uzaklaştırılması sağlandı. (Resim 3.4) Metanol, aseton ve kloroforma ait ekstrelerde kaç gram madde olduğunun tespiti için ekstrelerden birer mililitre alınıp saat camına koyuldu ve çözücüsünün uçması sağlandıktan sonra tekrarlı ölçümlerle bir mililitrede kaç gram madde çözüldüğü tespit edildi. Daha sonra bu ekstraktlardan gerekli seyreltme işlemi yapılarak kloroform çözücüsüne ait ekstreten 150 mg/ml (KE), aseton çözücüsüne ait ekstreten 150 mg/ml (AE), metanol çözücüsüne ait ekstreten 150 mg/ml (ME) stok çözeltileri hazırlandı. Distile suyun tamamı liyofilizatörde uçurulduğu için stok çözeltiler katı ekstraktan hassas terazi ile tartılıp tekrar distile suda çözülerek distile su çözücüsüne ait ekstreten 150 mg/ml (SE1), distile su çözücüsüne ait ekstreten 300 mg/ml (SE2), distile su çözücüsüne ait ekstreten 600 mg/ml (SE3) stok çözeltileri hazırlandı. Stok çözeltiler 0.22 µm lik membran filtrelerden geçirilerek steril hale getirildi. Ekstraktlar kullanılıncaya kadar +4° C de buzdolabında muhafaza edildi.



Resim 3.1. Çalkalamalı etüv



Resim 3.2. Filtrelenen ekstraktlar



Resim 3.3. Rotary evaparotör



Resim 3.4. Liyofilizatör

3.2.2. Ekstraksiyon verimi

Bitki ekstraksiyonu dört farklı çözücü kullanılarak elde edilmiş olup, en verimli ekstrakt distile su ile sağlandı.

3.2.3. Antimikrobiyal aktivite tayini

Mantar ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla disk difüzyon yöntemi (Kirby-Bauer yöntemi) kullanıldı⁷². Ekstrelerin konsantrasyon stokları kullanılarak antimikrobiyal aktivite tayini amacıyla disk difüzyon testi bakteriler için European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterleri; mayalar için CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) (CLSI standard M44-A2) kriterleri göz önüne alınarak uygulandı.

3.2.3.1. Besiyerlerinin hazırlanması ve saklanması

Disk difüzyon yönteminde bakteriler için Mueller-Hinton agar (MHA) (Becton-Dickinson,Almanya) kullanıldı. Mayalar için % 2 glukoz ve 0,5 µg/ml metilen mavisi eklenmiş MHA besiyeri kullanıldı. Hazırlanan besiyeri 15 dk 121 °C'de otoklavda sterilize edildikten sonra bek alevi yanında derinlik 4 mm±0.5 (150 mm'lik yuvarlak petriye 71 ml) olacak şekilde petrilere dağıtıldı. Petriler daha sonra kullanılmak üzere +4 °C'de buzdolabında saklandı.

3.2.3.2. İnokulum hazırlanması

Bakteri ve maya süspansiyonu hazırlamak üzere doğrudan koloni süspansiyon yöntemi kullanıldı. İnokulum süspansiyonu hazırlamak üzere mikroorganizmanın seçici olmayan besiyerindeki 16-24 saatlik kültürü kullanıldı. Mikroorganizmaların benzer morfoloji gösteren kolonilerinden bir kaç tanesi steril öze yardımıyla alındı ve steril tuzlu su (%0.85 NaCl) içinde süspansiyon edilip vortekslendi. Süspansiyonun yoğunluğu, bakteriler için *E. coli*'nin yaklaşık 1-2 x 10⁸ CFU/ ml'sine karşılık gelen; mayalar için 1- 5x10⁶ maya/ml'sine karşılık gelen McFarland 0.5 standardı ile eşit olacak şekilde Densitometre (McFarland) cihazı ile ayarlandı.

3.2.3.3. Agar plaklarının inokülasyonu ve antibiyotik disklerin yerleştirilmesi

Steril pamuklu eküvyon çubuğu, inokulum süspansiyonu içine daldırılıp pamuktaki fazla sıvı, çubuğun pamuklu kısmını tüpün iç kenarına bastırıp döndürerek atıldı. Pamuktaki inokulum agar yüzeyinin her tarafına eşit olacak şekilde üç yönde (60°

döndürülerek) çubuk yardımıyla yayıldı. İnokulum süspansiyonları hazırlandıktan sonra 15 dakika içinde besiyerine yayıldı. Ticari olarak temin edilen 6 mm lik boş disklerle (Bioanalyse, Ankara, Türkiye), kloroform (3 mg/disk), aseton (3 mg/disk), metanol (3 mg/disk), ve distile su (3 mg/disk, 6 mg/disk, 12 mg/disk) ile hazırlanan bitki ekstratlarından steril şartlarda 20 µl emdirildi. Negatif kontrol olarak da kloroform, aseton, metanol ve steril distile su çözücülerinden 20 µl emdirildi. Pozitif kontrol olarak bakteriler için gentamisin (10 µg), gentamisin (30 µg), penisilin G (1U), fusidik asit (10 µg), kloramfenikol (30 µg), piperasilin (30 µg), ampisilin (2 µg), amoksisilin/klavulanik asit (20/10 µg); mayalar için nistatin (100 IU) ve flukonazol (25 µg) içeren diskler kullanıldı (Bioanalyse, Ankara, Türkiye). Diskler, inokülasyon sonrası 15 dakika içinde agar yüzeyine steril pens yardımıyla yerleştirildi.

3.2.3.4. Plakların inkübasyonu ve zon çapı ölçümü

Bakteri süspansiyonu inoküle edilen ve antibiyotik diskleri yerleştirilen plaklar en geç 15 dakika içinde ters çevrilerek inkübasyona kaldırıldı. Bakteriler için 35±1°C 24 saat; mayalar için; 35±1°C 20-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası zon sınırları, plak gözden 30 cm uzakta tutularak, çıplak gözle bakıldığında üremenin tam olarak inhibe olduğu nokta olarak değerlendirildi. MHA plaklarının okuması, yansıyan ışıkla aydınlatılmış koyu renkli bir zemin üzerinde, plağın arka yüzünden yapıldı. Zon çapları kumpas yardımıyla ölçüldü. Deneylerin hepsi üç tekrarlı olarak çalışıldı.

3.2.4. *Amanita phalloides* ekstraktlarında alfa ve beta amanitin tayini

Antimikrobiyal tayin için kullanılan mantar ekstratlarının içerisindeki α ve β amanitinin kalitatif ve kantitatif tespiti amacıyla HPLC sistemi kullanıldı^{22,30,41,45,53}.

3.2.4.1. HPLC analiz koşulları

Degazer, pompa ve dedektör ile analitik HPLC sistemleri oluşturuldu. Sistemde degazer (Shimadzu DGU-20A5), 0.02 ml/dakika hassasiyetli pompa (Shimadzu LC-20AT, bilgi işlem ünitesi (Shimadzu CBM-20A), ayırıcı vana, 20 µL manuel enjektörlü sample loop, 5µm partiküllü C18 4.6 X 250 mm (Welch Ultisil) kolon, UV dedektör (Shimadzu SPD-20A) sistemi kullanıldı (Resim 3.5). Mobil faz akış hızı 1 ml/dakika izokratik olarak kullanıldı²². Birinci mobil faz olarak Amonyum asetat (50 mM, pH: 5.5 asetik asit ile ayarlandı.) ve asetonitril (90:10, v/v) kullanıldı⁷³. Kolon sıcaklığı 40°C olarak ayarlandı. 290-303 nm dalga boyunda çalışıldı. Alfa ve beta amanitinin UV

spektrumunda 303 nm’de maksimum absorba sahip olduğu bilinmektedir^{22,45,53}. Analiz süresi 40 dakikadır. Öncelikle alfa amanitin standardı için 7 noktalı 10- 20- 50- 100- 500- 1000- 2000 ng/ml uygulandı ve tutulma zamanı ile toksin UV spektrumu kaydedildi. Beta amanitin standardı için 6 noktalı 10- 20- 50- 100- 500- 1000 ng/ml uygulandı ve tutulma zamanı ile toksin UV spektrumu kaydedildi. Alfa ve beta amanitine ait kalibrasyon eğrileri çizildi. Daha sonra *Amanita phalloides* mantarına ait KE, AE, ME, SE1, SE2, SE3 uygulanarak bu ekstrelerin içerisindeki alfa ve beta amanitin madde ve miktar tayini HPLC sistemi ile yapıldı.

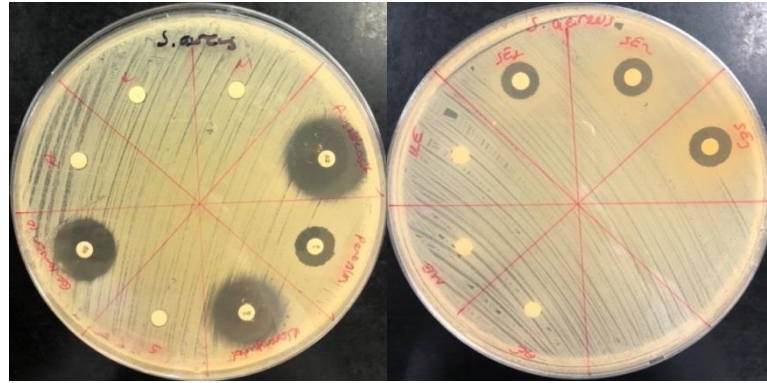


Resim 3.5. Çalışmada kullanılan HPLC cihazı

4. BULGULAR

4.1. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

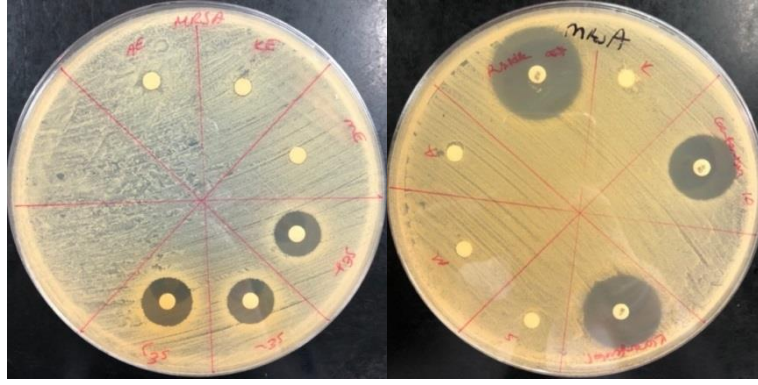
Bu çalışmada, *Amanita phalloides* mantarının kloroform, aseton, metanol ve distile sudaki ekstraktlarının bakteriler ve mayalar üzerine olan etkilerini saptamak amacıyla disk difüzyon yöntemi kullanıldı. *Amanita phalloides* ekstraktlarının, ön denemeler sonucu belirlenen kloroform, aseton ve metanol çözücüleri için 150 mg/ml; distile su için ise üç ayrı konsantrasyonda 150, 300, 600 mg/ml stok çözeltileri hazırlandı. Boş diske stok çözeltilerden 20 µl ekstrakt emdirilerek petrilere yerleştirildi ve ekstraktların kullanılan test mikroorganizmalarına karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları ölçülerek Tablo 4.1’de verildi. Negatif kontrol olarak kloroform, aseton, metanol ve steril distile su kullanıldı. Pozitif kontrol olarak bakteriler için gentamisin (10 µg), gentamisin (30 µg), penisilin G (1U), fusidik asit (10 µg), kloramfenikol (30 µg), piperasilin (30 µg), ampisilin (2 µg), amoksisilin/ klavulanik asit (20/10 µg); mayalar için nistatin (100 IU) ve flukonazol (25 µg) içeren diskler kullanıldı (Bioanalyse, Ankara, Türkiye). İnhibisyon zonları, disk ile beraber inhibisyon zonunun tüm sınırı ölçülerek milimetrik olarak kaydedildi. (Resim 4.1 - 4.7).



Resim 4.1. MSSA (ATCC 29213) türüne karşı bitki ekstraktlarının, negatif ve pozitif kontrollerin inhibisyon zonları

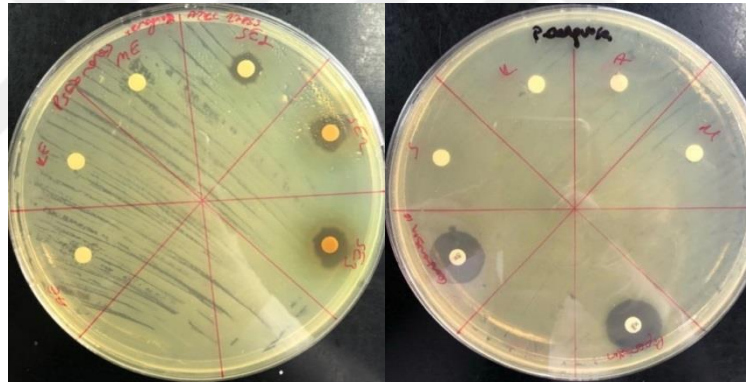
SE1: Distile su ekstraktı 150 mg/ml
SE2: Distile su ekstraktı 300 mg/ml
SE3: Distile su ekstraktı 600 mg/ml
KE: Kloroform ekstraktı 150 mg/ml
AE: Aseton ekstraktı 150 mg/ml

ME: Metanol ekstraktı 150 mg/ml
M: Metanol
A: Aseton
K: Kloroform
S: Distile su



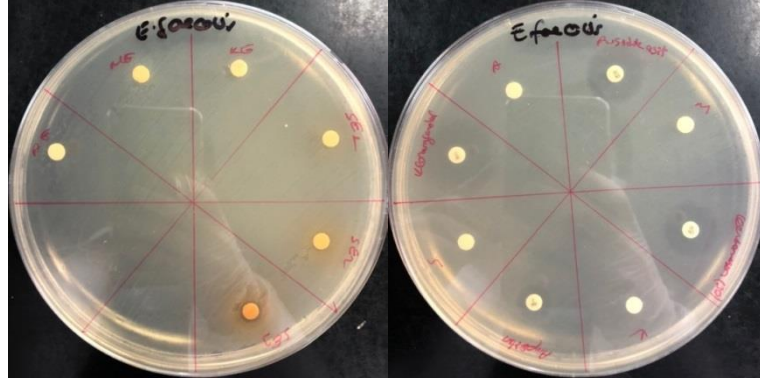
Resim 4.2. MRSA (ATCC 43300) türüne karşı bitki ekstraktlarının, negatif ve pozitif kontrollerin inhibisyon zonları

SE1: Distile su ekstraktı 150 mg/ml	ME: Metanol ekstarktı 150 mg/ml
SE2: Distile su ekstraktı 300 mg/ml	M: Metanol
SE3: Distile su ekstraktı 600 mg/ml	A: Aseton
KE: Kloroform ekstraktı 150 mg/ml	K: Kloroform
AE: Aseton ekstraktı 150 mg/ml	S: Distile su



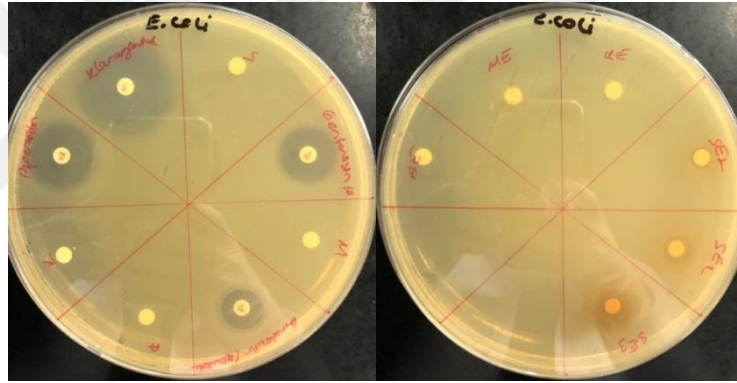
Resim 4.3. *Pseudomonas aeruginosa* (klinik izolat) türüne karşı bitki ekstraktlarının, negatif ve pozitif kontrollerin inhibisyon zonları

SE1: Distile su ekstraktı 150 mg/ml	ME: Metanol ekstarktı 150 mg/ml
SE2: Distile su ekstraktı 300 mg/ml	M: Metanol
SE3: Distile su ekstraktı 600 mg/ml	A: Aseton
KE: Kloroform ekstraktı 150 mg/ml	K: Kloroform
AE: Aseton ekstraktı 150 mg/ml	S: Distile su



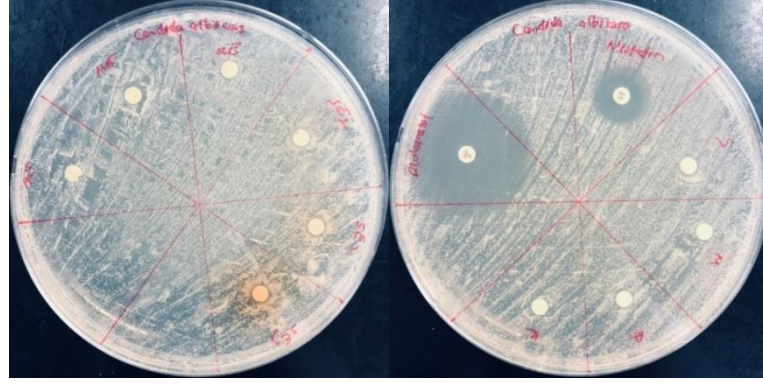
Resim 4.4. *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) türüne karşı bitki ekstraktlarının, negatif ve pozitif kontrollerin inhibisyon zonları

SE1: Distile su ekstraktı 150 mg/ml
 SE2: Distile su ekstraktı 300 mg/ml
 SE3: Distile su ekstraktı 600 mg/ml
 KE: Kloroform ekstraktı 150 mg/ml
 AE: Aseton ekstraktı 150 mg/ml
 ME: Metanol ekstraktı 150 mg/ml
 M: Metanol
 A: Aseton
 K: Kloroform
 S: Distile su



Resim 4.5. *Escherichia coli* (ATCC 25922) türüne karşı bitki ekstraktlarının, negatif ve pozitif kontrollerin inhibisyon zonları

SE1: Distile su ekstraktı 150 mg/ml
 SE2: Distile su ekstraktı 300 mg/ml
 SE3: Distile su ekstraktı 600 mg/ml
 KE: Kloroform ekstraktı 150 mg/ml
 AE: Aseton ekstraktı 150 mg/ml
 ME: Metanol ekstraktı 150 mg/ml
 M: Metanol
 A: Aseton
 K: Kloroform
 S: Distile su



Resim 4.6. *Candida albicans* (klinik izolat) türüne karşı bitki ekstraktlarının, negatif ve pozitif kontrollerin inhibisyon zonları

SE1: Distile su ekstraktı 150 mg/ml	ME: Metanol ekstarktı 150 mg/ml
SE2: Distile su ekstraktı 300 mg/ml	M: Metanol
SE3: Distile su ekstraktı 600 mg/ml	A: Aseton
KE:Kloroform ekstraktı 150 mg/ml	K: Kloroform
AE: Aseton ekstraktı 150 mg/ml	S: Distile su



Resim 4.7. *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) türüne karşı bitki ekstraktlarının, negatif ve pozitif kontrollerin inhibisyon zonları

SE1: Distile su ekstraktı 150 mg/ml	ME: Metanol ekstarktı 150 mg/ml
SE2: Distile su ekstraktı 300 mg/ml	M: Metanol
SE3: Distile su ekstraktı 600 mg/ml	A: Aseton
KE:Kloroform ekstraktı 150 mg/ml	K: Kloroform
AE: Aseton ekstraktı 150 mg/ml	S: Distile su

Tablo 4.1. *Amanita phalloides* mantarının antimikrobiyal aktivitesi

İnhibisyon Zonu (mm/20 µl/disk)*							
	<i>MSSA</i> (ATCC 29213)	<i>MRSA</i> (ATCC 43300)	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i> (klinik izolat)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>E.</i> <i>faecalis</i> (ATCC 29212)	<i>C.</i> <i>albicans</i> (klinik izolat)	<i>C.</i> <i>parapsilosis</i> (ATCC 22019)
KE	0	0	0	0	0	0	0
AE	0	0	0	0	0	0	0
ME	0	0	0	0	0	0	0
SE1	14,3 ± 0,6	16,3 ± 0,6	9,3 ± 1,5	0	0	0	0
SE2	15,0 ± 0,0	17,0 ± 0,0	10,0 ± 1,7	7,3 ± 0,6	7,0 ± 0,0	0	0
SE3	16,0 ± 0,0	19,0 ± 0,0	10,7 ± 1,2	10,7 ± 2,3	8,0 ± 0,0	0	0
Pozitif Kontrol							
Penisilin G (1U)	14,7 ± 0,6	-	-	-	-	-	-
Fusidik Asit (10 µg)	33,3 ± 5,9	31,3 ± 0,6	-	-	20,3 ± 1,2	-	-
Kloramfenikol (30 µg)	29,7 ± 5,1	29,3 ± 0,6	-	28,0 ± 3,5	24,3 ± 2,3	-	-
Gentamisin (10 µg)	24,0 ± 2,6	24,0 ± 1,7	19,3 ± 0,6	20,3 ± 2,3	-	-	-
Gentamisin (30 µg)	-	-	-	-	14,3 ± 2,3	-	-
Piperasilin (30µg)	-	-	20,3 ± 0,6	22,0 ± 3,5	-	-	-
Ampisilin (2 µg)	-	-	-	-	10,3 ± 0,6	-	-
Amoksasilin/ Klavulonik asit (20/10 µg)	-	-	-	19,3 ± 4,6	-	-	-
Nistatin (100IU)	-	-	-	-	-	16,3 ± 0,6	18,0 ± 0,0
Flukonazol (25 µg)	-	-	-	-	-	30,7 ± 1,2	34,0 ± 0,0
Negatif Kontrol							
Kloroform	0	0	0	0	0	0	0
Aseton	0	0	0	0	0	0	0
Metanol	0	0	0	0	0	0	0
Distile Su	0	0	0	0	0	0	0

- :Bu suşlarda standart kullanımı bulunmuyor.

SE1: Distile su ekstraktı 150 mg/ml

ME: Metanol ekstraktı 150 mg/ml

SE2: Distile su ekstraktı 300 mg/ml

KE: Kloroform ekstraktı 150 mg/ml

SE3: Distile su ekstraktı 600 mg/ml

AE: Aseton ekstraktı 150 mg/ml

(*) : Rakamlar inhibisyon zonlarının çaplarını göstermektedir, her disk 6mm çapındadır ve deneyler üç tekrarlı olarak çalışılmıştır.

Çalışmamızda *Amanita phalloides* distile su ekstraktlarının en yüksek zon açtığı bakteri türünün *MRSA* (ATCC 43300) olduğu saptandı. (Şekil 4.1) SE1'in *MRSA* (ATCC 43300) türü üzerinde $16,3 \pm 0,6$ mm zon oluşturduğu; sırasıyla SE2'nin oluşturduğu zon çapı $17,0 \pm 0,0$ mm, SE3'ün oluşturduğu zon çapı $19,0 \pm 0,0$ mm'dir. Artan konsantrasyonlarında oluşan zon çapının arttığı ve *MRSA* (ATCC 43300) türünde diğer bakteri türlerinden geniş olduğu belirlendi.

Amanita phalloides distile su ekstraktlarının Metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA-ATCC 29213) türü üzerinde de zon açtığı saptandı. SE1'in $14,3 \pm 0,6$ mm inhibisyon zonu oluşturduğu ve sırasıyla SE2'nin açtığı zon çapı $15,0 \pm 0,0$ mm, SE3'ün açtığı zon çapı $16,0 \pm 0,0$ mm'dir. (Şekil 4.2) Artan konsantrasyonlarında zon çapının da arttığı saptandı. SE3'ün açmış olduğu $16,0 \pm 0,0$ mm lik zon çapının pozitif kontrol olarak kullanılan Penisilin G (1 U) nin $14,7 \pm 0,6$ mm lik açmış olduğu zon çapından fazla olduğu tespit edildi.

SE1'in *Pseudomonas aeruginosa* (klinik izolat) türü üzerinde $9,3 \pm 1,5$ mm inhibisyon zonu açtığı ve sırasıyla SE2'nin açtığı zon çapı $10,0 \pm 1,7$ mm, SE3'ün açtığı zon çapı $10,7 \pm 1,2$ mm'dir. Artan konsantrasyonlarında açılan zonun arttığı saptandı. (Şekil 4.3)

SE1'in *Escherichia coli* (ATCC 25922) türü üzerinde inhibisyon zonu açmadığı saptandı. SE2'nin açtığı zon çapı $7,3 \pm 0,6$ mm, SE3'ün açtığı zon çapı $10,7 \pm 2,3$ mm'dir. Artan konsantrasyonda açılan zonun arttığı saptandı. (Şekil 4.4)

Amanita phalloides distile su ekstraktlarının en düşük antibakteriyel aktivitesi *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) türü üzerinde saptandı. SE2'nin açtığı zon çapı $7,0 \pm 0,0$ mm, SE3'ün açtığı zon çapı $8,0 \pm 0,0$ mm'dir. Artan konsantrasyonda açılan zonun arttığı saptandı. (Şekil 4.5)

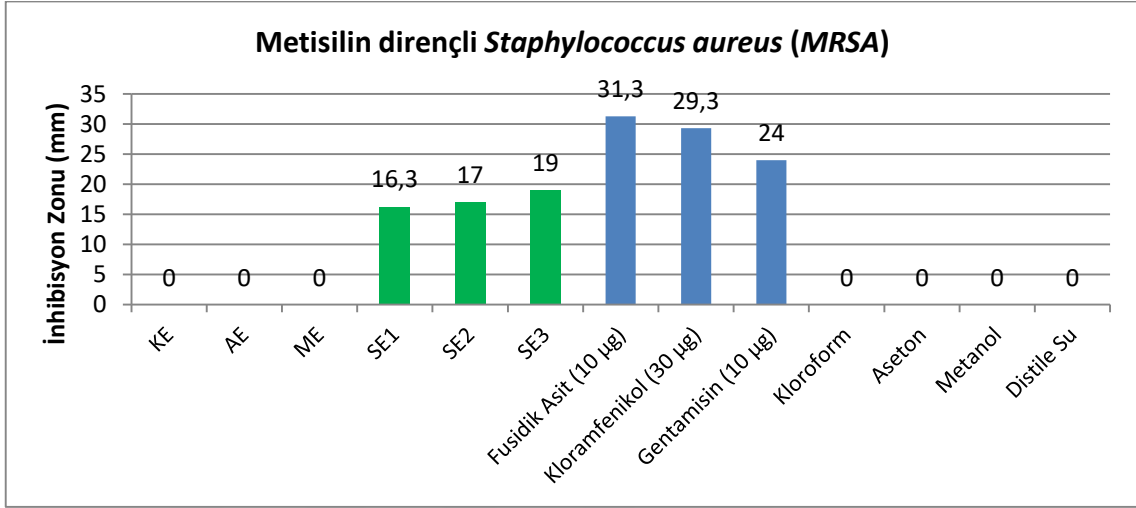
Amanita phalloides mantarının dört farklı çözücüde hazırlanan ekstraktlarının *Candida albicans* (klinik izolat) ve *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) türleri üzerine etkili olmadığı saptandı.

ME, AE ve KE' nin kullanılan mikroorganizmalar üzerinde etkili olmadığı saptandı.

Amanita phalloides mantarının distile su ile hazırlanan artan miktardaki konsantrasyonlarının daha fazla zon açtığı saptandı.

Pozitif kontrol olarak ticari olarak temin edilen disklerin antimikrobiyal etkileri Tablo 4.1’de gösterilmektedir.

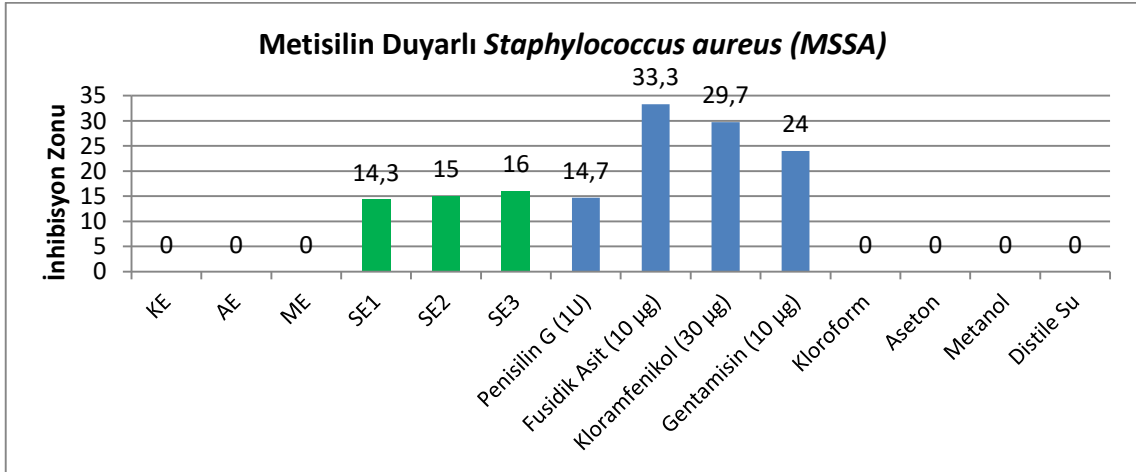
Negatif kontrol olarak disklere emdirilen çözücülerin antimikrobiyal etkisi saptanmadı.



Şekil 4.1. *A. phalloides* ekstraktlarının Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)’a karşı inhibisyon zon çapları

SE1: Distile su ekstraktı 150 mg/ml
SE2: Distile su ekstraktı 300 mg/ml
SE3: Distile su ekstraktı 600 mg/ml

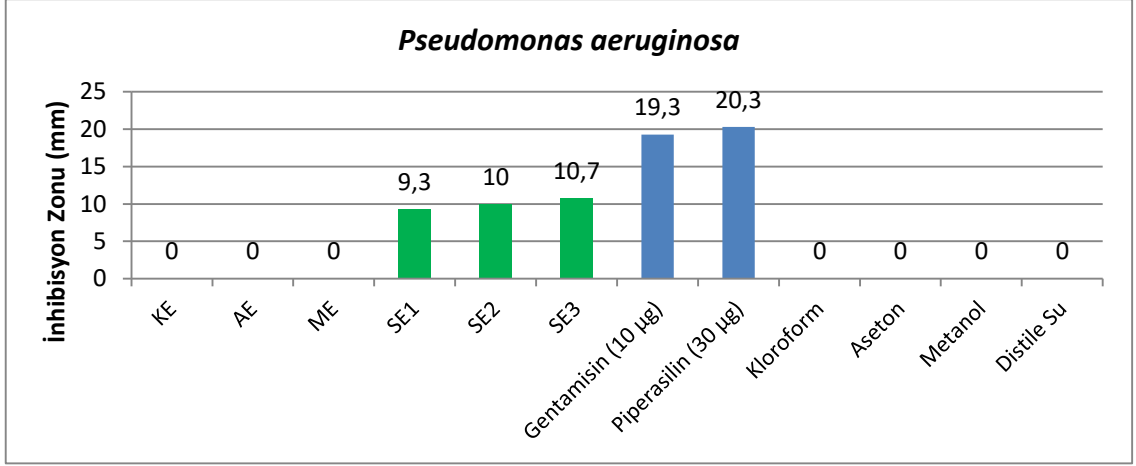
ME: Metanol ekstraktı 150 mg/ml
KE: Kloroform ekstraktı 150 mg/ml
AE: Aseton ekstraktı 150 mg/ml



Şekil 4.2. *A. phalloides* ekstraktlarının Metisilin Duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA)’a karşı inhibisyon zon çapları

SE1: Distile su ekstraktı 150 mg/ml
SE2: Distile su ekstraktı 300 mg/ml
SE3: Distile su ekstraktı 600 mg/ml

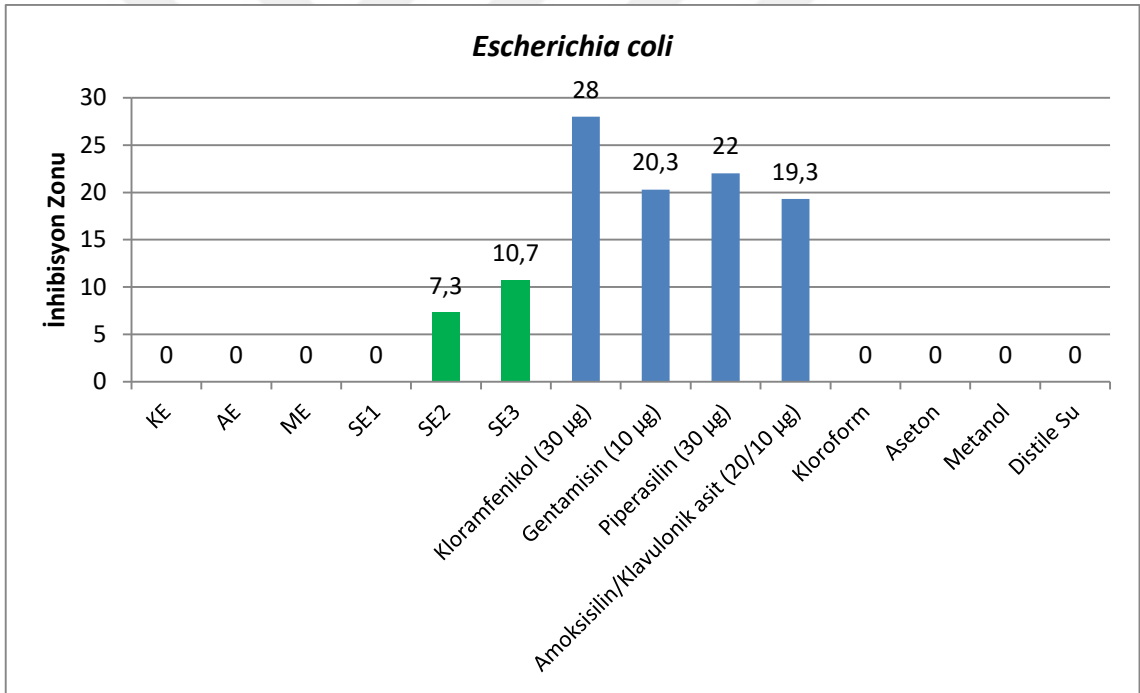
ME: Metanol ekstraktı 150 mg/ml
KE: Kloroform ekstraktı 150 mg/ml
AE: Aseton ekstraktı 150 mg/ml



Şekil 4.3. *A. phalloides* ekstraktlarının *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı inhibisyon zon çapları

SE1: Distile su ekstraktı 150 mg/ml
 SE2: Distile su ekstraktı 300 mg/ml
 SE3: Distile su ekstraktı 600 mg/ml

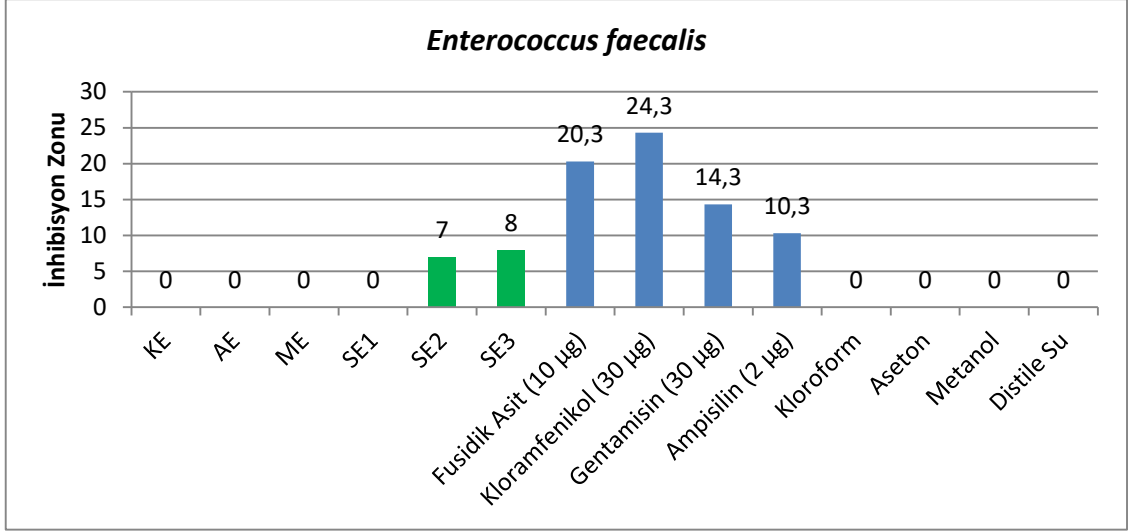
ME: Metanol ekstarktı 150 mg/ml
 KE: Kloroform ekstraktı 150 mg/ml
 AE: Aseton ekstraktı 150 mg/ml



Şekil 4.4. *A. phalloides* ekstraktlarının *Escherichia coli*'ye karşı inhibisyon zon çapları

SE1: Distile su ekstraktı 150 mg/ml
 SE2: Distile su ekstraktı 300 mg/ml
 SE3: Distile su ekstraktı 600 mg/ml

ME: Metanol ekstarktı 150 mg/ml
 KE: Kloroform ekstraktı 150 mg/ml
 AE: Aseton ekstraktı 150 mg/ml



Şekil 4.5. *A. phalloides* ekstraktlarının *Enterococcus faecalis*'e karşı inhibisyon zon çapları

SE1: Distile su ekstraktı 150 mg/ml
 SE2: Distile su ekstraktı 300 mg/ml
 SE3: Distile su ekstraktı 600 mg/ml

ME: Metanol ekstarktı 150 mg/ml
 KE: Kloroform ekstraktı 150 mg/ml
 AE: Aseton ekstraktı 150 mg/ml

4.2. *Amanita phalloides* Ekstraktlarında Alfa ve Beta Amanitin Tayini Bulguları

4.2.1. Alfa ve beta amanitin tayini

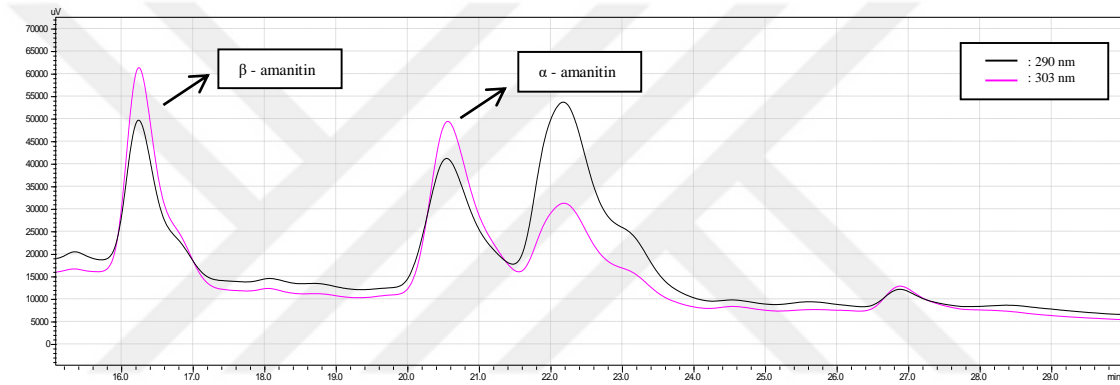
Hazırlanan KE, AE, ME, SE1, SE2 ve SE3 ekstrelerinin içerisindeki α ve β amanitin madde ve miktar tayini HPLC sistemi ile analiz edildi. HPLC sisteminde ilk önce α ve β amanitin standartları verilip piklerin tutulma zamanı ve miktar analizi için gerekli kalibrasyon eğrileri bulundu. Standartların tutulma zamanı α - amanitin için 20.29 dakika, β - amanitin için 16.47 dakikadır. Daha sonra farklı çözücülerdeki mantar ekstreleri HPLC sistemine verildi. Mantar ekstrelerine ait dalgaların α ve β amanitin olduğunu anlamak için mantar ekstreleri ve α - β amanitin standartlarının HPLC grafikleri karşılaştırılıp ekstrele ait dalgaların α ve β amanitin ile aynı dakikalarda ve aynı dalga boyunda pik verip vermediğine bakıldı. SE1'in HPLC sistemindeki grafiği Şekil 4.6'da gösterilmektedir. HPLC'den alınan verilere göre mantar ekstrelerinden distile su ile hazırlanan çözeltilerde ve metanol ile hazırlanan çözeltilerde α ve β amanitin varlığı saptandı. Kloroform ve aseton ile hazırlanan ekstrelerde α ve β amanitin varlığı saptanmadı. Sulu ekstrelerin ve metanol ekstrelerine ait α ve β amanitin tutulma zamanları Tablo 4.2'te gösterilmektedir.

Tablo 4.2. Metanol ve distile su ile hazırlanan ekstrele ait alfa ve beta amanitin dalgalarının tutulma zamanı.

Ekstrakt Adı	β - amanitin Tutulma Zamanı (Dak.)	α - amanitin Tutulma Zamanı (Dak.)
SE1	16.2	20.5
SE2	16.15	20.5
SE3	16.11	20.6
ME	16.06	20.4

SE1: Distile su ekstraktı 150 mg/ml
SE2: Distile su ekstraktı 300 mg/ml

SE3: Distile su ekstraktı 600 mg/ml
ME: Metanol ekstraktı 150 mg/ml



Şekil 4.6. SE1'e ait kromatogram

4.2.2. Alfa ve beta amanitin miktar analizi

Analizler üç tekrarlı olarak yapıldı. Kalibrasyon eğrisinin denklemine, ekstraktların analizinde elde edilen pik alanları uygulanarak madde miktarı ölçümü yapıldı. Sonuçlar Tablo 4.3' de gösterilmektedir. En yüksek α ve β amanitin miktarının SE3'de olduğu ve hazırlanan diğer sulu ekstraktlardaki konsantrasyonun düştükçe içerisindeki α ve β amanitin miktarının düştüğü tespit edildi. ME'nin de SE1'e yakın değerlerde α ve β amanitin içerdiği tespit edildi.

Tablo 4.3. Mantar ekstrelerindeki alfa ve beta amanitin miktarı (mg/ml)

	SE1	SE2	SE3	ME	AE	KE
α - amanitin (mg/ml)	7,45	12,12	20,50	9,40	0	0
β - amanitin (mg/ml)	9,84	16,11	36,57	7,65	0	0

SE1: Distile su ekstraktı 150 mg/ml
SE2: Distile su ekstraktı 300 mg/ml
SE3: Distile su ekstraktı 600 mg/ml

ME: Metanol ekstraktı 150 mg/ml
AE: Aseton ekstraktı 150 mg/ml
KE: Kloroform ekstraktı 150 mg/ml



5. TARTIŞMA ve SONUÇ

A. phalloides mantarının kloroform, aseton, metanol ve distile su ile hazırlanan ekstraktlarının antimikrobiyal etkinliği disk difüzyon testi ile araştırıldı. Disk difüzyon testi, A.W. Bauer, W.M. Kirby ve ark. tarafından 1960'lı yıllarda geliştirilmiştir ve mikrobiyoloji laboratuvarları tarafından en sık kullanılan antibiyotik duyarlılık testi olmuştur⁵⁹.

Amanita phalloides distile su ekstraktlarının en yüksek zon açtığı bakteri türünün *MRSA* (ATCC 43300) olduğu saptandı. SE3'ün *MRSA*'ya karşı açtığı zon çapı $19,0 \pm 0,0$ mm'dir. Pozitif kontrol grubu olarak kullandığımız gentamisin 10 (μg) $24,0 \pm 1,7$ mm zon açmıştır. Ekstraktın içerisindeki etkili olan bileşik/bileşiklerin *MRSA* üzerinde açtığı zon çapının pozitif kontrole yakın olduğu tespit edildi. *Amanita phalloides* mantarının distile su ile hazırlanan ekstraktının *MRSA* gibi direnç geliştiren ve dünyada yüksek morbidite ve mortalitaye sebep olan bir bakteri türüne karşı etkili olması önemli bir veri olarak dikkat çekmektedir.

Amanita phalloides distile su ekstraktlarının metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213- *MSSA*) türü üzerinde de zon açtığı saptandı. SE3'ün açmış olduğu $16,0 \pm 0,0$ mm'lik zon çapının pozitif kontrol olarak kullanılan Penisilin G (1 U) diskinin $14,7 \pm 0,6$ mm'lik açmış olduğu zon çapından fazla olduğu ve ekstrenin halihazırda kullanılan Penisilin G (1 U)'den fazla zon açtığı saptandı.

SE3'ün *Pseudomonas aeruginosa* (klinik izolat) türü üzerinde açtığı zon çapı $10,7 \pm 1,2$ mm'dir. Pozitif kontrol olarak uygulanan disklerin açmış olduğu zon çapları gentamisin (10 μg) için $19,3 \pm 0,6$ mm ve piperasilin (30 μg) için $20,3 \pm 0,6$ mm'dir. Çalıştığımız mikroorganizma klinik izolat olduğu için mukayese antibiyotiklerin oluşturduğu zon çapları EUCAST klinik sınır değer tablosu sürüm 11'e göre değerlendirilmiş ve kullanılan klinik izolat piperasilin antibiyotiğine duyarlı olarak bulunmuştur. Ekstraktın oluşturduğu zon çapı ise pozitif kontrollere (antibiyotikler) göre daha azdı. *Amanita phalloides* mantarının distile su ile hazırlanan artan miktardaki konsantrasyonlarında açtığı zonun arttığı gözlemlendi.

Distile su ekstraktlarının en az açtığı zon *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) türü üzerinde saptandı.

SE2 ve SE3'ün *Escherichia coli* (ATCC 25922) türü üzerinde açtığı zon çapları sırasıyla $7,3 \pm 0,6$ ve $10,7 \pm 2,3$ mm bulundu. *A. phalloides* ile ilgili yapılan literatür taramalarında Erjavec ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmada *A. phalloides* mantarı ekstraktının in vitro mikrotiter plaka deneylerinde farklı *Ralstonia solanacearum* filotiplerine, *R. mannitolilytica* ve *E. coli* dahil olmak üzere test edilen tüm bakterileri inhibe ettiği belirlenmiştir.⁷⁴ Chelela ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada da *A. phalloides* mantarının etanol ekstresinin mikrodilüsyon yöntemiyle antibakteriyel aktivitesi araştırılmış ve *E. coli* türüne karşı zayıf aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir.⁷⁵ Kullanılan yöntemler farklıdır. Çalışmamızda da *E. coli* bakterisine karşı SE2 ve SE3'ün etkili olduğu tespit edildi.

Amanita phalloides mantarının farklı fizikokimyasal özelliklere sahip kloroform, aseton ve metanol çözücüleri ile hazırlanan ekstraktlarının çalışmamızda kullanılan mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkinliğinin olmadığı saptandı. Bu duruma çözücülerin antimikrobiyal etkinlik gösterebilecek bileşikleri çözememiş olması, yeterli düzeyde çözememesi, etkili bileşiğin yapısını bozmuş olması, ekstraktların düşük konsantrasyonda olması gibi nedenler sebep olabilir. Yapılan literatür taramalarında da Chelela ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada yaş *Amanita phalloides* mantarının etanol ve kloroform ekstraktı hazırlanıp mikrodilüsyon yöntemiyle *S. flexneri*, *S. typhi*, *V. cholera*, *E. coli*, *S. kisarawe*, *S. pyogens*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *M. madagascariensis* ve *M. indicuspranii* bakterilerine karşı etkinliği araştırılmıştır. *Amanita phalloides* mantarının etanol ekstresinin, *E. coli* türüne karşı zayıf aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. (MIK = 3.13 mg/ml).⁷⁵ Kullanılan yöntem farklıdır ve yaş mantar üzerinde deneyler yapılmıştır. Çözücü olarak kloroform kullanılan ekstraktın *E. coli* ve *P. aeruginosa* türlerine karşı aktivite göstermediği bildirilmiştir. Araştırma sonuçları antimikrobiyal aktivitesi bakımından kloroform kullanılarak hazırladığımız ekstrakttaki çalışmamız ile paralellik göstermektedir.

Yapılan literatür incelemelerinde *A. phalloides* mantarına ait antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili yeterli çalışmaya rastlanmamaktadır. Oysa *Amanita* cinsinin diğer türlerine ait ekstraktların antimikrobiyal aktivitesi ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. *Amanita*

cinsine ait yapılan antimikrobiyal çalışmalarda da mantarların antimikrobiyal etkinliğine rastlanılmıştır.

Doğan ve arkadaşları (2015) tarafından yapılan bir çalışmada kurutulup toz haline getirilen *A. ovoidea* türünün kloroform, aseton ve metanol ile hazırlanan ekstreleri, mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak dört Gram-pozitif bakteri (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6633, *Listeria monocytogenes* type 2 NCTC 5348 ve *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615), beş Gram-negatif bakteri (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Proteus vulgaris* ATCC 7829 ve *Salmonella enteritidis* RSHMB) ve mayaya (*Candida albicans* ATCC 1023) karşı antimikrobiyal aktiviteler için test edilmiştir. *Amanita ovoidea*, her test mikroorganizmasına karşı çeşitli konsantrasyonlarda farklı antimikrobiyal etkiler sergilemiştir.¹⁵

Bala ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada dondurularak kurutulmuş *Amanita sp.*, *Amanita flavella* ve *Amanita ochrophylla* türlerinin distile su ve etanolla hazırlanan ekstrelerinin mikropalak yöntemiyle *S. aureus* ve *E. coli* üzerindeki antimikrobiyal etkinliğine bakılmıştır ve etkili bulunmuştur.⁷⁶

Akbaş'ın yaptığı çalışmada (2010) kurutulup öğütülerek toz haline getirilen *Amanita caesarea* mantarının metanol, aseton ve kloroform çözücülerini ile maserasyon ve sokshlet ekstraksiyonu ile hazırlanan ekstraktlarının mikrodilüsyon yöntemiyle Gram-pozitif bakterilere (*B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. pyogenes*), Gram-negatif bakterilere (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *S. enteritidis*) ve mayaya (*C. albicans*) karşı antimikrobiyal etkinliğine bakılmıştır. Ekstraktların tamamında değişik oranlarda antimikrobiyal aktivite gözlemlendiği bildirilmiştir.⁷⁷

Janes ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan çalışmada metanolla ekstrakte edilen kurutulmuş ve yaş *Amanita virosa* mantarının *P. Aeruginosa* ve *S. aureus* türüne karşı antibakteriyel etki gösterdiği belirlenmiştir.⁶

Alfa amanitin, ökaryotik hücrelerin çoğunda öldürücü bir etkiye sahip olduğu için insan ve hayvan sağlığını tehdit eden bazı patolojik mantarlar üzerinde terapötik etkiler sağlayabileceği düşünülmektedir. Bu yüzden antifungal duyarlılığın araştırılması da yeni antifungal bileşiklerin keşfi için gerekli görülmektedir. Son zamanlarda mantarların, antimikrobiyallere karşı gelişen direnç ve tarım ürünlerinde verim kaybına

neden olan parazitler gibi çeşitli sorunları çözmeye umut verici yeni protein kaynakları olduğu düşünülmektedir^{74,75,78,79}. Bu nedenle *Amanita phalloides* mantarının diğer mikroorganizmalar üzerine etkileri de araştırılmıştır. Chelela ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada *A. phalloides* mantarının larvasit ve antibakteriyel aktivitesi araştırılmıştır. Yapılan çalışmada *C. quinquefasciatus* türüne karşı çok zayıf larvasit etkisi olduğu ve *E. coli* türüne karşı zayıf aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir.^{75,78} Wang ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada *A. pallidorosea* mantarının, *Blastomyces albicans*'a karşı antifungal aktiviteye sahip yeni bir peptid toksin kaynağı olduğu bildirilmiştir.⁷⁹ Bizim çalışmamızda da *Amanita phalloides* mantarının dört farklı çözücüde hazırlanan ekstraktlarının antifungal etkinliği de araştırılmıştır. Ancak *Candida albicans* ve *Candida parapsilosis* türleri üzerine etkili olmadığı saptandı. Yapılan çalışmada disk difüzyon testinde distile su ekstraktlarında üremenin disk çevresinde daha az olduğu görülmesine rağmen net bir zon görüntüsü elde edilemedi. Bunun nedeni ekstrakt içerisinde antifungal etki gösterebilecek maddenin düşük konsantrasyonda olması olabilir. Daha yüksek dozlarda hazırlanacak olan çözeltilerde antifungal etki gözlemlenebileceği düşünülebilir.

Yapılan literatür incelemelerinde *Amanita* cinsine ait yapılan antimikrobiyal çalışmalarda da araştırmamızda kullandığımız mikroorganizmalardan *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida albicans* türlerine karşı antimikrobiyal etkinlik görüldüğü tespit edilmiştir. Antibakteriyel etkiler çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumludur. Araştırmamızda antifungal etki gözlenmemiştir. Antifungal etkinin gözlenmemesi çalışmamızda kullandığımız numunedan, kullanılan yöntemden, yeterli doza ulaşamamasından veya düşük çözünürlük veya yüksek moleküler kütle nedeniyle aktif bileşiğin agar içine düşük difüzyonu sonucunda etkisini gösterememesinden kaynaklanıyor olabilir.

Araştırmamızda *Amanita phalloides* mantarının distile su ekstraktının *Staphylococcus aureus* türü üzerinde açmış olduğu zon çapının ticari olarak temin edilen penisilinlin açtığı zondan daha fazla olduğu tespit edildi. Beta laktam antibiyotiklere *MRSA* suşlarının dirençli olması beklendiğinden *Amanita phalloides* ekstraktının etkisinin beta-laktam antibiyotiklerin etki mekanizması dışında bir mekanizma ile gerçekleştiği düşünülebilir.

Antimikrobiyal etkinliğini değerlendirdiğimiz ekstrelerin içerisindeki α ve β amanitin varlığı ve madde miktarı HPLC sistemi kullanılarak analiz edildi. *A. phalloides* mantarının distile su ile hazırlanan ekstreleri ve metanol ile hazırlanan ekstresinde α ve β amanitin varlığı ve madde miktarı tespit edildi. Distile sulu ekstreler haricinde diğer çözücülerle hazırlanan ekstrelerde herhangi bir antimikrobiyal aktivite tespit edilemedi. Metanol özücüsü ile hazırlanan ekstrede α ve β amanitin olmasına rağmen antimikrobiyal aktivite gözlenmedi. Bu sebeple sulu ekstrelerde gözlemlenen antibakteriyal aktivitenin α ve β amanitin kaynaklı olmayıp suda çözünen başka bileşiklerden kaynaklanabileceği sorusunu akla getirmektedir.



6. SONUÇ

A. phalloides türü ile farklı deneysel çalışmalar olmasına karşın çalışmamız farklı mikroorganizmalar üzerinde farklı çözücülerle hazırlanan ekstraktlar bakımından ve içerik analizi yapılarak α ve β amanitin madde miktar ve tayini yapılan ilk çalışma niteliğindedir. Çalışmamızda *A. phalloides* mantarı ölümcül zehirlenmelere sebep olduğu için topikal olarak uygulanabileceği öngörülerek genellikle yüzeysel enfeksiyonlara sebep olan mikroorganizmalar seçildi. Ekstraktların antimikrobiyal etkinliğine baktığımız bu çalışmamızda yüksek konsantrasyonlardaki distile su ekstraktlarının bakteriler üzerinde zon açtığı gözlemlendi. Deneyler sonucunda en yüksek zon çapı *A. phalloides* mantarının distile su ekstraktıyla *MRSA* (ATCC 43300) türüne karşı bulundu. Metanollü ekstrakt içeriğinde yaklaşık SE1 ekstrakt içeriği kadar alfa ve beta amanitin bulunmasına rağmen antimikrobiyal etki gözlenmemesi ilginç bir veri olarak karşımıza çıkmıştır. Devam eden çalışmalarda ekstraktların içerisinde bulunan bileşiklerin ayrılarak tek başlarına antimikrobiyal etkilerinin bakılması ihtiyacı doğmuştur. Bu çalışmalar ile ekstrakta bulunan hangi maddenin hangi dozlarda etki oluşturduğu netlik kazanabilecektir.

Ülkemizde doğal olarak yetişen *Amanita phalloides* mantarı ekstraktları ile yaptığımız bu çalışmada, bakterilere karşı kayda değer antibakteriyal veriler elde edildi. Seçilen mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonlar ve gelecekte direnç geliştirme potansiyeli göz önüne alındığında bulunan sonuçlar umut verici düzeydedir.

Antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımı ile giderek artan direnç problemine karşılık yeni antibiyotiklerin keşfi giderek daha fazla önem kazanmaktadır. İleride yapılacak çalışmalarda sulu ekstrede bulunan diğer bileşiklerin tayini ve antimikrobiyal etkinliğinin araştırılması ile özellikle kullanılan antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalara etkili yeni bir antimikrobiyal ajan keşfi için ışık tutabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Avşar C, Keskin H, Berber İ. Hastane infeksiyonlarından izole edilen mikroorganizmalara karşı bazı bitki ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi. *Int J Pure Appl Sci.* 2016;2(1):22-29.
2. Atila D, Barışık V. Akılcı antibiyotik kullanımı. *Klinik Tıp Aile Hekimliği.* 2017;9(3):1-2.
3. Demirtürk N, Demirdal T. Antibiyotiklerde direnç sorunu. *Kocatepe Tıp Dergisi.* 2004;5(2).
4. Rossiter SE, Fletcher MH, Wuest WM. Natural products as platforms to overcome antibiotic resistance. *Chemical reviews.* 2017;117(19):12415-12474.
5. De Ruyscher D, Pang L, Mattelaer C-A, Nautiyal M, De Graef S, Rozenski J, Strelkov SV, Lescrinier E, Weeks SD, Van Aerschot A. Phenyltriazole-functionalized sulfamate inhibitors targeting tyrosyl-or isoleucyl-trna synthetase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2020;28(15):115580.
6. Janeš D, Kreft S, Jurc M, Seme K, Štrukelj B. Antibacterial activity in higher fungi (mushrooms) and endophytic fungi from Slovenia. *Pharmaceutical biology.* 2007;45(9):700-706.
7. Öztürk A, Çopur ÖU. Mantar bileşenlerinin teröpatik etkileri. *Bahçe.* 2009;38(1):19-24.
8. Bekçi H, Altınsoy B, Sarıkaya S, Onbasılı D, Çelik GY. Kastamonu yöresinden toplanan bazı makrofungusların antimikrobiyal aktivitesi. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty.* 2011;11(2):187-190.
9. Kayaalp SO. *Akılcı tedavi yönünden tıbbi farmakoloji.* 13. Baskı ed. Ankara: Pelikan Kitapevi; 2012.
10. Kaya E, Surmen MG, Yaykasli KO, Karahan S, Oktay M, Turan H, Colakoglu S, Erdem H. Dermal absorption and toxicity of alpha amanitin in mice. *Cutaneous and ocular toxicology.* 2014;33(2):154-160.
11. Yardan T, Eden AO, Baydın A, Arslan B, Vural K. Mantar zehirlenmeleri. *Journal of Experimental and Clinical Medicine.* 2008;25(2):75-83.
12. Sharma D, Singh V, Singh N. A review on phytochemistry and pharmacology of medicinal as well as poisonous mushrooms. *Mini reviews in medicinal chemistry.* 2018;18(13):1095-1109.
13. Kaya E, Karahan S, Hancı M, Yaykaşlı KO, Sarıtaş A, Bayram R, Yılmaz İ, Arslan SO. Düzce yöresinde yetişen *Amanita phalloides* mantarındaki alfa amanitin düzeyinin HPLC yöntemiyle ölçümü. *Duzce Medical Journal.* 2012;14(2):15-17.
14. Kaya E, Hancı M, Karahan S, Bayram S, Yaykaşlı KO, Sürmen MG. Thermostability of alpha amanitin in water and methanol. *European Journal of Basic Medical Sciences.* 2012;2(4):106-111.
15. Doğan HH, Arslan E. Biological activities and DNA interactions of *Amanita ovoidea*. *Pharmaceutical biology.* 2015;53(9):1386-1390.
16. Kaya E, Yılmaz I, Sinirlioglu ZA, Karahan S, Bayram R, Yaykasli KO, Colakoglu S, Saritas A, Severoglu Z. Amanitin and phallotoxin concentration in *Amanita phalloides* var. *alba* mushroom. *Toxicon.* 2013;76:225-233.

17. Tang S, Zhou Q, He Z, Luo T, Zhang P, Cai Q, Yang Z, Chen J, Chen Z. Cyclopeptide toxins of lethal amanitas: Compositions, distribution and phylogenetic implication. *Toxicon*. 2016;120:78-88.
18. Akata I, Kaya E, Yılmaz İ, Bakırcı S, Bayram R. Türkiye'de yetişen alfa amanitin içeren zehirli mantarlar. *Duzce Medical Journal*. 2015;17(1).
19. Misirlioglu ED, Bulbul SH. Mushroom poisonings. *TAF-Preventive Medicine Bulletin*. 2009;8(3):281.
20. Tavassoli M, Afshari A, Arsene AL, Mégarbane B, Dumanov J, Paoliello MMB, Tsatsakis A, Carvalho F, Hashemzaei M, Karimi G. Toxicological profile of *Amanita virosa*—a narrative review. *Toxicology reports*. 2019;6:143-150.
21. Sürmen MG. *Farelerde Amanita phalloides toksini alfa amanitinin deriden emilimi*. 2012, Düzce Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 63 sayfa, Düzce, (Prof. Dr. Ertuğrul KAYA).
22. Mat A. *Türkiyede mantar zehirlenmeleri ve zehirli mantarlar*, 2. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2000.
23. Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M. *Farmasotik botanik ders kitabı*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları; 1993.
24. Wieland T. *Peptides of poisonous amanita mushrooms*. New York: Springer-Verlag; 1986.
25. Garcia J, Costa VM, Carvalho A, Baptista P, de Pinho PG, de Lourdes Bastos M, Carvalho F. *Amanita phalloides* poisoning: Mechanisms of toxicity and treatment. *Food and chemical toxicology*. 2015;86:41-55.
26. Vetter J. Toxins of *Amanita phalloides*. *Toxicon*. 1998;36(1):13-24.
27. Kaygusuz O, Gezer K, Çelik A, Dursun B. Mushroom poisoning of death cap (*Amanita phalloides*) from Denizli (Turkey). *International Journal on Biological Diversity and Conservation*. 2013;6(2):22-25.
28. Özkazanç NK, KELEŞ YY. Macrofungi of Küre mountains national park in Bartın region of Turkey. *Turkish Journal of Forestry*. 2019;20(1):8-14.
29. Özbek H, Cengiz N, Bayram İ, Öntürk H. Alfa-amanitinle oluşturulmuş böbrek ve karaciğer toksisitesinde alfa-pinen ve silibininin etkisinin sıçanlar üzerinde araştırılması. *Genel Tıp Dergisi*. 2008;18(4).
30. Scott Chialvo CH, Griffin LH, Reed LK, Ciesla L. Exhaustive extraction of cyclopeptides from *Amanita phalloides*: Guidelines for working with complex mixtures of secondary metabolites. *Ecology and evolution*. 2020;10(10):4233-4240.
31. Garcia J, Carvalho AT, Dourado DF, Baptista P, de Lourdes Bastos M, Carvalho F. New in silico insights into the inhibition of rnap ii by α -amanitin and the protective effect mediated by effective antidotes. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2014;51:120-127.
32. Gicquel T, Lepage S, Fradin M, Tribut O, Duret B, Morel I. Amatoxins (α - and β -amanitin) and phallotoxin (phalloidin) analyses in urines using high-resolution accurate mass lc–ms technology. *Journal of analytical toxicology*. 2014;38(6):335-340.
33. Vo KT, Montgomery ME, Mitchell ST, Scheerlinck PH, Colby DK, Meier KH, Kim-Katz S, Anderson IB, Offerman SR, Olson KR. *Amanita phalloides* mushroom poisonings—northern california, december 2016. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2017;66(21):549.

34. Abbott NL, Hill KL, Garrett A, Carter MD, Hamelin EI, Johnson RC. Detection of α -, β -, and γ -amanitin in urine by lc-ms/ms using 15n10- α -amanitin as the internal standard. *Toxicon*. 2018;152:71-77.
35. Bakirci S, Bayram R, Yilmaz I, Yaykasli KO, Bayram S, Kaya E. Purification and in vitro toxicity of gamma amanitin. *Toxin Reviews*. 2015;34(4):200-205.
36. Faulstich H, Trischmann H, Zobeley S. A radioimmunoassay for amanitin. *FEBS letters*. 1975;56(2):312-315.
37. Faulstich H, Cochet-Meilhac M. Amatoxins in edible mushrooms. *FEBS letters*. 1976;64(1):73-75.
38. Brüggemann O, Meder M, Freitag R. Analysis of amatoxins α -amanitin and β -amanitin in toadstool extracts and body fluids by capillary zone electrophoresis with photodiode array detection. *Journal of Chromatography A*. 1996;744(1-2):167-176.
39. De Carlo E, Milanese A, Martini C, Maffei P, Tamagno G, Parnigotto PP, Scandellari C, Sicolo N. Effects of *Amanita phalloides* toxins on insulin release: In vivo and in vitro studies. *Archives of toxicology*. 2003;77(8):441-445.
40. Azzolin L, Antolini N, Calderan A, Ruzza P, Sciacovelli M, Marin O, Mammi S, Bernardi P, Rasola A. Antamanide, a derivative of *Amanita phalloides*, is a novel inhibitor of the mitochondrial permeability transition pore. *PloS one*. 2011;6(1):e16280.
41. Kaya E, Karahan S, Bayram R, Yaykasli KO, Colakoglu S, Saritas A. Amatoxin and phallotoxin concentration in *Amanita phalloides* spores and tissues. *Toxicology and industrial Health*. 2015;31(12):1172-1177.
42. Pahl A, Lutz C, Hechler T. Amanitins and their development as a payload for antibody-drug conjugates. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2018;30:85-89.
43. Marciniak B, Łopaczyńska D, Ferenc T. Evaluation of the genotoxicity of alpha-amanitin in mice bone marrow cells. *Toxicon*. 2017;137:1-6.
44. Garcia J, Oliveira A, de Pinho PG, Freitas V, Carvalho A, Baptista P, Pereira E, de Lourdes Bastos M, Carvalho F. Determination of amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* mushrooms from northeastern portugal by HPLC-DAD-MS. *Mycologia*. 2015;107(4):679-687.
45. Kaya E, Yaykaşlı K, Karahan S, Bayram R, Sarıtaş A, Yaykaşlı E. Production of high purity beta amanitin. *Duzce Med J*. 2012;14:48-53.
46. Bushnell DA, Cramer P, Kornberg RD. Structural basis of transcription: A-amanitin-rna polymerase ii cocrystal at 2.8 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(3):1218-1222.
47. Magdalan J, Ostrowska A, Piotrowska A, Izykowska I, Nowak M, Gomułkiewicz A, Podhorska-Okolów M, Szeląg A, Dziegiel P. A-amanitin induced apoptosis in primary cultured dog hepatocytes. *Folia histochemica et cytobiologica*. 2010;48(1):58-62.
48. Enjalbert F, Gallion C, Jehl F, Monteil H, Faulstich H. Simultaneous assay for amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* fr. by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1992;598(2):227-236.
49. Enjalbert F, Gallion C, Jehl F, Monteil H, Faulstich H. Amatoxins and phallotoxins in *Amanita* species: High-performance liquid chromatographic determination. *Mycologia*. 1993;85(4):579-584.

50. Enjalbert F, Gallion C, Jehl F, Monteil H. Toxin content, phallotoxin and amatoxin composition of *Amanita phalloides* tissues. *Toxicon*. 1993;31(6):803-807.
51. Enjalbert F, Cassanas G, Guinchard C, Chaumont J. Toxin composition of amanita phalloides tissues in relation to the collection site. *Mycologia*. 1996;88(6):909-921.
52. Enjalbert F, Cassanas G, Salhi SL, Guinchard C, Chaumont J-P. Distribution of the amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides*. Influence of the tissues and the collection site. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*. 1999;322(10):855-862.
53. Kaya E. Preparatif hplc yöntemiyle yüksek saflıkta alfa amanitin saflaştırılması. *Konuralp Medical Journal*. 2012;4(3):35-41.
54. Kocamaz S. *E.coli*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus*'da antibiyotik dirençlilik dağılımı ve biyoaktif molekül karışımının etkisi. 2017, Çukurova Üniversitesi; Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 149 sayfa, Adana, (Prof. Dr. Burhan ARIKAN).
55. Topal M, Şenel GU, Arslan Topal EI, Öbek E. Antibiyotikler ve kullanım alanları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*. 2015;31(3):121-127.
56. Akbal AU, Çoban AY, Durupınar B. Yeni antibakteriyeller. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2018;48(2):87-99.
57. Akyar I. Süper bakteriler için antibiyotik arayışı. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 2010(2):62-67.
58. Rice LB. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *American journal of infection control*. 2006;34(5):S11-S19.
59. Aydemir Ş, Çöplü N, Gülay Z, Gür D, Hasdemir U, Karahan ZC, Karatuna O, Kayacan ZÇ, Söyletir G. Önemli direnç mekanizmalarının saptanması: Eucast önerileri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 2016;46 Suppl:2016.
60. Arıcı N, Aksaray S. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının metisilin direncinin belirlenmesi ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması. *ANKEM Dergisi*. 2019;33(2):70-76.
61. Bilgehan H. *Klinik mikrobiyoloji tanı*. 4. Baskı ed. Ankara: Fakülteler Kitapevi; 2004.
62. Gül M, Şensoy A, Çetin B, Korkmaz F, Seber E. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında seftazidime duyarlılığın e-test ve disk diffüzyon yöntemleri ile araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2004;34(1):33-36.
63. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. 1998;11(1):142-201.
64. Omerovic M, Müştak HK, Kaya İB. *Escherichia coli* patotiplerinin virülens faktörleri. *Etilik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 2017;28(1):1-6.
65. Duman Y, Güçlüer N, Serindağ A, Tekerekoğlu MS. *Escherichia coli* suşlarında antimikrobiyal duyarlılık ve genişlemiş spektrumlu-βeta laktamaz (gsbl) varlığı. *Fırat Tıp Dergisi*. 2010;15(4):197-200.
66. Uçar G, Yörük NG, Güner A. *Escherichia coli* enfeksiyonları. *Türkiye Klinikleri J Food Hyg Technol-Special Topics*. 2015;1(3):22-29.
67. McBride SM, Fischetti VA, LeBlanc DJ, Moellering Jr RC, Gilmore MS. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PloS one*. 2007;2(7):e582.

68. Oldberg K, Rasmussen M. *Enterococcus faecalis* in blood cultures—a prospective study on the role of persistent bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2021;101(1):115433.
69. Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9(10):737-748.
70. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 2008;21(4):606-625.
71. Unsal V, Toroğlu S, Kurutaş EB, Taner SŞ, Atalay F, Bahar G. Dereotu, semizotu ve roka'da antioksidan ve antimikrobiyal aktivitenin araştırılması. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*. 2014;3(2):25-32.
72. Bauer A. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J clin pathol*. 1966;45:149-158.
73. Kaya E, Yılmaz I, Admis O, Oktay M, Bayram R, Bakirci S, Yaykasli KO, Kandis H, Saritas A, Katirci Y. Effects of erdosteine on alpha amanitin-induced hepatotoxicity in mice. *Toxin Reviews*. 2016;35(1-2):4-9.
74. Erjavec J, Ravnikar M, Brzin J, Grebenc T, Blejec A, Gosak MŽ, Sabotič J, Kos J, Dreo T. Antibacterial activity of wild mushroom extracts on bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Plant disease*. 2016;100(2):453-464.
75. Chelela BL, Chacha M, Matemú AO. Antibacterial and antifungal activities of selected wild mushrooms from southern highlands of Tanzania. *American Journal of Research Communication*. 2014.
76. Bala N, Aitken EA, Fechner N, Cusack A, Steadman KJ. Evaluation of antibacterial activity of Australian Basidiomycetous macrofungi using a high-throughput 96-well plate assay. *Pharmaceutical biology*. 2011;49(5):492-500.
77. Akbaş G. *Amanita caesarea* (scop.: Fr.) pers.'nin antioksidan, antimikrobiyal etkilerinin ve yağ asiti kompozisyonunun belirlenmesi. 2010, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 82 sayfa, Konya, (Doç. Dr. H. Hüseyin DOĞAN).
78. Chelela BL, Chacha M, Matemú AO. Larvicidal potential of wild mushroom extracts against *Culex quinquefasciatus* say, aedes aegypti and anopheles gambiae giles ss. *American Journal of Research Communication*. 2014.
79. Wang Y, Bao H, Xu L, Bau T. Determination of main peptide toxins from *Amanita pallidorozea* with HPLC and their antifungal action on *Blastomyces albicans*. *Wei sheng wu xue bao*. 2011;51(9):1205-1211.

8. ÖZGEÇMİŞ

