

Sıçanlarda intravenöz uygulanan deli bal toksini grayanotoksin-III'ün doza bağımlı kardiyak etkileri

The dose-dependent cardiovascular effects of intravenous grayanotoxin-III in rats

İsmail YILMAZ¹, Ertuğrul KAYA², Kürşat Oğuz YAYKAŞLI³, Yasin TÜRKER⁴

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İzmir Bozyaka Eğitim Araştırma Hastanesi, Klinik Farmakoloji ve Toksikoloji Birimi, İzmir

²Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Düzce

³Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Düzce

⁴Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı, Düzce

ÖZ

Amaç: Deli bal zehirlenmelerin büyük bir kısmı ülkemizde görülmektedir. Deli bal içinde bulunan toksinlerin temel kaynağı Rhododendron türü bitkiler olup, bu bitki-lerdeki toksinlerden en fazla grayanotoksin-III bulunur. Deli bal zehirlenmelerinde klinikte bradikardi, atriyoventriküler blok, asistoli, hipotansiyon, salivasyon gibi semptomlar görülür.

Bu çalışmada, sıçanlara farklı dozlarda intravenöz (i.v.) yolla verilen grayanotoksin-III'ün doza bağımlı kardiyovasküler etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmada, 42 Wistar albino sıçan kullanılmış ve hayvanlar Kontrol, Grup 1 (5 µg/kg), Grup 2 (10 µg/kg), Grup 3 (20 µg/kg), Grup 4 (50 µg/kg) ve Grup 5 (100 µg/kg) olmak üzere altı gruba ayrılmıştır. Elektrokardiyogram (EKG), tansiyon arteriyel ve solunum sayısı için bazal değerler elde edildikten sonra i.v. grayanotoksin uygulanmasının ardından 60 dk. boyunca bu parametreler kaydedilmiştir.

Bulgular: 5 µg/kg grayanotoksin-III verilen grupta, tüm zamanlarda anlamlı bir değişimlik olmazken, 10 ve 20 µg/kg toksin verilen gruplarda 2. ve 5. dk.'dan sonra anlamlı biçimde solunum sayıları ve kalp tepe atım sayıları azalmış, arteriyel basınçlarda düşme görülmüştür. Yirmi beşinci dk.'dan sonra ise tüm parametreler bazal değerlere yeniden geri dönmüştür. Elli ve 100 µg/kg grayanotoksin-III verilen gruplarda, 2. dk.'dan itibaren tüm parametrelerde hızla düşme olmuş ve 5-10 dk. içinde sıçanlar ölmüştür.

Sonuç: Sıçanlar için i.v. grayanotoksin-III'ün 50 µg/kg ve üzerindeki yüksek dozlar-
da lethal olabildiği, ölümün kardiyak arrest nedeniyle görüldüğü, 5 µg/kg ve altındaki düşük dozlarda toksik etkilerin görülmediği, i.v. uygulamada toksik etkilerin yaklaşık olarak 25 dk. sürdüğü saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Grayanotoksin-III, deli bal, kardiyovasküler etkiler

ABSTRACT

Objective: The mad honey poisonings are commonly seen in our country. The source of the toxin in mad honey is plants of Rhododendron species. Grayanotoxin-III type toxin is commonly found in these plants. Clinical effects of this toxin are bradycardia, atrioventricular block, asystole, hypotension and symptoms such as salivation. In this study; different doses of grayanotoxin-III were intravenously administered to rats (i.v) and the effect of grayanotoxin on cardiovascular system was evaluated.

Methods: This study was performed on 42 Wistar albino rats and the animals were divided into six groups. Control, Group 1 (5 µg/kg), Group 2 (10 µg/kg), Group 3 (20 µg/kg), Group 4 (50 µg/kg) and Group 5 (100 µg/kg) groups were formed. Baseline values for electrocardiography (ECG), arterial blood pressure and respiratory rate were obtained and recorded for 60 minutes after administration of i.v. grayanotoxin-III.

Results: Group1 (5 µg/kg) was not significantly changed in all time periods. In 10 and 20 µg/kg groups, respiratory rates, peak heart rates decreased significantly and drop in arterial blood pressures was observed after 2nd and 5th minutes. While 25 minutes after administration of i.v. grayanotoxin-III all parameters returned to baseline values again. In 50 and 100 µg/kg grayanotoxin-III groups all parameters fell sharply from 2 minutes on, and rats died within 5-10 minutes.

Conclusion: In conclusion, it was found that the lethal dose of grayanotoxin-III for rats is 50 µg/kg. In addition the death was developed due to cardiac arrest. In case of the lower level of 5 µg/kg grayanotoxin-III, any toxic effect was not seen. The effects of toxin apparently lasted nearly 25 minutes.

Keywords: Grayanotoxin-III, mad honey, cardiovascular effects

Alındığı tarih: 05.06.2017

Kabul tarihi: 07.06.2017

Yazışma adresi: Uzm. Dr. İsmail Yılmaz, İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Farmakoloji, Karabağlar, 35170, İzmir
e-mail: driyilmaz@yahoo.com

GİRİŞ

Deli bal, kendine has kokusu, acımsı-buruk boğaz-da hafif yanma hissi veren tadı, diğer ballardan daha koyu kahverengi-kırmızı rengi ve daha geç şekerlenme özelliği ile ülkemizin belli bölgelerinde sıkça tüketilen doğal bir besindir. Deli bal kaynaklı zehirlenmeler, dünya üzerinde farklı ülkelerden bildirilen az sayıda olgular olsa da, özellikle ülkemizin Karadeniz kıyısındaki yerleşim alanlarında daha sık görülür. Ülkemizde genellikle bazı tıbbi etkileri için self medikasyon amacıyla az miktarlarda tüketilmektedir. Günümüzde turizm ve ticaretteki hızlı gelişime bağlı olarak dünyanın birçok yerinde bu doğal besine dair zehirlenmelere rastlamak olasıdır ⁽¹⁻⁵⁾. Tarihsel anlamda ilk kez MÖ 401'de Atinalı tarihçi ve ordu komutanı Ksenofon, Anabasis isimli yapıtında deli bal zehirlenmesinden söz etmiş olup, söz konusu kaynaklarda zehirlenmenin niteliği hakkında dikkat çekici öykülerle çarpıcı bilgiler verilmiştir. Ksenofon, Perslerle savaşmak üzere Karadeniz sahilinde bulunan 10 bin civarındaki Yunan askerinin kusma, ishal ve bilinç bulanıklığı gibi yakınmalarını not etmiştir. Askerlerin zehirlenerek esir edildiği bu savaş, bize tarihte kullanılan ilk kimyasal silahın deli bal olabileceğini düşündürmektedir ^(4,6-8). Yine 1800'lü yılların başında Barton, yayınlanan bir çalışmada, deli bal sonrası zehirlenen bir hastaya ait zehirlenme bulgularını ilk kez tanımlamıştır ⁽³⁾. Halk arasında, deli bal, tutan bal, kara ağı veya acı bal olarak isimlendirilen bu besin maddesine dair ülkemizde yapılan ilk araştırmalardan Bucak ve ark. ⁽⁹⁾ mikroskopik incelemede balın içerisinde *Rhododendron* polenleri izole etmişlerdir. 1984 ile 1986 yılları arasında deli baldan zehirlenen 16 olgunun incelendiği Biberoğlu ve ark. ⁽¹⁾ yapılan başka bir çalışmada, bu ballarda grayanotoksin belirlenmiştir. Yine ilerleyen yıllarda ülkemizden çok sayıda zehirlenme olgusu bildirilmeye devam edilmişse de ^(2,10,11) deli bal zehirlenmesi nedeniyle başvuruların yayınlanandan çok daha fazla olduğu düşünülmektedir.

Yapılan bazı çalışmalarda, Ericaceae bitki familyasının bazı türlerinden izole edilen asetilandromedol (andromedotoksin), andromedenol ve andromedolun araştırmacılarca deli balda da saptanması

Ericaceae familyası ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Arılar tarafından bu bitkilerden alınan toksinler, detoksifiye edilemediği için doğrudan doğruya bala karışır ve zehirlenmelere yol açar. Bu bitki familyasına ait orman güllerinin bilimsel adı olan *Rhododendron*, gül ağacı anlamına gelmektedir (Yunanca rhodon=gül; dendron=ağaç) ⁽¹²⁾. Dünyada çok sayıda ve farklı türlerde orman gülü bulunmakta iken, ülkemizin kuzey kıyılarındaki ormanlarda özellikle sarı orman gülü (*Rhododendron Luteum*) ve mor çiçekli orman gülü (*R. ponticum*) oldukça yaygındır ^(3,8,13). Bu türlerden izole edilen toksik bileşiklerden olan asetilandromedol, andromedenol ve andromedol sırasıyla, grayanotoksin-I, grayanotoksin-II ve grayanotoksin-III olarak da bilinir ⁽⁹⁾. Toksik diterpenlerin bir grubunu oluşturan grayanotoksinler azot içermeyen polihidroksilesiklik hidrokarbonlardan oluşur ⁽⁵⁾. *Rhododendron*ların nektar, çiçek, polen ve yaprak kısımlarında bulunurlar. Zehirlenme daha çok toksini içeren nektarlardan üretilen ballarla olur. Nektarın içermiş olduğu grayanotoksinin tipi ve miktarı türden türe değişiklik gösterebilir. Günümüzde elliden fazla grayanotoksin tipi tespit edilmiş olup, bunlardan toksik niteliğe sahip olanlar grayanotoxin-I, III ve IV'tür; grayanotoxin-2 daha az toksiktir. Bitkide ve balda bu toksinler içerisinde en fazla bulunanı ise grayanotoksin-III'dür ^(3,4,8,13,14).

Grayanotoksinin hücrede toksik etkileri özellikle voltaj bağımlı Na kanalları üzerinden olur. Eksitabl membranlarda sodyum iyonlarının geçirgenliğini artırır ve kalsiyumun hücre içine girişini kolaylaştırır. Öncelikle toksin voltaj bağımlı kanalların açılma fazında bu kanallara bağlanır. Ardından kanallar modifiye ve inaktivasyonu engellenmiş olur. Son olarak modifiye Na kanallarının aktivasyon potansiyeli, kanalın hiperpolarizasyonuna neden olur. Uyarılabilir hücreler (sinir ve kas) depolarize durumda kalır ^(3,15,16).

Bir çay kaşığı balın bile zehirlenmeye neden olabileceği olgular olmakla birlikte, zehirlenme olgularının çoğunda tüketilen bal miktarı 5-30 g arasında değişmektedir, ancak balı tadan herkeste benzer zehirlenme belirtileri olmayabilir ⁽¹⁷⁾. Zehirlenmenin toksik etkileri nadiren ölümcüldür ve çoğu zaman 24 saati geçmez. Tüketilen bal miktarına bağlı olarak

semptomlar daha da belirginleşebilir ve balın alınmasından sonra ortalama 1,5-3 saat içerisinde başlar ⁽¹⁸⁾. En sık görülen semptom hastaların yaklaşık %90'ından fazlasında görülen belirgin hipotansiyon ve bradikardidir. Bunu terleme, sersemlik ve mental durum değişiklikleri izler. Senkop, diplopi, bulanık görme ve hipersalivasyon diğer görülen semptomlardandır. Deli bal zehirlenmesi sonrasında nonspesifik bradikardi, sinus bradikardisi, nodal ritim, 2. derece AV blok, komplet AV blok ve asistoli gibi çok çeşitli disritmiler görülebilir. Bu zamana kadar görülen yüzün üzerinde olgu incelendiğinde, en sık disritmi %65-70 civarında görülen sinus bradikardisidir. Yine hastaların %25'inde farklı derecelerde kalp blokları (nodal ritim, AV tam blok ve ikinci derece kalp bloğu) görülmüştür ^(2,17,19). Hastalardan yalnızca bir tanesinde asistol rapor edilirken, diğer bir hastada Wolff Parkinson White sendromu bildirilmiş ama bu durumun deli bal zehirlenmesinde kaynaklanıp kaynaklanmadığı tam olarak doğrulanamamıştır ⁽²⁰⁾. Yıldırım ve ark. ⁽²¹⁾ bildirilen bir olguda, deli dal yenmesi sonucu oluşan hipotansiyon ve bradikardinin, koroner akımı yavaşlamasına bağlı olarak miyokard enfarktüsü oluşturabildiği iddia edilmiştir. İlginç şekilde, uzun süreli deli bal tüketiminin bilhassa kardiyak belirtilerle kendini gösteren ve kronik deli bal zehirlenmesi olarak adlandırılan bir tabloya neden olabildiği de belirtilmektedir ⁽²²⁾.

Yapılan deneysel çalışmalarda da deli balın bradikardi ve respiratuvar depresyona neden olduğu gösterilmiştir. 1991 yılında Onat ve ark., ⁽¹⁰⁾ sıçanlara intraperitoneal (i.p.) ve intraserebroventriküler deli bal ekstraktı enjekte edildikten sonra kalp hızlarının azaldığını, ayrıca solunumlarının yüzeyelleştiğini belirlemişlerdir. Bradikardik etki bileteral vagotomi sonrası ortadan kalkarken, bu etkinin N. vagus üzerinden periferik yolla oluştuğu belirtilmektedir. Farelerde yapılan başka bir çalışmada, grayanotoksinin indüklediği bradikardi ve respiratuvar depresyonun atropin (nonspesifik antimuskarinik bir ajan) ile düzeldiği görülmektedir. Selektif M2-muskarinik reseptör antagonisti olan AF-DX116 uygulanan farelerde ise bradikardi düzelmiş fakat respiratuvar sistem üzerine bir etki olmayıp, solunum depresyonu düzelmemiştir. Bu durum bize grayanotoksinin kardiotok-

sik etkisinin M2-muskarinik reseptörler üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir ^(10,23).

Grayanotoksinler az sayıda deneysel çalışmada hayvanlara oral, i.p. ve intraserebroventriküler gibi farklı yollarla uygulanmıştır. Bu çalışmalarda, antioksidan ve analjezik özellikleri ortaya konmuştur. Yine başka çalışmalarda, oral yolla gavaj şeklinde ya da i.p. olarak verilen grayanotoksin-III, kanda bazı biyokimyasal parametreleri belirgin şekilde artırmış ancak renal fonksiyonlarda bir bozulmaya neden olmamıştır ⁽²³⁻²⁷⁾. Yakın zaman önce Türkmen ve ark. ⁽²⁸⁾ i.p. yolla verilen grayanotoksinin kardiyak etkilerini gözlemlemişlerdir.

Bu çalışmada, sıçanlara farklı dozlarda intravenöz (i.v.) yolla verilen grayanotoksin-III'ün doza bağımlı kardiyovasküler etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Deney Hayvanları ve Laboratuvar

Çalışmada, ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 42 erişkin albino Wistar erkek sıçan kullanılmıştır. Çalışma, araştırmanın yapılabilmesi için gerekli etik ve bilimsel standartlara sahip (dış etkenlere karşı yalıtılmış, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık dönemleri otomatik olarak ayarlanan, ısısı $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve bağıl nemi $60\pm 5\%$ civarında sabit) Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalarda National Research Council (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, National Academy Press, Washington, D.C., 1996) tarafından öngörülen etik kurallara uyulmuştur. Tüm çalışmalar süresince uygun olan en az sayıda deney hayvanı kullanılmaya çalışılmıştır. Çalışma için Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanlığından onay alınmıştır.

Kullanılan İlaçlar ve Kimyasallar

Grayanotoksin-III, Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA)'den satın alınmış ve distile suda çözülerek i.v. kullanıma hazır hale getirilmiştir. Toksin solüsyonu uygulamadan hemen önce taze olarak hazırlanmıştır.

Deney Hayvanlarında Yapılan İşlemler

Çalışmada sıçanlar Kontrol, Grup 1 (5 µg/kg), Grup 2 (10 µg/kg), Grup 3 (20 µg/kg), Grup 4 (50 µg/kg) ve Grup 5 (100 µg/kg) olmak üzere toplam altı ayrı gruba ayrılmış ve her grup 7 hayvandan oluşmuştur. Tüm sıçanlara i.p. olarak ketamine (100 mg/kg) anestezisi uygulanmış, elektrokardiyogram (EKG) elektrodları yerleştirilerek EKG kaydı alınmak üzere hazırlanmışlardır. Ardından sol karotis arteri açılan hayvanlara 26 G kanül yerleştirilerek kanül ucundaki kan basıncı probu ile arteriyel tansiyon kaydı alınmaya başlanmıştır. Solunum sayıları kaydedilmiştir. Hayvanlarda EKG, solunum sayısı ve tansiyon arteriyel için bazal değerler elde edildikten sonra, toksin verilen gruplara yukarıda belirtilen dozlarda, vena karotis eksterna içine i.v. yoldan 0,5 ml distile su içinde çözünmüş grayanotoksin-III verilmiştir. Benzer şekilde Kontrol grubuna da aynı volümde serum fizyolojik i.v. olarak verilerek tüm hayvanların arteriyel kan basıncı, kalp tepe atım sayıları ve solunum sayıları 0., 2., 5., 10., 15., 20., 25., 30., 40., 50. ve 60. dk.'larda karşılaştırılmak üzere kaydedilmiştir.

İstatistiksel Analiz

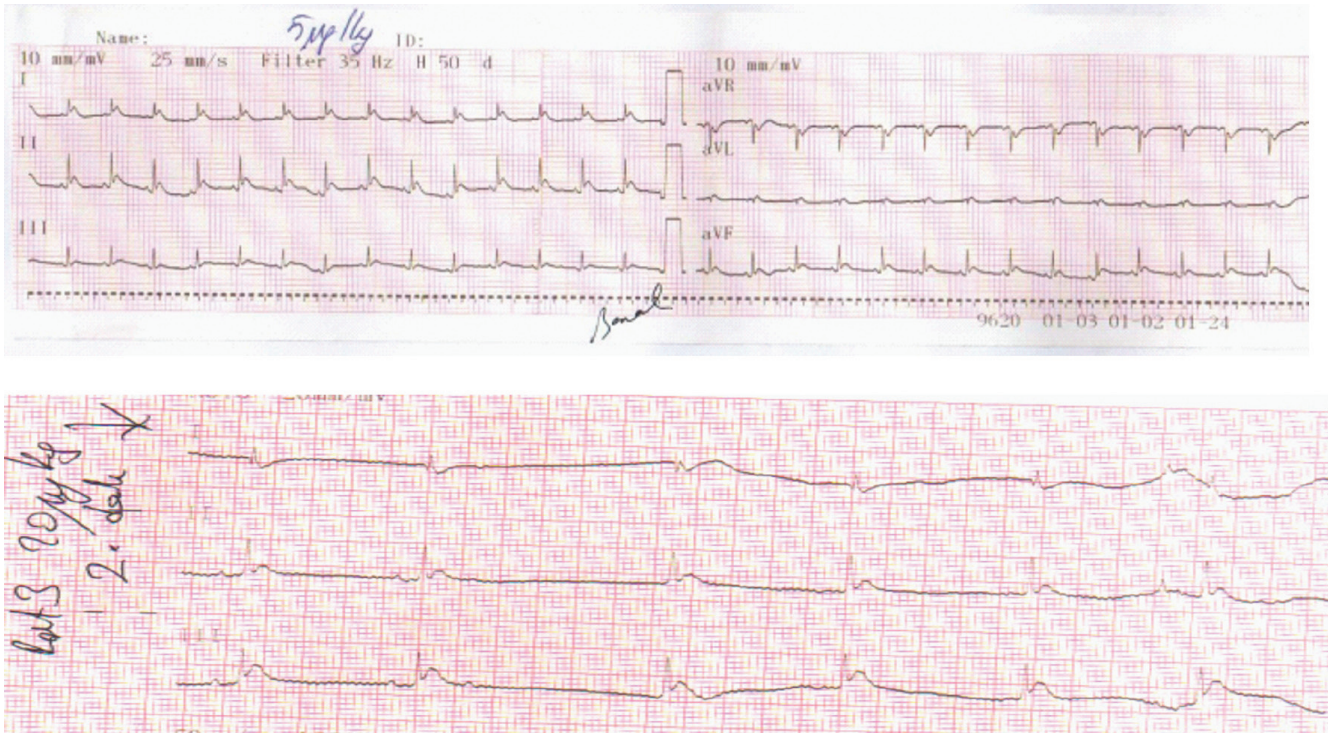
Gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirmesinde ki-kare ve Kruskal-Wallis varyans analizi kullanılmış olup, $p < 0,05$ olan veriler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

EKG sonuçları ve kalp tepe atım sayıları

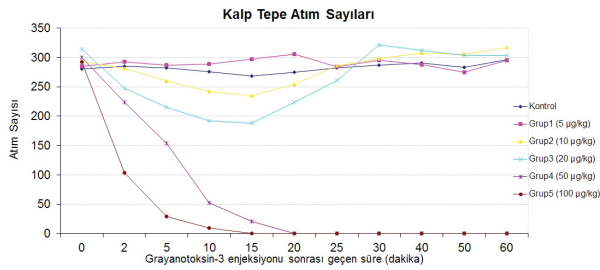
Tüm hayvanlardan bazal değerler elde edildikten sonraki 60 dk. boyunca EKG kayıtları alınmış olup, bazı hayvanlara ait EKG kayıt örnekleri Şekil 1'de gösterilmiştir. Hayvanların EKG kayıtlarında genel olarak sinüs ritmi hakimken, artan dozlarda sinüs bradikardisi görülmektedir. Atriyal ya da ventriküler kaynaklı herhangi bir blok ise gözlenmemiştir.

Kalp tepe atım sayıları karşılaştırıldığında, gruplar arasında bazal değerlerde bir fark yoktu. Yine kontrol grubu ile 5 µg/kg grayanotoksin-III verilen Grup 1 arasında tüm zamanlarda anlamlı fark bir bulunamadı. İkinci ve 5. dk.'da Kontrol grubu ile kıyaslandığında, 10 µg/kg toksin verilen Grup 2 arasında fark görülmezken, Grup 3, Grup 4 ve Grup 5



Şekil 1. Farklı dozlarda i.v. grayanotoksin-III verilen hayvanlara ait EKG kayıtları.

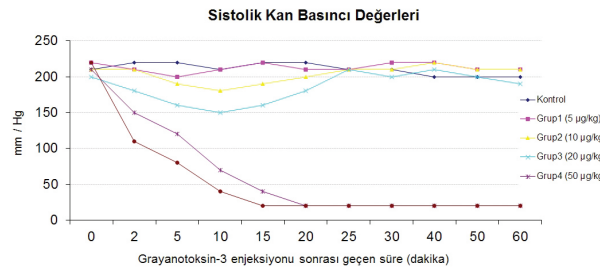
(sırasıyla 20, 50 ve 100 $\mu\text{g/kg}$ toksin) ile Kontrol grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görüldü ($p<0,05$). İlginç bir şekilde 25. ve sonraki dk.'larda Kontrol grubu ile Grup 1, Grup 2 ve Grup 3 arasında fark görülmedi. Grup 2 ve Grup 3'ün 5., 10., 15. ve 20. dk.'larda kontrol grubu ile aralarında anlamlı fark bulundu ($p<0,01$). Özellikle Grup 4 ve Grup 5'in kalp tepe atımlarının, Kontrole göre bazal değerler dışındaki tüm zamanlarda anlamlı derecede farklı olduğu belirlendi ($p<0,01$). EKG kaydı sırasında alınan, sıçanlara ait 0., 2., 5., 10., 15., 20., 25., 30., 40., 50. ve 60. dk.'lardaki kalp tepe atım sayıları Şekil 2'de grafik olarak verilmiştir.



Şekil 2. Gruplara ait kalp tepe atım sayıları.

Arteriyel kan basıncı

Gruplar arasında bazal değerlerde bir fark yoktu. Yine tüm zamanlarda kontrol grubu ile Grup 1 arasında da anlamlı fark bulunmadı. Kontrol grubu ile Grup 2 karşılaştırıldığında yalnızca 10. dk.'da istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunurken ($p<0,05$), diğer zamanlarda ise fark bulunmadı. Grup 3, kontrol grubu ile kıyaslandığında 5., 10., 15. ve 20. dk.'larda anlamlı bir fark varken ($p<0,05$), diğer zamanlarda fark yoktu. Grup 4 ve Grup 5 kontrol grubu karşılaştırıldığında ise, bazal değer hariç tüm zamanlarda istatistiksel olarak oldukça anlamlı fark vardı ($p<0,01$). Sıçanların 0., 2., 5., 10., 15., 20., 25., 30.,

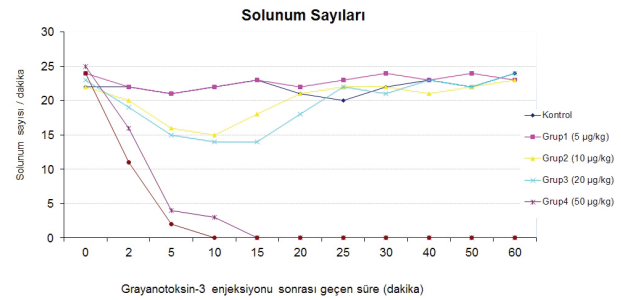


Şekil 3. Gruplara ait sistolik kan basıncı değerleri.

40., 50. ve 60. dk.'lara ait arteriyel kan basıncı değerleri Şekil 3'te grafik olarak verilmiştir.

Solunum sayıları

Tüm gruplar arasında bazal değerlerde bir fark yoktu. Yine tüm zamanlarda kontrol grubu ile Grup 1 arasında da anlamlı fark bulunamadı. Grup 2 ve Grup 3, kontrol grubu ile kıyaslandığında; aralarında 5., 10. ve 15. dk.'larda anlamlı fark varken ($p<0,05$), diğer zaman dilimlerinde ise fark bulunmadı. Grup 4 ve Grup 5, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, her ikisinde de bazal değer dışında tüm zamanlarda oldukça anlamlı bir fark görüldü ($p<0,01$). Sıçanların 0., 2., 5., 10., 15., 20., 25., 30., 40., 50. ve 60. dk.'lara ait dk.'daki solunum sayıları Şekil 4'te grafik olarak verilmiştir.



Şekil 4. Gruplara ait dk.'daki solunum sayıları.

TARTIŞMA

Çalışmada, i.v. 5 $\mu\text{g/kg}$ ve altındaki dozlarda grayanotoksin-III'ün sıçanlarda kardiyak etkilere yol açmadığı, kardiyovasküler değişikliklerin 10 $\mu\text{g/kg}$ dozla başladığı ve özellikle 20 $\mu\text{g/kg}$ dozla bu etkilerin daha da belirginleştiği görülmüştür. Bu durum bize 10-20 $\mu\text{g/kg}$ 'lık dozların sıçanlar için etkili kardiyak toksik dozlar olduğunu göstermiştir. Öte yandan 50 $\mu\text{g/kg}$ ve üzerindeki dozlarda hayvanların 60 dakikalık gözlem süresini tamamlayamadığı, bu dozların sıçanlarda ölümlerin başladığı dozlar olduğu dikkati çekmektedir. Bu veriler ışığında, sıçanlarda grayanotoksin-III'ün minimal etkin dozunun kabaca 5 $\mu\text{g/kg}$ /i.v. ve lethal dozunun ise 50 $\mu\text{g/kg}$ /i.v. civarında olduğunu söylemek yanlış olmaz. Yine bu bulgular çalışmamızda kullanılan doz aralıklarının yeterli ve uygun olduğunu da göstermiştir. Yapılan litera-

tür incelemesinde, grayanotoksin-III'ün sıçanlar için i.v. lethal dozu hakkında sağlıklı ve net bir veri olmadığı görülmüştür. Yalnızca oldukça eski tarihli bir çalışmada grayanotoksin-III için i.p. LD50 değeri 0,908 mg/kg olarak belirtilmektedir ⁽¹⁴⁾.

Deli bal oral olarak alındığında çoğu kez yaklaşık 1,5-3 saat içerisinde emilmekte ve zehirlenme belirtileri vermeye başlamaktadır. Besinlerle birlikte alımı, tüketilen miktar ve bazı farmakokinetik farklılıklar nedeniyle bu süre değişebilir ^(17,18). Az sayıda deneysel çalışmada bal ekstraktı halinde hayvanlara oral, i.p. ve intraserebroventriküler gibi farklı yollarla uygulanmıştır ⁽²³⁻²⁸⁾. Çalışmamızda, deli bal içerisinde en fazla bulunan ve oldukça toksik olduğu bilinen grayanotoksin-III, daha önceki çalışmalardan farklı olarak i.v. yolla verilmiş olup, çalışma sonuçlarımızın absorpsiyon kaynaklı olası değişikliklerden etkilenmesi engellenmeye çalışılmıştır. Aynı zamanda benzer çalışmalara nazaran daha düşük dozda toksin uygulanmıştır. Grayanotoksin-III, i.v. verildiğinden diğer uygulama yollarına göre çok kısa bir süre sonra toksisite belirtileri gözlenmeye başlanmıştır. Bu açıdan bakıldığında i.v. uygulama sonrası bulgularımızın daha sonraki çalışmalar için de yol gösterici olabileceğini düşünmekteyiz.

Sıçanlara i.v. grayanotoksin-III uygulanması sonrasında, etkin dozlar olan 10 ve 20 $\mu\text{g/kg}$ 'lık dozlarda etki süresinin en fazla 25 dk. ile sınırlı olduğu görülmektedir. Yaklaşık 120 dk.'lık gözlem sonucu elde edilen bu verilere göre kardiyovasküler kollaps ve ölüm, 50 $\mu\text{g/kg}$ ve üstündeki yüksek dozlardan sonra ilk 10 dk. içinde görülmüştür. Aksine zehirlenme olgularından oluşan bir çalışmada, toksikasyon bulgularının başlaması ve devam etmesi ile tüketilen bal miktarı arasında bir korelasyona rastlanmamıştır ⁽¹⁷⁾. İnsanlarda görülen deli bal zehirlenmesi olgularında ölümün nadir olması ^(29,30) kandaki toksin miktarının ölümcül seviyelere ulaşmadığını, oral tüketilen deli balın içerisindeki toksinlerin gastrointestinal sistemden yavaş emilerek hızlı elimine edildiğini akla getirmektedir. Zehirlenme olgularından elde edilen klinik intoksikasyon verilerine göre insanlarda gastrointestinal sistemden emilen toksin miktarı çoğunlukla minimal etkin doz ile letal doz arasında kalmaktadır. İntoksikasyon bulgularının 4-6 saat sürmesi de ⁽³¹⁻³⁴⁾

emilimin yavaş ve uzun süre devam ettiğini destekler niteliktedir. Bununla birlikte, türler arasında farklılıklar olabileceği ve deli bal içerisinde bulunması olası diğer toksin ve maddelerin de toksisiteye katkı sağlayabileceği unutulmamalıdır ^(35,36). Zehirlenmiş hastalardan alınacak serum örneklerinde grayanotoksin analizlerinin yapılması, zamana göre toksin düzeyi seyirinin ortaya konmasını sağlayabilir ve bu şekilde hastaların tedavisi açısından yararlı bilgilere ulaşılması olası olabilir. Ayrıca deli bal içindeki toksinlerin insanlarda gastrointestinal sistemden yavaş emilmesi bu analizlerle teyid edilerek, emilimin engellenmesine yönelik tedavi seçenekleri kullanılabilir. Böyle bir çalışmanın hastaların tedavisine şüphesiz önemli katkıları olacaktır. Önümüzdeki günlerde bu konuya dair daha ileri çalışmaların planlanması gereklidir.

Gryanotoksin-III sonrası solunum sayılarının gözlemlendiği az sayıda deneysel çalışma bulunmaktadır. Onat ve ark. ^(10,23) bal ekstraktı şeklinde sıçanlara farklı dozlarda i.p. yolla deli bal uygulaması, onların solunum sayılarında doza bağlı azalmaya neden olmuştur. Buna karşın Türkmen ve ark., ⁽²⁸⁾ farklı dozlarda i.p. gryanotoksin-III'ün gruplar arasında solunumsal yönden anlamlı bir değişime neden olmadığını ortaya koymuştur. Klinik verilerde de insanlarda solunuma dair belirgin bir bulgu belirtilmemektedir ⁽³⁷⁻³⁹⁾. Çalışmamızda, özellikle lethal dozlarda (50 $\mu\text{g/kg}$ ve üstü) sıçanlarda hızla solunum arresti gelişmiştir. Ancak ölümün solunum arrestinden mi yoksa kardiyak arrestten mi kaynaklandığı tartışmalıdır. Deney sırasında solunumu duran sıçanlara solunum desteği verilmesine rağmen, ölümün gelişmesi, ölüm nedeninin kardiyak arrest olduğunu düşündürmektedir. Ancak, daha düşük dozlarda (20 $\mu\text{g/kg}$ 'dan az dozlarda) görülen solunum yavaşlamasında uygulanan solunum desteğinin kardiyak toparlanmaya yardımcı olduğu görülmüştür. Buna göre, grayanotoksin-III'e bağlı gelişen ölümün başlıca nedeninin kardiyak arrest olduğu, ancak solunumun bozulmasının da olaya katkı sağladığı anlaşılmaktadır.

Çalışmamızla deneysel olarak i.v. grayanotoksin-III'ün doz bağımlı bir şekilde hipotansiyona neden olduğu ortaya konmuştur. Sonuçlarımız Türkmen ve ark.'nın ⁽²⁸⁾ toksini i.p. yolla verdiği çalışma bulgularıyla da uyumludur. Sonuç olarak, grayanotoksin-III

içeren deli bal zehirlenme olgularından elde edilen klinik bulgular da bu durum gözlenmektedir⁽³¹⁻³⁴⁾. Ancak etkinin doza bağımlı arttığının gösterilmesi bulgularımızı değerli kılmaktadır. Benzer şekilde Onat ve ark.'da^(10,23) deli balı, bal eksrakı olarak i.p. yolla sıçanlara vermiş doza bağlı benzer etkiler gözlemlenmiştir. EKG kayıtlarından elde edilen kalp tep atım sayıları incelendiğinde ise, i.v. grayanotoksin-III'ün toksinin parenteral verildiği benzer çalışmalarla⁽²⁸⁾ uyumlu şekilde doza bağlı bradikardi yaptığı görülmektedir. Bradikardinin kendisi klinik olarak hipotansiyona neden olabildiğinden çalışmamızdaki hipotansiyonun kaynağının yalnızca bradikardi mi olduğu, yoksa hipotansif etkide başka faktörlerin de (örneğin, muskarinik etki) katkı sağlayıp sağlamadığı konusu ayrı bir araştırma konusu gibi görünmektedir. Grayanotoksin-III'le yapılacak izole organ banyosu çalışmaları ile damarlardaki in vitro etkileri incele-nirse bu konuda daha sağlıklı bilgiler elde edilebilir. Deli bal zehirlenmelerinde bradikardi tedavisi sonrası hipotansiyonun düzelmesi fakat tam olarak normotansiyon sağlanamaması hipotansiyonun asıl sorum-lusunun kardiyak kökenli olduğu ancak başka faktörlerin de hipotansiyon gelişimine katkı sağladığını düşündürmektedir.

Grayanotoksin-III, düşük dozda (5 µg/kg) kalp atım sayısında değişikliğe neden olmazken doza bağımlı bir etkiyle yüksek dozlarda (50 µg/kg ve üzeri) yaklaşık 10 dk. içinde kardiyak arreste neden olmuştur. On ve 20 µg/kg dozlarda ise yine doz bağımlı bradikardik etki gözlenmiştir. Benzer şekilde Onat ve ark.'nın^(10,23) deneysel çalışmasında da, i.p. deli bal ile benzer etkiler görülmüştür. İlginç olarak, Yılmaz ve ark.⁽¹⁷⁾ deli bal zehirlenmesi ile hastaneye başvuran 66 hastadan oluşan klinik çalışmalarında, tüketilen bal miktarıyla kalp hızı arasında bir ilişki bulunmadığını belirtmektedir. Bu ilişkinin görülme-mesinde yukarıda değindiğimiz oral biyoyararlanım farklılıklarının etkisi olabilir. Çalışmamızda, sıçan-larda kalp hızında doza bağlı belirgin farklılıklar görülmüştür. Ayrıca klinik gözlemlerden farklı şekil-de tüm doz aralıklarında atriyoventriküler blok etki-sinin olmadığı, bunun yerine yüksek dozlarda kardi-yak arreste, düşük dozlarda ise sinüzal bradikardiye neden olduğu, kalp iletim hızını yavaşlatmadığı

bulunmuştur.

Sonuç olarak, grayanotoksin-III'ün sıçanlarda i.v. uygulanması sonucu 5 µg/kg dozunda güvenli olduğu ve herhangi bir kardiyovasküler etkisinin olmadığı, 10 ve 20 µg/kg dozlarda doza bağlı olarak bradikardi, hipotansiyon ve solunum yavaşlamasına neden oldu-ğu; 50 µg/kg ve 100 µg/kg dozlarında ise kardiyak arrest sonucu ölüme yol açtığı ortaya konmuş olup, ilk kez deneysel bir çalışmayla doza bağlı kardiyo-vasküler etkileri gösterilmiştir. Sıçanlarda i.v. yoldan yaklaşık minimum etkin doz 10 µg/kg ve lethal doz 50 µg/kg civarında gözlemlenmiştir, ancak bunun daha net şekilde ortaya konması için yeni ve daha kapsamlı çalışmalar gerekmektedir.

Bu çalışma Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (DÜBAP) tarafından desteklen-miştir (2011.04.03.080).

KAYNAKLAR

1. Biberoğlu S, Biberoğlu K, Komşuoğlu B. Mad honey. *JAMA* 1988;259(13):1943.
2. Yavuz H, Ozel A, Akkus I, Erkul I. Honey poisoning in Turkey. *Lancet* 1991;337(8744):789-90.
3. Gunduz A, Turedi S, Russell RM, Ayaz FA. Clinical review of grayanotoxin/mad honey poisoning past and present. *Clinical Toxicology* 2008;46:437-42. <https://doi.org/10.1080/15563650701666306>.
4. Gündüz A, Tatlı Ö, Türedi S. Geçmişten Günümüze Deli Bal Zehirlenmesi. *Türkiye Acil Tıp Dergisi* 2008;8(1):46-9.
5. Palmer ME, Betz JM. Plants; grayanotoxin, Chapter 118. In Nelson LS, Lewin NA, Howland MA, Hoffman RS, Goldfrank LR, Flomenbaum NE (eds). *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*. 9th ed. New York, The McGraw-Hill Companies; 2011. p.1553.
6. Pamir F. Klinik Toksikoloji, Ankara Yarı Açık Cezaevi Matbaası, Ankara, 1969. p.457-458.
7. Başgül A. Deli Bal Zehirlenmesi. *Yoğun Bakım Dergisi* 2003;3(1):33-6.
8. Gunduz A, Bostan H, Turedi S, Nuhoglu I, Patan T. Wild flowers and mad honey. *Wilderness Environ Med* 2007;18:69-71.
9. Karakaya AE. Zehirli Barın Grayanotoksin içeriği ve Rhododendron Türleri ile ilişkisinin Araştırılması. *Ankara Ecz Fak Mec* 1977;7:111-5.
10. Onat FY, Yegen BC, Lawrence R, Oktay A, Oktay S. Mad honey poisoning in man and rat. *Rev Environ Health* 1991;9(1):3-9.
11. Sütülpınar N, Mat A. Poisoning by toxic honey in Turkey. *Arch Toxicol* 1993;67:148-50.
12. Anşın R, Terzioğlu S. Mor Çiçekli Orman Gülünün Yeni Bir Varyetesi. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 1994;18:137-40.
13. Gündüz A, Türedi S, Ayaz FA. Deli Balın İçindeki Zehir:

- Grayanotoxin. *Eurasian J Emerg Med* 2011;95-6.
https://doi.org/10.5152/jaem.2011.018
14. Scott PM, Coldwell BB, Wiberg GS. Grayanotoxins: occurrence and analysis in honey and a comparison of toxicities in mice. *Fd Cosmet Toxicol* 1971;9:179-84.
 15. Yuki T, Yamaoka K, Yakehiro M, Seyama I. State-dependent action of grayanotoxin I on Na⁺ channels in frog ventricular myocytes. *J Physiol* 2001; 777-90.
 16. Maejima H, Kinoshita E, Seyama I, Yamaoka K. Distinct sites regulating grayanotoxin binding and unbinding to D4S6 of Na(v)1.4 sodium channel as revealed by improved estimation of toxin sensitivity. *J Biol Chem* 2003;278:9464-71.
https://doi.org/10.1074/jbc.M212133200
 17. Yilmaz O, Eser M, Sahiner A, Altintop L, Yesildag O. Hypotension, bradycardia and syncope caused by honey poisoning. *Resuscitation* 2006;68(3):405-8.
https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2005.07.014
 18. Viccellio P. Systemic poisonous plant intoxication. Handbook of Medical Toxicology, Washington: Library of Congress Cataloging, 1993. p.718.
 19. Ergun K, Tufekcioglu O, Aras D, Korkmaz S, Pehlivan S. A rare cause of atrioventricular block: mad honey intoxication. *Int J Cardiol* 2005;99:347-8.
https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2003.11.041
 20. Cakar MA, Can Y, Vatan MB, Demirtas S, Gunduz H, Akdemir R. Atrial fibrillation induced by mad honey intoxication in a patient with Wolf-Parkinson-White syndrome. *Clin Toxicol (Phila)* 2011;49(5):438-9.
https://doi.org/10.3109/15563650.2011.586351
 21. Yildirim N, Aydin M, Cam F, Celik O. Clinical presentation of non-ST-segment elevation myocardial infarction in the course of intoxication with mad honey. *Am J Emerg Med* 2008;26:108.
https://doi.org/10.1016/j.ajem.2007.01.003
 22. Aliyev F, Türkoglu C, Celiker C, Firatli I, Alici G, Uzunhasan I. Chronic mad honey intoxication syndrome: a new form of an old disease? *Europace* 2009;11(7):954-6.
https://doi.org/10.1093/europace/eup126
 23. Onat F, Yegen BC, Lawrence R, Oktay A, Oktay S. Site of action of grayanotoxins in mad honey in rats. *J Appl Toxicol* 1991;11(3):199-201.
 24. Sibel S, Enis YM, Hüseyin S, Timucin AA, Duran O. Analysis of grayanotoxin in Rhododendron honey and effect on antioxidant parameters in rats. *J Ethnopharmacol* 2014;156:155-61.
https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.08.027
 25. Gunduz A, Eraydin I, Turkmen S, Kalkan OF, Turedi S, Eryigit U et al. Analgesic effects of mad honey (grayanotoxin) in mice models of acute pain and painful diabetic neuropathy. *Hum Exp Toxicol* 2014;33(2):130-5.
https://doi.org/10.1177/0960327113482693
 26. Sahin H, Yildiz O, Kolayli S. Effects of Mad Honey on Some Biochemical Parameters in Rats. *J Evid Based Complementary Altern Med* 2016;21(4):255-9.
https://doi.org/10.1177/2156587215596430
 27. Silici S, Doğan Z, Sahin H, Atayoğlu T, Yakan B. Acute effects of grayanotoxin in rhododendron honey on kidney functions in rats. *Environ Sci Pollut Res Int* 2016;23(4):3300-9.
https://doi.org/10.1007/s11356-015-5534-z
 28. Türkmen S, Karagöz Ü, Gündüz A, Turedi S, Akça M, Yıldırım M. The dose-dependent effect of grayanotoxin on the cardiovascular system. *Turk J Med Sci* 2013;43:700-5.
https://doi.org/10.3906/sag-1209-11
 29. Demir H, Denizbasi A, Onur O. Mad honey intoxication: a case series of 21 patients. *ISRN Toxicol* 2011;2011:526426.
http://dx.doi.org/10.5402/2011/526426
 30. Jansen SA, Kleerekoper I, Hofman ZL, Kappen IF, StaryWeinzinger A, van der Heyden MA. Grayanotoxin poisoning: 'mad honey disease' and beyond. *Cardiovasc Toxicol* 2012;12(3):208-15.
https://doi.org/10.1007/s12012-012-9162-2
 31. Eroğlu SE, Urgan O, Onur OE, Denizbaşı A, Akoğlu H. Grayanotoxin (mad honey) - ongoing consumption after poisoning. *Balkan Med J* 2013;30(3):293-5.
https://doi.org/10.5152/balkanmedj.2013.8100
 32. Uzun H, Narci H, Tayfur I, Karabulut KU, Karcioglu O. Mad honey intoxication: what is wrong with the blood glucose? a study on 46 patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013;17(20):2728-31.
 33. Yaylaci S, Kocayigit I, Aydin E, Osken A, Genc AB, Cakar MA et al. Clinical and laboratory findings in mad honey poisoning: a single center experience. *Niger J Clin Pract* 2014;17(5):589-93.
https://doi.org/10.4103/1119-3077.141424
 34. Erenler AK. Cardiac Effects of Mad Honey Poisoning and Its Management in Emergency Department: A Review from Turkey. *Cardiovasc Toxicol* 2015;16(1):1-4.
https://doi.org/10.1007/s12012-015-9310-6
 35. Zhang HP, Wang HB, Wang LQ, Bao GH, Qin GW. A new 1,5-seco grayanotoxin from Rhododendron decorum. *J Asian Nat Prod Res* 2005;7(1):87-90.
https://doi.org/10.1080/10286020310001609001
 36. Islam MN, Khalil MI, Islam MA, Gan SH. Toxic compounds in honey. *J Appl Toxicol* 2014;34(7):733-42.
https://doi.org/10.1002/jat.2952
 37. Chen SP, Lam YH, Ng VC, Lau FL, Sze YC, Chan WT et al. Mad honey poisoning mimicking acute myocardial infarction. *Hong Kong Med J* 2013;19(4):354-6.
https://doi.org/10.12809/hkmj133936
 38. Engel P, Blank R, Nalenz C. Turkish patient with syncope and accompanying vegetative symptoms with bradycardia after eating pontin honey. *Med Klin Intensivmed Notfmed* 2014;109(6):437-9.
https://doi.org/10.1007/s00063-014-0396-6
 39. Sohn CH, Seo DW, Ryoo SM, Lee JH, Kim WY, Lim KS et al. Clinical characteristics and outcomes of patients with grayanotoxin poisoning after the ingestion of mad honey from Nepal. *Intern Emerg Med* 2014;9(2):207-11.
https://doi.org/10.1007/s11739-013-0998-7