

Bazı Makrofungus Toksinlerinin Elektrokimyasal Tayini

Ayşe Betül Karaduman

DOKTORA TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Ağustos 2017

Electrochemical Determination of Some Macrofungi Toxins

Ayşe Betül Karaduman

DOCTORAL DISSERTATION

Department of Biology

August 2017

Bazı Makrofungus Toksinlerinin Elektrokimyasal Tayini

Ayşe Betül Karaduman

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Bilim Dalında

DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Yamaç

“Bu tez TÜBİTAK tarafından 114Z403 no’lu proje kapsamında desteklenmiştir.”

Ağustos 2017

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı doktora öğrencisi Ayşe Betül Karaduman'ın DOKTORA tezi olarak hazırladığı “Bazı Makrofungus Toksinlerinin Elektrokimyasal Tayini” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Mustafa Yamaç

İkinci Danışman : Prof. Dr. Yücel Şahin

Doktora Tez Savunma Jürisi:

Üye : Prof. Dr. Mustafa Yamaç

Üye : Prof. Dr. Semra İlhan

Üye : Prof. Dr. Merih Kıvanç

Üye : Doç. Dr. Buket Kunduhoğlu

Üye : Doç. Dr. Nalan Yılmaz Sarıözlü

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Prof. Dr. Mustafa Yamaç danışmanlığında hazırlamış olduğum “Bazı Makrofungus Toksinlerinin Elektrokimyasal Tayini” başlıklı DOKTORA tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 21/08/2017

Ayşe Betül Karaduman

ÖZET

Bu çalışma, letal etkiye sahip makrofungus toksinleri olan α -amanitin ve falloidin serum ve idrar örneklerinde belirlenebilmesi için elektrokimyasal bir tayin yöntemi geliştirilmesi amacı ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında α -amanitin ve falloidin toksinleri ile biyolojik sıvılarda bulunan bazı elektroaktif bileşenlerin elektrokimyasal davranışları araştırılmıştır. Elektrokimyasal yöntemlerle doğrudan tayin edilebilirliği anlaşılan α -amanitin ve falloidin toksinlerinin serum ve idrardan tayini sırasında girişim etkisi sorunu çeşitli elektrot modifikasyon işlemleri ile aşılmaya çalışılmış ve bu etki tamamen giderilememiştir. Ancak, α -amanitin ve falloidin toksinlerinin serum ve idrar örneklerinden tayin öncesi ekstraksiyonu için başarılı protokoller geliştirilmiştir. Seçilen protokoller ile elde edilen ekstraktların toksin içerikleri diferansiyel puls voltametri yanında HPLC yöntemi ile de tayin edilmiştir. Falloidinin serum ve idrar örneklerinden ekstraksiyonunun tam olarak gerçekleştirildiği, fakat α -amanitin serumdan yüksek, idrardan ise daha düşük bir verimle ekstrakte edilebildiği anlaşılmıştır. Amanitin ELISA tayin kiti ile gerçekleştirilen çalışmalarda, örneklerde bulunan α -amanitin, üreticinin önerdiği protokol ile seçici olarak belirlenememiştir.

Gerçekleştirilen çalışmalar ile literatürde ilk kez öldürücü etkiye sahip makrofungus toksinleri olan α -amanitin ve falloidin tayinleri için semikantitatif elektrokimyasal bir yöntem geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu toksinlerin vücut sıvılarında hızlı biçimde tayin edilmesi ile mantar zehirlenmesi durumunda hastanın daha kısa sürede tedavisinin yapılması, yaşamının kurtarılması, pahalı ve uzun tedavi süreçlerinden de kaçınılması mümkün olabilecektir.

Anahtar kelimeler: *Amanita phalloides*, α -amanitin, Falloidin, Elektrokimyasal analiz

SUMMARY

The objective of this study was developing an electrochemical assay method in order to determine of α -amanitin and phalloidin, which are lethal macrofungus toxins, from serum and urine samples.

In the scope of this study, the electrochemical behaviours of α -amanitin, phalloidin and some of the electro-active components found in the biological fluids were investigated. The problem of interference effect, during the determination of α -amanitin and phalloidin which are electro-active toxins, from serum and urine, was tried to be overcome by different electrode modifications. However, the effect has not been eliminated completely. Nevertheless, successful extraction protocols were developed for α -amanitin and phalloidin toxins from serum and urine samples prior to determination process. The toxin content of the extracts which obtained by chosen protocols were determined by differential pulse voltammetry and HPLC. It was concluded that phalloidin can be entirely extracted from both serum and urine samples, whereas α -amanitin can be extracted from serum and urine samples with higher and lower efficiencies, respectively. During the studies with Amanitin ELISA assay kit, the toxin in the samples could not have been distinctively determined with the protocol suggested by the producers of the kit.

This study is the first attempt in the literature to develop a semi-quantitative electrochemical method for the determination of the lethal macrofungus toxins, α -amanitin and phalloidin. In the case of mushroom poisoning, the fast determination of these toxins in the body fluids, will enable saving patients' lives through rapid treatment and also avoiding expensive and prolonged treatment process.

Keywords: *Amanita phalloides*, α -amanitin, Phalloidin, Electrochemical analysis

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince tecrübe ve sabrını benden esirgemeyen, değerli bilgileri ile yön gösteren danışman hocalarım sayın Prof. Dr. Mustafa YAMAÇ (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi) ve sayın Prof. Dr. Yücel ŞAHİN'e (Yıldız Teknik Üniversitesi) sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmalarının takibi sırasında, düzenli aralıklarla önerileri ile çalışmama değer katan Doç. Dr. Buket KUNDUHOĞLU (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi) ve Doç. Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ'ye (Anadolu Üniversitesi) teşekkür ederim.

Gerçekleştirdiğim deneyler kapsamında hem teknik destek sağlayan hem de fiili olarak çalışmama katkıda bulunan Yrd. Doç. Dr. Musa ŞÖLENER (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi) ve Yrd. Doç. Dr. Kamuran GÖRGÜN'e (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi) teşekkür ederim.

Çalışma süreci boyunca beni yalnız bırakmayan ve sonsuz iyilik anlayışıyla bana destek olan arkadaşlarım Hakan GÖRÇAY, Metin GENÇTEN, Hürmüş GÜRSU, Göksu CEYLAN, Seda HACIOĞLU ve Merve YANDIMOĞLU'na teşekkür ederim.

Son olarak yaşamım boyunca her türlü maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen, hoşgörü ve özverileriyle hayatımı daha anlamlı hale getiren sevgili annem, kardeşim ve ben bu yola çıkarken hayatta olan ancak şu anda hayatta olamasa da varlığını en derin şekilde hissettiğim babama sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından, 1001 – Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı kapsamında desteklenen 114Z403 no'lu “Bazı Ölümcül Makrofungus Toksinlerinin Elektrokimyasal Tayini” konulu araştırma projesi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Ayşe Betül KARADUMAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vi
SUMMARY	vii
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI	3
2.1. Makrofungus Kökenli Zehirlenmeler	3
2.1.1. Erken toksisite gösteren makrofungus toksinleri	4
2.1.2. Geç toksisite gösteren makrofungus toksinleri	5
2.1.3. Ülkemizde ve dünyada durum	9
2.2. Toksin Tayin Yöntemleri	11
2.2.1. Wieland/Meixner testi	12
2.2.2. Enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA)	12
2.2.3. Radyoimmün test (RIA)	13
2.2.4. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)	14
2.2.5. Kapiler elektroforez (CE)	14
2.2.6. Sıvı kromatografisi - kütle spektrometresi (LC-MS)	15

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.2.7. Matriks destekli lazer desorpsiyon / iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS)	15
2.3. Elektrokimyasal Sensörler	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Materyal	20
3.2. Yöntem	22
3.2.1. α -amanitin ve falloidin toksinlerinin farklı elektrot sistemleri ile elektrokimyasal davranışının incelenmesi	22
3.2.2. α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal tayinlerinde girişim etkisinin belirlenmesi	23
3.2.2.1. <u>Serum ve idrar ortamındaki girişim yapma ihtimali olan bileşiklerin elektrokimyasal davranışları</u>	24
3.2.2.2. <u>Zehirli mantarlardaki farklı bazı toksinlerin elektrokimyasal davranışları</u>	24
3.2.3. Biyolojik sıvılarda α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal tayini	25
3.2.3.1. <u>Toksinlerin serumdaki elektrokimyasal davranışı</u>	25
3.2.3.2. <u>Toksinlerin idrardaki elektrokimyasal davranışı</u>	26
3.2.3.3. <u>Elektrot modifikasyonu ile elektrodun α-amanitine karşı seçiciliğinin artırılması</u>	26
3.2.3.4. <u>Biyolojik sıvılardan toksin ekstraksiyonu amacıyla katı faz ekstraksiyon kolonu için yöntem optimizasyonu</u>	31
3.2.4. Elektrokimyasal yöntemin HPLC ve ELISA yöntemleri ile karşılaştırılması	37

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4. BULGULAR VE TARTIŞMA	38
4.1. α -amanitin ve Falloidin Toksinlerinin Farklı Elektrot Sistemleri ile Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi	38
4.1.1. Farklı derişimlerde α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal davranışının incelenmesi ve uygun çalışma elektrodunun seçilmesi	38
4.1.2. α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal tayini için uygun pH değerinin belirlenmesi	42
4.2. α -amanitin ve Falloidin Toksinlerinin Elektrokimyasal Tayinlerinde Girişim Etkisinin Belirlenmesi	45
4.2.1. Serum ve idrar ortamındaki girişim yapma ihtimali olan bileşiklerin elektrokimyasal davranışları	45
4.2.1.1. <u>Ürik asidin farklı pH değerlerindeki elektrokimyasal davranışı</u>	46
4.2.1.2. <u>Dopaminin farklı pH değerlerindeki elektrokimyasal davranışı</u>	47
4.2.1.3. <u>Folik asidin farklı pH değerlerindeki elektrokimyasal davranışı</u>	49
4.2.1.4. <u>Parasetamolün farklı pH değerlerindeki elektrokimyasal davranışı</u>	50
4.2.2. Zehirli mantarlardaki bazı toksinlerin elektrokimyasal davranışları.....	52
4.2.2.1. <u>β-amanitin farklı pH değerlerindeki elektrokimyasal davranışı</u>	52
4.2.2.2. <u>γ-amanitin farklı pH değerlerindeki elektrokimyasal davranışı</u>	53
4.2.2.3. <u>Fallasidinin farklı pH değerlerindeki elektrokimyasal davranışı</u>	54
4.2.2.4. <u>Zehirli mantarlarda bulunan diğer bazı toksinlerin α-amanitin ve falloidin toksinlerinin DPV yöntemi ile tayinine etkisi</u>	56

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.3. Biyolojik Sıvılarda α -amanitin ve Falloidin Toksinlerinin Elektrokimyasal Tayini	62
4.3.1. Toksinlerin serumdaki elektrokimyasal davranışı	62
4.3.2. Toksinlerin idrardaki elektrokimyasal davranışı	67
4.3.3. Elektrot modifikasyonu ile elektrodun α -amanitine karşı seçiciliğinin artırılması	72
4.3.3.1. <u>Asit ve baz çözeltileri kullanılarak kalem ucu elektroda ön işlem uygulanması</u>	72
4.3.3.2. <u>α-amanitin tayini için moleküler baskılanmış polimer sentezi</u>	77
4.3.3.3. <u>Moleküler baskılanmış polimer ile modifiye elektrotların α-amanitin tayininde kullanımı</u>	94
4.3.4. Biyolojik sıvılardan toksin ekstraksiyonu amacıyla katı faz ekstraksiyon kolonu için yöntem optimizasyonu	106
4.3.4.1. <u>Serumdan toksin ekstraksiyonu için uygun yöntemin seçilmesi</u>	107
4.3.4.2. <u>İdrardan toksin ekstraksiyonu için uygun yöntemin seçilmesi</u>	112
4.4. Elektrokimyasal Yöntemin HPLC ve ELISA Yöntemleri ile Karşılaştırılması	119
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	127
KAYNAKLAR DİZİNİ	132
ÖZGEÇMİŞ	139

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>Amanita phalloides</i> , <i>Amanita virosa</i> ve <i>Amanita verna</i> karpofor yapıları	5
2.2. α -amanitin ve fallooidinin kimyasal yapısı	6
2.3. Mantar zehirlenmesi tedavisinin akış şeması	8
2.4. Elektrokimyasal çalışma düzeneği	19
4.1. Fosfat tamponu ortamında 10^{-5} - 10^{-7} M derişimde α -amanitin ve falloidine ait dönüşümlü voltamogramlar (Camsı karbon elektrot)	39
4.2. Fosfat tamponu ortamında 10^{-5} - 10^{-7} M derişimde α -amanitin ve falloidine ait dönüşümlü voltamogramlar (Kalem ucu elektrot)	39
4.3. Fosfat tamponu ortamında 10^{-5} - 10^{-7} M derişimde α -amanitin ve falloidine ait dönüşümlü voltamogramlar (Ekran baskılı elektrot)	40
4.4. Fosfat tamponu ortamında 10^{-5} - 10^{-7} M derişimde α -amanitin ve falloidine ait dönüşümlü voltamogramlar (Ekran baskılı elektrot)	40
4.5. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda α -amanitine ait diferansiyel puls voltamogramları	43
4.6. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda falloidine ait diferansiyel puls voltamogramları	44
4.7. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda ürik aside ait diferansiyel puls voltamogramları	46
4.8. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda dopamine ait diferansiyel puls voltamogramları	48
4.9. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda folik aside ait diferansiyel puls voltamogramları	49
4.10. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda parasetamole ait diferansiyel puls voltamogramları	51
4.11. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda β -amanitine ait diferansiyel puls voltomagramları	53

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.12. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda γ -amanitine ait diferansiyel puls voltamogramları	54
4.13. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda fallasidine ait diferansiyel puls voltamogramları	55
4.14. pH 7,4 değerinde hazırlanan toksin karışımından elde edilen voltamogramlar	57
4.15. pH 7,4 değerinde hazırlanan toksin karışımından elde edilen akım cevap değişimleri	58
4.16. pH 3,0 değerinde hazırlanan toksin karışımından elde edilen voltamogramlar ...	60
4.17. pH 3,0 değerinde hazırlanan toksin karışımından elde edilen akım cevap değişimleri	60
4.18. pH 7,4 değerinde serum ortamında hazırlanan toksin karışımından elde edilen voltamogramlar	63
4.19. pH 7,4 değerinde serum ortamında hazırlanan toksin karışımından elde edilen akım cevap değişimleri	64
4.20. pH 3,0 değerinde serum ortamında hazırlanan toksin karışımından elde edilen voltamogramlar	65
4.21. pH 3,0 değerinde serum ortamında hazırlanan toksin karışımından elde edilen akım cevap değişimleri	66
4.22. pH 7,4 değerinde idrar ortamında hazırlanan toksin karışımından elde edilen voltamogramlar	68
4.23. pH 7,4 değerinde idrar ortamında hazırlanan toksin karışımından elde edilen akım cevap değişimleri	69
4.24. pH 3,0 değerinde idrar ortamında hazırlanan toksin karışımından elde edilen voltamogramlar	70
4.25. pH 3,0 değerinde idrar ortamında hazırlanan toksin karışımından elde edilen akım cevap değişimleri	71

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.26. Kalem ucu elektrot ile pH 7,4 değerinde fosfat tamponunda α -amanitine karşı elde edilen voltamogram	72
4.27. Sülfürik asit içerisinde dönüşümlü voltametri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α -amanitin belirlenmesine etkisi	73
4.28. Fosforik asit içerisinde dönüşümlü voltametri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α -amanitin belirlenmesine etkisi	73
4.29. Nitrik asit içerisinde dönüşümlü voltametri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α -amanitin belirlenmesine etkisi	74
4.30. Asetik asit içerisinde dönüşümlü voltametri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α -amanitin belirlenmesine etkisi	74
4.31. Florosülfonik asit içerisinde dönüşümlü voltametri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α -amanitin belirlenmesine etkisi	75
4.32. Sodyum hidroksit içerisinde dönüşümlü voltametri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α -amanitin belirlenmesine etkisi	75
4.33. Sülfürik asit içerisinde kronoamperometri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α -amanitin belirlenmesine etkisi	76
4.34. Fosforik asit içerisinde kronoamperometri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α -amanitin belirlenmesine etkisi	76
4.35. Nitrik asit içerisinde kronoamperometri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α -amanitin belirlenmesine etkisi	76
4.36. Asetik asit içerisinde kronoamperometri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α -amanitin belirlenmesine etkisi	77
4.37. Florosülfonik asit içerisinde kronoamperometri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α -amanitin belirlenmesine etkisi	77

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.38. Pırol-2-karboksilik asit ile kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitinin belirlenmesine etkisi	78
4.39. Pırol-2-karboksilik asit ve pırol varlığında kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitinin belirlenmesine etkisi	80
4.40. Pırol-2-karboksilik asit, pırol ve çinko varlığında kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitinin belirlenmesine etkisi	82
4.41. Pırol-2-karboksilik asit, pırol, çinko ve sodyum karbonat varlığında kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitinin belirlenmesine etkisi	83
4.42. Anilin-2-sülfonik asit ile kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitinin belirlenmesine etkisi	84
4.43. Anilin-2-sülfonik asit ve anilin varlığında kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitinin belirlenmesine etkisi	86
4.44. Anilin-2-sülfonik asit, anilin ve çinko varlığında kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitinin belirlenmesine etkisi	88
4.45. o-fenilendiamin ile kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitinin belirlenmesine etkisi	89
4.46. o-fenilendiamin ve anilin varlığında kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitinin belirlenmesine etkisi	91
4.47. o-fenilendiamin, anilin ve çinko varlığında kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitinin belirlenmesine etkisi	93

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.48. T1 ve pirol varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi	95
4.49. T2 ve pirol varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi	97
4.50. T1 ve anilin varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi	99
4.51. T2 ve anilin varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi	101
4.52. T1 ve pirol-2-karboksilik asit varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi	103
4.53. T1, pirol-2-karboksilik asit ve 4-vinil piridin varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi	103
4.54. T1, pirol-2-karboksilik asit, 4-vinil piridin ve çinko varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi	104
4.55. T2 ve pirol-2-karboksilik asit varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi	104
4.56. T2, pirol-2-karboksilik asit ve 4-vinil piridin varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi	105
4.57. T2, pirol-2-karboksilik asit, 4-vinil piridin ve çinko varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi	105
4.58. α -amanitin, falloidin ve ürik asidin İTK sonuçları	106
4.59. Seruma ait diferansiyel puls voltamogramı	108
4.60. Seruma ait katı faz ekstraksiyon kolonundan geçirilmiş çözeltilerin İTK görüntüleri	108

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.61. Serum örneklerinin ekstraksiyon sıvılarına ait diferansiyel puls voltamogramları	109
4.62. α -amanitin ve falloidin ilave edilen serum örneklerinin ekstraksiyon sıvılarına ait diferansiyel puls voltamogramları	111
4.63. İdrara ait diferansiyel puls voltamogramı	112
4.64. İdrara ait katı faz ekstraksiyon kolonundan geçirilmiş çözeltilerin İTK görüntüleri	113
4.65. İdrar örneklerinin ekstraksiyon sıvılarına ait diferansiyel puls voltamogramları	114
4.66. α -amanitin ve falloidin ilave edilen idrar örneklerinin ekstraksiyon protokollerinin diferansiyel puls voltamogramları	117
4.67. Farklı α -amanitin derişimleri için HPLC koşullarında elde edilen kalibrasyon grafiğı	120
4.68. Farklı falloidin derişimleri için HPLC koşullarında elde edilen kalibrasyon grafiğı	121
4.69. Farklı α -amanitin derişimleri ve gerçek örnekler ile çalışılan ELISA kiti petrisi	123
4.70. Farklı α -amanitin derişimleri için ELISA kiti ile elde edilen absorbans değerleri	123

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Makrofungus toksinlerinin sınıflandırılması	4
2.2. <i>Amanita phalloides</i> zehirlenmelerinin klinik evrelerine ait bulgular	7
2.3. Siklopeptid yapıdaki toksinler için kullanılan bazı ölçüm yöntemleri	17
3.1. Çalışmada kullanılan cihazlara ait marka bilgileri	20
3.2. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemelerin marka bilgileri	21
3.3. α -amanitin ve falloidin elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi aşamasında kullanılan deney koşulları	23
3.4. Modifiye kalem ucu elektrot için, dönüşümlü voltametri yöntemi ile uygulanan ön işlem koşulları	27
3.5. Modifiye kalem ucu elektrot için, kronoamperometri yöntemi ile uygulanan ön işlem koşulları	27
3.6. α -amanitin tayini için moleküler baskılanmış polimer sentezi çalışma koşulları	28
3.7. T1 ve T2 varlığında gerçekleştirilen moleküler baskılanmış polimer sentez koşulları	30
3.8. Serumdan toksin ekstraksiyonu yöntem optimizasyonu için Oasis HLB kolonunda kullanılan protokoller	34
3.9. İdrardan toksin ekstraksiyonu yöntem optimizasyonu için Oasis HLB kolonunda kullanılan protokoller	35
3.10. α -amanitin ve falloidin tayininde kullanılan HPLC koşulları	37
4.1. α -amanitin ve falloidine ait farklı elektrot sistemlerinde elde edilen pik potansiyel ve akım değerleri	41
4.2. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda α -amanitine ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri	43
4.3. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda falloidine ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri	44

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.4. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda ürik aside ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri	47
4.5. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda dopamine ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri	48
4.6. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda folik aside ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri	50
4.7. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda parasetamole ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri	51
4.8. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda β -amanitine ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri	53
4.9. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda γ -amanitine ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri	54
4.10. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda fallasidine ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri	55
4.11. pH 7,4 değerinde hazırlanan toksin karışımından elde edilen pik potansiyelleri ve akım değerleri	58
4.12. pH 7,4 fosfat tamponunda α -amanitine ait akım cevabının karışımın farklı aşamalarındaki % değişimi	59
4.13. pH 3,0 değerinde hazırlanan toksin karışımından elde edilen pik potansiyelleri ve akım değerleri	61
4.14. pH 3,0 fosfat tamponunda falloidine ait akım cevabının karışımın farklı aşamalarındaki % değişimi	61
4.15. pH 7,4 değerinde serum ortamında hazırlanan toksin karışımına ait pik potansiyelleri ve akım cevapları	64
4.16. pH 3,0 değerinde serum ortamında hazırlanan toksin karışımına ait pik potansiyelleri ve akım cevapları	66
4.17. pH 7,4 değerinde idrar ortamında hazırlanan toksin karışımına ait pik potansiyelleri ve akım cevapları	69

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.18. pH 3,0 değerinde idrar ortamında hazırlanan toksin karışımına ait pik potansiyelleri ve akım cevapları	71
4.19. Serum örneklerine ilave edilen α -amanitin ve falloidin toksinlerinin farklı protokoller ile katı faz ekstraksiyonu sonucunda elde edilen akım cevapları	112
4.20. İdrar örneklerine ilave edilen α -amanitin ve falloidin toksinlerinin farklı protokoller ile katı faz ekstraksiyonu sonucunda elde edilen akım cevapları	118
4.21. Farklı α -amanitin derişimleri için HPLC koşullarında elde edilen pik alan değerleri	120
4.22. Farklı falloidin derişimleri için HPLC koşullarında elde edilen pik alan değerleri	121
4.23. α -amanitin ve falloidinin (10 μ g/ml) 1:1 (v/v) oranında karıştırılması sonucunda elde edilen pik alan değerleri	122
4.24. HPLC koşullarında α -amanitin katı faz ekstraksiyon verimi	122
4.25. HPLC koşullarında falloidinin katı faz ekstraksiyon verimi	122
4.26. Amanitin ELISA kit kullanılarak biyolojik sıvılardan elde edilen absorbens değerleri	124
4.27. α -amanitin ve falloidin toksinlerinin tayini için HPLC ve ELISA yöntemleri kullanılan bazı çalışmalar	124

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Kısaltmalar**

CKE

DPV

LSV

DV

ELISA

İTK

KUE

CE

KA

MALDI-TOF MS

Pt

RIA

LC - MS

HPLC

Açıklama

Camsı Karbon Elektrot

Diferansiyel Puls Voltametri

Doğrusal Taramalı Voltametri

Dönüşümlü Voltametri

Enzim Bağlı İmmünosorbent Testi

İnce Tabaka Kromatografisi

Kalem Ucu Elektrot

Kapiler Elektroforez

Kronoamperometri

Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon / İyonizasyon Uçuş

Zamanlı Kütle Spektrometresi

Platin

Radyoimmün Test

Sıvı Kromatografisi - Kütle Spektrometresi

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda mantar toplayıcılığı, maddi getirisi yanında bir hobi olarak da görülmesi nedeniyle artış göstermiştir. Uygun nem ve mevsim koşulları sağlandığında doğada farklı mantar türlerine rastlanmakta ve kültüre alınan türlerin yanında farklı türlerin de gıda olarak tüketimi artmaktadır. Makrofungusların farklı gelişim dönemlerinde morfolojilerinde farklılıklar görülmesi veya zehirli türlerin görsel olarak zehirsiz türlerle karıştırılma ihtimali mantar kökenli zehirlenmelerin yaşanması açısından risk oluşturmaktadır. Ülkemizde ve dünyadaki mantar zehirlenmesi kökenli ölümler incelendiğinde, birinci dereceden sorumlu en önemli türün *Amanita phalloides* olduğu görülmektedir. Benzer türlerde de bulunan α -amanitin, ölümlerden birinci derece sorumlu toksin olup, geç toksisite göstermekte ve vakaya zamanında müdahale edilememesi durumunda ise ölüm gerçekleşmektedir. Bu tür zehirlenmeler için spesifik bir antidot bulunmaması da tedavi açısından sorun teşkil etmektedir.

Amanita phalloides başta olmak üzere α -amanitin kökenli zehirlenme vakalarında, biyolojik sıvılarda (serum, idrar, mide sıvısı vs.) bulunan bu toksinin tayin edilmesi büyük önem taşımaktadır. Aksi takdirde geç farkedilen semptomlar diğer gıda zehirlenmeleri ile benzer özellik göstermekte olup, ilerleyen aşamalarda ise karaciğer ve böbrek iflası ile hastanın kaybına neden olmaktadır. Farklı makrofungus toksinlerinin çeşitli yöntemlerle tayinini içeren literatürler bulunmaktadır. Bunların içerisinde α -amanitin tayinini amaçlayan çalışma sayısı çok fazla olmayıp, kullanılan yöntemler de hastane acil servisinde uygulanabilir yöntemler değildir. Ticari olarak elde edilebilecek bir α -amanitin ELISA tayin kiti olmasına rağmen bu kitin fiyatı oldukça yüksek ve raf ömrü kısadır. Mantar zehirlenme vakalarının yılın belirli döneminde artış gösterdiği ve her hastaneye bu vakaların gelmediği göz önünde bulundurulursa 48 ve 96'lı setler halinde satılan bu kitlere ülkemizde yoğun bir talep olmadığı kolayca anlaşılabılır.

Bahsedilen nedenlerle α -amanitin tayininin hastanelerin acil servislerinde uygulanabilir, uzman bir araştırmacı gereksinimi olmadan, hızlı, kolay, doğru, hassas ve ucuz bir şekilde yapılabilmesi büyük önem taşımaktadır. Günümüzde sensör

teknolojisinin ilerlediği, bir çip üzerinden birden fazla biyokimyasal analiz testlerinin yapılabilirdiği düşünüldüğünde, bu teknolojilerin büyük bir kısmının temelini oluşturan elektrokimyasal yöntemler önem kazanmaktadır. Elektrokimyasal yöntemlerin tayin amaçlı tercih edilmesinin bir başka nedeni ise bu sistemlerin taşınabilir hale getirilebilir sistemlere dönüştürülebilme esnekliği sağlamasıdır.

Makrofungus kökenli zehirlenmeler ile ilgili araştırmalar incelendiğinde doldurulması gereken bazı boşluklar olduğu dikkat çekmektedir. Bu eksiklikleri kısaca özetlemek gerekirse;

1. Ölümcül mantar zehirlenmelerinin belirlenebilmesi için biyolojik sıvılardan toksin tayinini doğru ve duyarlı bir biçimde gerçekleştirmek gerekmektedir. Bu amaçla kullanılabilecek kolay, hızlı, ulaşılabilir ve ucuz bir yöntem geliştirilmelidir.

2. Bu toksinlerin biyolojik sıvılardan elektrokimyasal yöntemlerle tayin edilmesine ilişkin herhangi bir çalışma yapılmamıştır (Anonim, 2017a; Anonim, 2017b).

3. α -amanitin ve falloidin tayinine ilişkin herhangi bir sensör geliştirilmemiştir.

Bu çalışmada biyolojik sıvılardan hızlı, kolay, doğru, hassas ve ucuz bir şekilde α -amanitin ve falloidin tayini yapılması amaçlanmış ve farklı makrofungus toksinlerinin de elektrokimyasal davranışları incelenmiştir. Bu amaçla yapılması planlanan başlıca çalışma basamakları şunlardır:

1. α -amanitin ve falloidin toksinlerinin farklı elektrot sistemleri ile elektrokimyasal davranışının incelenmesi,
2. α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal tayinlerinde girişim etkisinin belirlenmesi,
3. Biyolojik sıvılarda α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal tayini,
4. Elektrokimyasal yöntemin HPLC ve ELISA yöntemleri ile karşılaştırılması

Bu çalışma literatüre α -amanitin ve falloidin toksinlerinin biyolojik sıvılardan elektrokimyasal yöntemler ile tayinine ilişkin veriler kazandırmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Makrofunguslar besinsel değerleri yanında günümüzde bazı farmakolojik ve tıbbi özellikleri nedeniyle ilgi odağı olmaktadır. Mantar toplayıcılığı, ekonomik getirisi ve sosyo-ekonomik boyutu yanında son zamanlarda hobi olarak da yaygınlaşmış bir eylemdir. Toplanan mantarların zehirli olup olmadığına karar vermek ise hayati önem taşımaktadır. Zehirli bir mantar yenilmesi durumunda yenilen mantarın yaşı miktarı, coğrafik bölgesi, hazırlanış şekli ve zehirlenen bireylere göre elde edilen toksik bulgular değişkenlik gösterebilir. Bu aşamada vakanın hastaneye başvurusu durumunda semptomlar, elde edilen biyokimyasal bulgular ile zehirlenmeye neden olan toksin türünün tespiti ve toksin miktarının tayin edilmesi ise önem taşımaktadır.

2.1. Makrofungus Kökenli Zehirlenmeler

Mueller vd. (2007), günümüzde bilinen yaklaşık 21.679 makrofungus türü olduğunu söylemiştir. Bu türlerin 200-300 kadarı güvenle yenilebilirken, 50-100 kadarının insanlar için zehirli türler olduğu düşünülmektedir (Berger ve Guss, 2005; Yordan vd., 2008). Mantar kökenli zehirlenmelerde ortaya çıkan sendromlar mantarda bulunan ana toksine göre farklılıklar gösterirler. Zehirli mantarlarda bulunan ana toksin grupları Çizelge 2.1’de sunulmuştur (Berger ve Guss, 2005).

Çizelge 2.1. Makrofungus toksinlerinin sınıflandırılması (Berger ve Guss, 2005)

Toksin Grubu	Toksin İçeren Makrofungus Tür Adı
Siklopeptidler	<i>Amanita bisporigera</i> , <i>A. suballiacea</i> , <i>A. tenuifolia</i> , <i>A. brunnescens</i> , <i>A. ocreata</i> , <i>A. phalloides</i> , <i>A. verna</i> , <i>A. virosa</i> , <i>Conocybe filaris</i> , <i>Galerina marginata</i> , <i>G. venenata</i> , <i>Lepiota helveola</i>
Monometilhidrazinler	<i>Gyromitra brunnea</i> , <i>G. caroliniana</i> , <i>G. fastigiata</i> , <i>G. gigas</i> , <i>G. infula</i> , <i>G. esculenta</i> , <i>Helvella lacunosa</i> , <i>H. elastica</i> , <i>Paxina spp.</i> , <i>Sarcosphaera coronaria</i>
Gastrointestinal irritant	<i>Boletus miniato-olivaceus</i> , <i>B. satanas</i> , <i>B. astwoodiae</i> , <i>Chlorophyllum molybdites</i> , <i>Lactarius torminosus</i> , <i>L. glaucescens</i> , <i>Tricholoma pardinum</i> , <i>T. venenatum</i>
Halüsinasyon etkili indoller	<i>Conocybecyanopus</i> , <i>Gymnopilus aeruginosus</i> , <i>G. validipes</i> , <i>Panaeolina foenisecii</i> , <i>Panaeolus subbalteatus</i> , <i>Psilocybe baeocystis</i> , <i>P. caerulescens</i> , <i>P. cubensis</i> , <i>P. cyanescens</i> , <i>P. mexicana</i> , <i>P. pelliculosa</i> , <i>P. semilanceata</i> , <i>P. silvatica</i> , <i>Stropharia spp.</i>
Orellanin	<i>Amanita smithiana</i> , <i>C. splendens</i> , <i>Cortinarius orellanus</i> , <i>C. rainierensis</i> , <i>C. limonius</i> , <i>C. rubellus</i>
Disülfiram benzerleri	<i>Ampulloclitocybe clavipes</i> , <i>Coprinopsis atramentaria</i>
Muskarin	<i>Boletus spp.</i> , <i>Clitocybe phyllophila</i> , <i>C. rivulosa</i> , <i>Omphalotus illudens</i> , <i>Inocybe rimosa</i> , <i>I. erubescens</i> , <i>I. whitei</i> , <i>Inocybe geophylla</i> var. <i>lilacina</i> , <i>I. geophylla</i>
İzoksazoller	<i>Amanita muscaria</i> , <i>A. pantherina</i> , <i>Amanita cokeri</i> , <i>A. solitaria</i> , <i>A. strobiliformis</i> , <i>A. cothurnata</i> , <i>A. gemmata</i> , <i>Panaeolus papilionaceus</i>

Makrofungus toksinleri toksisite gösterme zamanlarının erken ve geç olmasına göre 2 farklı gruba ayrılırlar (Dökmeci, 1994; Aji, 2001).

2.1.1. Erken toksisite gösteren makrofungus toksinleri

Erken toksisite gösteren makrofungus toksinleri, geç toksisite gösterenlere oranla daha az toksik olup, ölüm oranı düşüktür. Mantar yendikten sonra yaklaşık 2-3 saat içerisinde şiddetli gastrointestinal iritasyona (bulantı, kusma, diyare, karın ağrısı) neden olurlar. Mide yıkama ve semptomatik tedavilerin bu tip zehirlenmeler için

yeterli olduğu düşünülmektedir. Genellikle 1-2 gün içerisinde iyileşme görülür. *Amanita muscaria*, *A. pantherina*, bazı *Clitocybe*, *Inocybe*, *Psilocybe*, *Panaeolus*, *Agaricus* türleri bu tipte toksin içerirler.

2.1.2. Geç toksisite gösteren makrofungus toksinleri

Geç toksisite gösteren makrofungus toksinleri, yüksek toksisiteye sahiptirler ve yenildikten 6-72 saat sonra akut zehirlenme belirtileri gözlenir. Enzimatik metabolizmayı etkilerler ve sitolitik bir etkiyle ağır organik bozukluklara yol açarak genellikle ölümlerle sonlanırlar. Tedavileri güçtür. Aji (2001), bu zehirlenmeler içerisinde en tehlikeli olanının Phalloides sendromu olduğunu ve alınan toksin miktarının ne kadar az ise toksisitenin o kadar geç görüleceğini söylemiştir. Bu grupta *Amanita phalloides* başta olmak üzere *A. virosa*, *A. verna*, *Gyromitra esculenta*, *Coprinopsis atramentaria* ve *Cortinarius orellanus* gibi türler bulunmaktadır. Şekil 2.1’de *A. phalloides*, *A. virosa* ve *A. verna*’nın karpofor yapıları sunulmuştur.



Şekil 2.1. *Amanita phalloides* (Anonim, 2017c), *Amanita virosa* (Anonim, 2017d) ve *Amanita verna* (Anonim, 2017e) karpofor yapıları

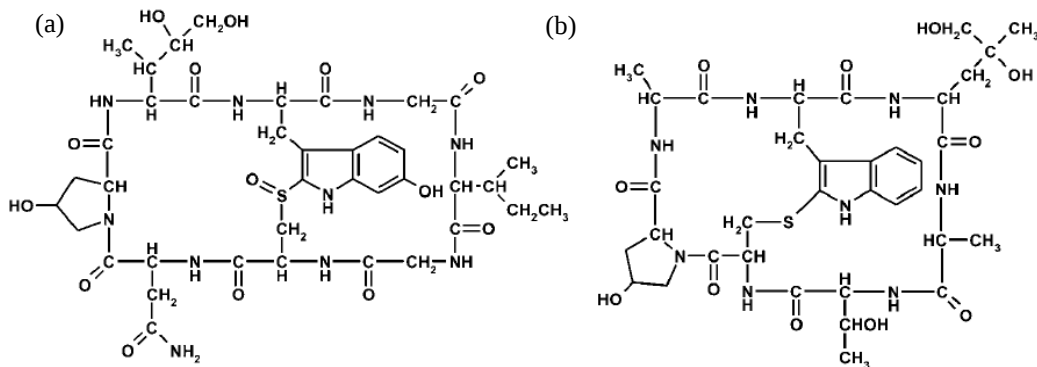
Amanita, *Galerina* ve *Lepiota* türleri siklopeptid toksin içeren grup üyeleri olup, mantar zehirlenmesi kökenli ölümlerin büyük bir kısmından sorumludurlar. *Amanita phalloides* birinci dereceden sorumlu tür olarak gösterilirken bu tür yanında *Amanita virosa* ve *Amanita verna* türleri ön plana çıkmaktadır. Bilinen en toksik ve öldürücü mantar türü olan *Amanita phalloides* yapısında 3 farklı toksin grubu bulundurmaktadır.

1. Amatoksinler (İki halkalı oktapeptidler)
2. Fallotoksinler (İki halkalı heptapeptidler)
3. Virotoksinler (Tek halkalı heptapeptidler)

Amanitin türevleri ölümcül etkiye neden olarak bilinen en etkili toksinlerdir.

Halk arasında “köy göçüren mantarı” olarak da bilinen *Amanita phalloides* zehirlenmelerinde ölüm oranları çocuklarda %50, yetişkinlerde ise %20-30 olarak bildirilirken, karaciğer transplantasyonu yapılamayan vakalarda ise %83’tür (Jander vd., 2000). Amatoksinlerin toksisitesinin, fallotoksin ve virotoksinlerinkine oranla 10-20 kez daha fazla olduğu söylenmiştir (Bidnychenko, 2001; Escudié vd., 2007). Ergüven vd. (2004), bu toksinlerin karaciğer böbrek ve/veya merkezi sinir sistemi kökenli ölümlerin % 90’ından sorumlu olduğunu söylemiştir.

Amatoksinler özellikle RNA polimeraz II’ye bağlanarak protein sentezini inhibe ederler. Memeliler dışındaki canlıların RNA polimerazları amatoksinlere karşı daha az duyarlıdır. Fallotoksinler ise amatoksinlere oranla daha az toksiktirler ve toksisitelerini özellikle karaciğer hücrelerinde F-aktin molekülüne sıkı bir biçimde bağlanma yolu ile gösterirler (Bidnychenko, 2001). α -amanitin ve falloidin kimyasal yapısı Şekil 2.2’de sunulmuştur.



Şekil 2.2. α -amanitin (a) ve falloidin (b) kimyasal yapısı (Webster ve Weber, 2007)

Çeşitli kaynaklarda sunulan veriler incelendiğinde amatoksinler için belirtilen LD50 değerinin ortalama olarak 0,1-0,8 mg/kg, fallotoksinler için 2-3 mg/kg olduğu görülmektedir (Faulstich, 1980). Belirtilen değerler dikkate alındığında 50 gram ağırlığında tek bir mantarın içerdiği amanitin miktarının zehirlenmek için yeterli olduğu anlaşılmaktadır (Bresinsky ve Besl, 1985; Gill ve Sterling, 2001). Siklopeptid içeren türlerdeki toksin miktarları ve karpofor üzerindeki farklı bölgelerdeki dağılımları örneğin toplandığı zaman ve yere göre değişkenlik göstermektedir (Vetter, 1998).

Dönmez vd. (2001), α ve β -amanitinin pişirme ve dondurma gibi fiziksel işlemlerden etkilenmediğini aynı zamanda tatsız ve kokusuz olduğunu söylemişlerdir. Farklı araştırmacılar tarafından 7 aydan daha fazla süre dondurucuda saklanmış bir *A. phalloides* mantarının neden olduğu zehirlenme ve ölüm gerçekleştiği rapor edilmiştir (Himmelman vd., 2001). Çizelge 2.2’de *A. phalloides* zehirlenmelerinin klinik evreleri özetlenmiştir.

Çizelge 2.2. *Amanita phalloides* zehirlenmelerinin klinik evrelerine ait bulgular (Arıcı, 2012)

Evre	Klinik Bulgu
İnkübasyon	8-12 saat süren bir evredir (En kısa 6 saat en uzun ise 40 saat sürdüğü kaydedilmiştir). Bu evrede hastada herhangi bir bulgu yoktur.
Gastrointestinal	12-24 saat süren bir evredir. Şiddetli ishal, kolik tarzı karın ağrısı ve kusma görülmesi nedeniyle mantar zehirlenmesinden şüphelenilmez ise viral gastroenterit ile karıştırılabilir.
Sitotoksik	24-48 saat süren bir evre olup, karaciğer hasarı biyokimyasal ve klinik belirtileri belirginleşir.
Komatöz	Bu evrede skut tübüler nekroz ve böbrek yetmezliği, hepatik koma, nöbet, solunum yetmezliği, hemoraji görülerek 4-7 gün içerisinde ölüm gerçekleşir.

Mantar zehirlenmelerinin büyük çoğunluğundan sorumlu olan *A. phalloides* ve siklopeptid zehirlenme vakalarında erken teşhis büyük önem taşımaktadır. Erken evrelerde karın ağrısı ve ishal gibi gastrointestinal şikayetler ile hastaneye başvuran kişilerde bu semptomlar başka bir hastalık ile karıştırılıp, hasta evine gönderilebilir. Fakat karaciğer hasarına bağlı semptomlar ortaya çıkmaya başladığında tedavi süreci zora girecek veya etkin bir tedavi uygulanamayıp hastanın kaybı gerçekleşecektir.

Klinik bulguların bu denli ciddi olduğu bir zehirlenme türü için spesifik bir antidot bulunmamaktadır. Amatoksin ve fallotoksinler için vücutta herhangi bir antikor üretilmemesi vücudun savunmasız kalmasına neden olmaktadır. Mantar zehirlenmesi tiplerine göre çeşitli tedaviler uygulanırken, tedavinin yetersiz kaldığı durumlarda ise karaciğer transplantasyonu son seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır. Ahıskalı vd. (2012) tarafından bildirilen tedavi protokolü Şekil 2.3'te sunulmuştur.



Şekil 2.3. Mantar zehirlenmesi tedavisinin akış şeması (Ahıskalı vd., 2012)

Iliev ve arkadaşları (1999), bir mantar zehirlenmesi durumunda hastanın bir sağlık merkezine başvurması ve tıbbi müdahale alması için geçen sürenin yaklaşık 12 saat olduğunu bildirmektedir. Ülkemizde ise zehirlenme ile zehir danışma merkezine ulaşma arasında ortalama 13,5 saat geçtiği ifade edilmektedir (Hocaoğlu vd., 2010). Çizelge 2.2’den izlenebileceği gibi bu süre hastaya müdahale için çok geç kalınmış bir evre değildir. Ancak hastanın yaşamının kurtarılması için hasta vücudundaki amanitinin erken aşamada belirlenmesi yaşamsal önem taşımaktadır. Aksi halde eldeki tek seçenek olarak karaciğer transplantasyonu gibi erişilmesi ve uygulanması zor tedavi süreçleri kalmaktadır.

2.1.3. Ülkemizde ve dünyada durum

Mantar zehirlenmesi ülkemizde hemen her bölgede gözlenen önemli ve yaygın bir sağlık sorunudur. Makrofunguslar ekolojik istekleri doğrultusunda çayır, orman gibi alanlarda mevsime bağlı olarak gelişebilmektedirler. İlkbahar ve sonbahar mevsimlerinde havadaki yoğun nem oranı, uygun sıcaklık koşulları ve toprağın bitki kalıntılarıyla zenginleşmesi nedeniyle doğada şapkaklı mantarlarla karşılaşma sıklığı artmaktadır. Bu nedenle zehirli mantar ve mantar zehirlenme vakaları ile sıklıkla sonbahar aylarında karşılaşmaktadır. İstanbul Yuşa tepesi civarında bir saatte 50 adet, Belgrat Ormanında ise bir saatte 115 adet *Amanita phalloides* mantarı toplanması (İşıloğlu vd., 1995), olayın boyutlarını ifade etmeye yetecek bir örnektir. Üstelik mantarların kurutularak, konserve veya turşu halinde saklanması ve tüketimi nedeni ile sonbahar dışında da mantar zehirlenme vakaları yaşanabilmektedir.

Mantar zehirlenmelerini de içeren zehirlenme vakalarını engellemek, müdahale etmek ve izlemek amacı ile birçok ülkede hizmet veren zehir danışma merkezleri bulunmaktadır. Ülkemizde bu amaçla 1986 yılında kurulan ve 24 saat hizmet veren bir merkez, “Ulusal Zehir Danışma Merkezi–UZEM” adı altında çalışmaktadır. UZEM 2008 yılı faaliyet raporunda, 1988 yılında zehirlenme başvurusu sayısının 1.100 iken, 2008 yılında bu sayının 77.988’e ulaştığı söylenmektedir. 2008 yılında gerçekleşen zehirlenmelerde üçüncü sırada besin zehirlenmeleri yer almakta ve bunun % 43,54’ünü mantar zehirlenmeleri oluşturmaktadır. Zehirlenen kişilerin yaş dağılımlarına

bakıldığında küçük çocuklardan yetişkinlere kadar geniş bir yelpazede olduğu görülmektedir (Özcan ve İkincioğulları, 2009).

Mantar zehirlenmelerinin risk analizi için, mantarlarla zehirlenmenin tüm zehirlenmelerdeki oranı ve mantarlar ile zehirlenmelerdeki ölüm oranı olarak iki parametre incelenebilir. Ülkemizde acil servislerine başvuran mantar zehirlenmeleri vakalarına ilişkin oldukça kapsamlı değerlendirmeler yapılmıştır. Buna göre ülkemizde tüm zehirlenmeler arasında mantarlarla zehirlenmelerin oranının % 1,50–10,9 kadar olduğu belirtilmektedir (Kalkan vd., 1998; Alagözlü vd., 2002; Akköse vd., 2005; Ayoğlu vd., 2009; Satar vd., 2009; Mutlu vd., 2010; Özayar vd., 2011).

Almanya'dan sunulan bir derlemede (Jander vd., 2000) *Amanita phalloides* nedeni ile gerçekleşen zehirlenmelerde 15 farklı çalışmadaki ölüm oranı % 4,8-34,5 aralığında değişmektedir. Bu oran kuzey Amerika için % 0,02-11 (Nordt vd., 2000; Beug vd., 2006), İran için % 12 (Pajoumand vd., 2005) ve Romanya için % 26,1 (Hocaoğlu vd., 2010) olarak sunulmuştur. Ülkemizden bildirilen araştırmalarda ise mantarlarla zehirlenmelerde ölüm oranının % 0,94–36,8 olduğu belirtilmektedir (Ünlüoğlu ve Tayfur, 2003; Ünlüoğlu vd., 2004; Çetin, 2007; Çevik vd., 2007; Ergüven vd., 2007; Ayoğlu vd., 2009; Eren vd., 2010; Yardan vd., 2010). Ancak, Türkiye'den bildirilen olgular genellikle üniversite hastanelerinden ve sınırlı sayıdaki mantar zehirlenme olgularını içermektedir. Bu nedenle gerek tüm zehirlenmelerdeki mantar zehirlenmesi oranının gerekse mantar zehirlenmelerindeki ölüm oranının belirtilenden daha yüksek olduğu öngörülmektedir.

Oldukça yoğun bir tehdit olmasına karşın ülkemizde acil servislere başvuran hastaların serum, idrar ve/veya dışkılarında amatoksinlerin belirlenmesine yönelik yöntemler bulunmamaktadır (Ahıskalı vd., 2012). Amatoksinler sadece “Ulusal Zehir Danışma Merkezi–UZEM” bünyesinde ve daha çok deneysel amaçlarla tayin edilmektedir (Ahıskalı vd., 2012). Bu nedenle mantar zehirlenmesi teşhisinin konması için sadece,

- a. Mantar yenmesi,
- b. Mantar yendikten sonraki ilk 24 saat içinde bulantı ve kusma,

c. Bu belirtilere neden olacak başka nedenlerin olmaması,

d. Akut karaciğer toksisitesine neden olan bir başka neden olmaması,

gibi klinik belirtilere güvenilmektedir. Bu durum teşhis ve tedavide gecikmelere, yanlış olumlu teşhislere (hastanın *A. phalloides* yemiş olduğu teşhisi) ve daha tehlikeli bir durum olarak yanlış olumsuz teşhislere (hastanın *A. phalloides* yememiş olduğu teşhisi) neden olmaktadır. Mantar zehirlenmesi vakalarında riski arttıran diğer bir faktör, acil servise başvuran hastaların yedikleri mantarın bilimsel ismini bilmemesidir. Bu durum zehirlenmeye neden olan mantarın teşhis edilememesine neden olmaktadır. Sonuç olarak mantarın ölümcül bir etkiye sahip olup olmadığı bilinmemekte ve bazen riskli hastalar iyileşme sanısıyla evlerine gönderilmektedir.

A. phalloides ile gerçekleşen zehirlenme vakalarında hastanın hayatta kalıp kalmayacağını tüketilen mantarın miktarı, sağlık kurumuna başvuru hızı, teşhis hızı, hastanın yaşı, cinsiyeti, genel direnci gibi faktörler belirlemektedir. Sonuç olarak siklopeptid yapıda toksin içeren mantar tüketimi sonucu oluşan zehirlenme vakalarında erken tanı ve tedavinin hayat kurtarıcı olduğu bilinmektedir. Hastanın yaşamının kurtarılması için en öncelikli ihtiyaç, hasta vücudundaki toksinlerin erken aşamada belirlenmesidir. İnsan yaşamını tehdit eden bu makrofungus toksinlerinin kolay, hızlı, ucuz, ulaşılabilir yöntemlerle ve doğru ve duyarlı biçimde tayin edilmesinin yaşamsal önemde olduğu anlaşılmaktadır.

2.2. Toksin Tayin Yöntemleri

α -amanitin ve falloidin bileşiklerinin zehirlenmeden sonra kan ve idrarda bulunma süresi konusunda araştırmacılar tam bir uzlaşa sağlayamamış görünmektedir. Vetter (1998), amatoksinlerin 12 saat içinde plazmadan emildiğini ifade etse de, Ahıskalı vd. (2012), serumda zehirlenmeden sonra 24-48 saatte belirlenebileceğini bildirmektedir. Jander vd. (2000) ise toksinin zehirlenmeden sonra 72. saate kadar kanda belirlenebileceğini vurgulamaktadır. Ahıskalı vd. (2012), bu toksinlerin idrarda daha yüksek derişimlerde bulunduğunu, Defendenti vd. (1998) bu miktarın 50-500 ng/ml aralığında olduğunu ve Vetter (1998) ise toksinin idrarda uzun süre (zehirlenmeden sonraki 4 gün boyunca) belirlenebileceğini vurgulamaktadır. Toksinin

en erken teşhisi mantarın yenmesinden 90 dakika sonra idrarda rapor edilmiştir (Defendenti vd., 1998) ki bu müdahale için önemli bir zaman kazandırmaya aday bir durumdur. Her koşulda vücuttaki toksinlerin belirlenmesi için biyolojik örnek olarak kan ve idrarın iyi birer kaynak olduğu görülmektedir.

Günümüzde α -amanitin ve fallotoksinlerin hasta vücudunda belirlenmesi için kullanılan ölçüm yöntemleri şu biçimde sıralanabilir:

2.2.1. Wieland/Meixner testi

Testin çalışma prensibi, indollerin aromatik aldehitlerle renkli bileşik oluşturma ilkesine dayanır. Derişik HCl çözeltisi ile kâğıdın yapısında bulunan lignin tepkimeye girerek aldehit oluşturur ve amatoksinler bu aldehitlerle renkli bileşik oluşumuna neden olur. Bu reaksiyonu psilosibin, bufotenin gibi başka indoller de verebilir (Mat, 2000).

Hastanın midesinden alınan materyal, kuru mantar örneğinden elde edilen metanol ekstraktı veya taze karpofor örneğinin suyu lignin yönünden zengin bir kâğıt (baskısız gazete kâğıdı vs.) üzerine damlatılır ve kurumaya bırakılır. Daha sonra aynı bölgeye derişik HCl çözeltisi uygulanır. Ortamda amanitin var ise 1-2 dakika (30 dakikaya kadar beklenebilir) içerisinde mavi-yeşil renk oluşumu gözlenebilir. Testin yanlış pozitif sonuç verme ihtimali göz önünde bulundurularak sadece baskısız gazete kâğıdı üzerine damlatılmış HCl çözeltisi negatif kontrol olarak kullanılmalıdır. Kullanım olarak pratik bir yöntem olmasına rağmen psilosibin varlığı, güneş ışığına maruz kalma, yüksek sıcaklığa maruz kalma gibi bazı durumlarda yanlış pozitif sonuçlar verebilir (Berger ve Guss, 2005). Beuhler vd. (2004) psilosin ve triptaminlerin varlığında da yalancı pozitif reaksiyon oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu nedenlerle Wieland/Meixner testinin güvenilir ve duyarlı bir test olmadığı anlaşılmaktadır.

2.2.2. Enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA)

Serum ve idrar gibi biyolojik sıvılarda amanitin varlığının araştırılması için yarışmalı immünolojik kitler ticari olarak bulunmaktadır. Bu kitler α ve γ -amanitine

spesifik poliklonal antibadi içermekte ve streptavidin-biotin kompleks oluşumuna dayalı analiz yapmaya yardımcı olmaktadır. Amanitin varlığında gerçekleşen tepkime sonucu oluşan renk spektrofotometrik olarak analiz edilmektedir.

0,31–20 ng/ml amanitin derişim tayininde kullanılabilen bu kitler, hassas ölçüm yapabilme avantajlarına karşın kısa raf ömürleri, pahalı oluşu ve tüm sağlık kuruluşlarında yaygın biçimde kullanılmaması/bulunmaması açısından dezavantajlıdır. Kit sıvıları 2-8 °C'de sadece 7 gün ve –20 °C'de 6 ay kadar saklanabilir. Örnek hazırlama süreleri hariç bazı kitler ile 1 saat içerisinde sonuç alınabilirken, bazıları yaklaşık 5 saatte sonuç vermektedir. α ve γ -amanitin için geliştirilen bazı ELISA yöntemlerinin zehirlenmeyi takip eden ilk 36 saat içinde idrar örneğinin alınması ve test edilmesi gerekmektedir (Parant vd., 2006). Bu da yöntem için sınırlayıcı bir durumdur. Ayrıca, falloidin için herhangi bir ticari ELISA kiti bulunmamaktadır.

2.2.3. Radyoimmun test (RIA)

Amanitin miktarının RIA yöntemi ile belirlenmesi tavşan serumunda standardize edilmiş olan ve uzun zamandır bilinen bir yöntemdir (Faulstich vd., 1975). Günümüze dek amanitinler için geliştirmiş olan RIA kitleri amanitinlerin ^3H ve ^{125}I -işaretli antibadiler arasındaki reaksiyonlara dayalı olarak kullanılmıştır (Andres vd., 1986). Bu yöntemde iki aydan az olan kısa raf ömrü (Zhou vd., 2011) önemli bir sınırlayıcıdır. İşaretlemede kullanılan izotopların kararlı olmaması raf ömrünü ve kullanım süresini kısıtlamaktadır. Bu durumda kitler sadece mantar toplama mevsimlerinde ve önemli sağlık kuruluşlarında ulaşılabilir olmaktadır. Mantar toplama mevsimi dışında ve tüm sağlık kuruluşlarında ulaşılabilir olmaması problemleri söz konusudur (Staack ve Maurer, 2000; Robinson-Fuentez vd., 2008). Radyoaktif madde kullanımı diğer önemli kısıtlayıcıdır (Robinson-Fuentes vd., 2008; Gomolka vd., 2011).

2.2.4. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

HPLC, bir karışımdaki bileşenlerin bir çözücünde çözülerek yüksek basınç altında kromatografi kolonundan geçmeye zorlanması ilkesi ile çalışan bir yöntemdir. Plazma ve idrar gibi biyolojik sıvılarda amanitin varlığının HPLC aracılığı ile belirlenmesi farklı araştırmacılar tarafından araştırılmıştır. Bu yöntem ile gerçekleştirilen analizlerde belirlenen amanitin miktarı 3-200 ng/ml olarak belirlenmiştir (Jehl vd., 1985, Defendenti vd., 1998; Tagliaro vd., 1991). Bu yöntemin ilk akla gelen sorunu, analizin yapıldığı cihazın ve cihazı kullanacak eğitimli uzman personelin hastane acil servislerinde hazır biçimde bulunmasının mümkün olmamasıdır. Cihaz fiyatı ve laboratuvar ortamında sabit bir şekilde kullanılması nedenleri ile sadece büyük merkez durumundaki kuruluşlarda bulunabilmektedir. Bu nedenle kırsal alanda ulaşılabilir olması mümkün değildir. Ayrıca zaman kaybedilmesine neden olan ilave bir ekstraksiyon aşaması da gerekmektedir. Ayrıca cihaz, kolon, hareketli faz ve dedektör gibi sarf malzemelerinin oldukça pahalı olması nedeni ile sağlık kuruluşlarında yaygınlaşamamaktadır. Cihazın kullanımını sınırlayıcı diğer faktörler arasında hastanın sağlık kuruluşuna ulaşma zamanında uzman personelin bulunmasının garanti edilememesi ve cihazın kullanımının yeterince hızlı olmaması sayılabilir.

2.2.5. Kapiler elektroforez (CE)

Toksinlerin idrar ve kan örneklerinde kapiler elektroforez ile belirlenmesi amacı ile öncelikle toksinlerin vücut sıvılarından izolasyonu gerekmektedir. Bu yöntemde, idrar örneklerinin pH değerleri sülfürik asit ile 2,0'ye ayarlandıktan sonra n-bütanol ile muamele edilmekte ve faz ayırımından sonra bütanol uçurularak toksin içeren çökelti fosfat tamponunda (pH: 6,8) çözülerek CE ile belirlenmektedir. Kan örneklerinde toksinlerin belirlenmesi için de örnekler öncelikle sülfürik asit ilavesi ile pH 2,0 seviyesinde asetonitril ile muamele edilmektedir. Santrifüjlenen örneklerden alınan süpernatant vakum altında uçurulmakta ve çökelti fosfat tamponunda (pH: 6,8) çözülerek içerdiği toksinler CE ile belirlenmektedir.

Kapiler elektroforezde toksin değerleri, 10-200 ng toksin aralığında hazırlanan kalibrasyon grafiği aracılığı ile elde edilmektedir. Bu yolla α -amanitin, β -amanitin, falloidin ve falloin toksin tayinleri için yöntem geliştirilmiştir. Bu yolla fallotoksinler (falloidin, falloin) için duyarlılık seviyesi 15 ng iken, amanitinler (α -amanitin, β -amanitin) için 10 ng olarak belirlenmiştir (Bidnychenko, 2001). Diğer bir çalışmada idrar örneklerinde belirlenebilen toksin limiti 5 ng olarak bildirilmektedir (Robinson-Fuentes vd., 2008). HPLC için sıralanan tüm teknik sorunlar bu yöntem/cihaz için de geçerlidir. Ayrıca, çok önemli bir sorun olarak tekrarlanabilirlik problemi vardır (Zhou vd., 2011).

2.2.6. Sıvı kromatografisi - ktle spektrometresi (LC-MS)

LC-MS, yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile ktle spektrometresi birimlerinden oluşan yapı ve miktar tayini yapmak için kullanılan bir cihazdır. Falloidin, α ve β -amanitin toksinlerinin miktar tayini diğer analitik yöntemlerin yanı sıra LC-MS ile de gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem ile idrarda α ve β -amanitin tayini gerçekleştirilen bir çalışmada cihazın 5 ng/ml seviyesinde toksin tayin limitine sahip olduğu belirlenmiştir (Maurer vd., 2000). Diğer bir araştırmada ise idrar, plazma ve serumdaki toksin tayin limitlerinin sırası ile 0,5, 1 ve 1.5 ng/ml olduğu bildirilmiştir (Nomura vd., 2012). HPLC için sıralanan tüm teknik sorunlar bu yöntem/cihaz için de geçerlidir. Ayrıca, hassas lensler, ktle ayırıcılar, elektronik yükselticiler, ktle spektrometreleri gibi ek gereksinimler yöntem/cihazın kullanımı için sınırlayıcı faktörlerdir.

2.2.7. Matriks destekli lazer desorpsiyon / iyonizasyon uçuş zamanlı ktle spektrometresi (MALDI-TOF MS)

Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanlı ktle spektrometresi (MALDI-TOF MS) peptidler gibi büyük biyomoleküllerin iyonizasyonu ve karakterizasyonunda önemli bir yöntem ve cihazdır. Bu nedenle okta ve heptapeptid olan amanitin ve fallotoksinlerin tayininde de kullanılmaktadır. İdrardaki toksin miktarını belirlemeye yönelik bir çalışmada 5 ng/ml miktarda amanitin ve fallotoksinler

belirlenebilmiştir (Gonmori vd., 2012). HPLC ve LC-MS için sıralanan tüm teknik sorunlar bu yöntem/cihaz için de geçerlidir.

Günümüze dek toksin tayin yöntemlerin kullanıldığı çalışmalardan alınan sonuçlardan bazıları Çizelge 2.3'te özetlenmiştir.

Diğer taraftan, konu ile ilgili literatür incelendiğinde, günümüze kadar amanitin ve falloidin tayini için elektrokimyasal yöntemlerden yararlanılmadığı dikkat çekmektedir. Çalışmanın konusu olan α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal yöntemlerle ölçümü konusunda herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Ayrıca bu toksinlerin tayinleri için elektrokimyasal bir sensör de geliştirilmemiştir. Var olan nadir çalışmaların ise sadece sıvı kromatografik sistemler ile amanitin tayini için elektrokimyasal dedektör olarak kullanımı esasına dayalı olduğu görülmektedir (Defendenti vd., 1998, Tagliaro vd., 1991).

Çizelge 2.3. Siklopeptid yapıdaki toksinler için kullanılan bazı ölçüm yöntemleri

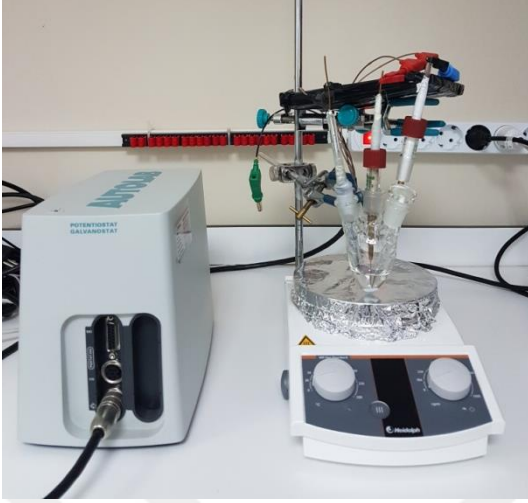
Analit	Örnek	Belirlenme Limiti (ng/ml)	Doğrusal Ölçüm Aralığı (ng/ml)	Yöntem	Kaynak
α -amanitin	İdrar	0,1	-	RIA	Andres vd., 1986
α -amanitin	Kan	0,1	-	RIA	Andres vd., 1986
α -amanitin	İdrar	0,22	-	ELISA	Anonymous, 2000
β -amanitin	İdrar, serum	0,08	-	ELISA	Abuknesha ve Maragkou, 2004
α -amanitin	Kan	10-12	10-130	CE	Bidnychenko, 2001
β -amanitin	Kan	10-12	10-130	CE	Bidnychenko, 2001
Falloidin	Kan	15	10-130	CE	Bidnychenko, 2001
Falloin	Kan	15	10-130	CE	Bidnychenko, 2001
α -amanitin	İdrar	4-4,5	10-130	CE	Bidnychenko, 2001
β -amanitin	İdrar	4-4,5	10-130	CE	Bidnychenko, 2001
α ve β -amanitin	İdrar	5	5 – 100	CE	Robinson-Fuentes vd., 2008
α ve β -amanitin	İdrar, kan, mide içeriği	10	-	HPLC	Jehl vd., 1985
α -amanitin	İdrar	10 – 200	-	HPLC	Defendenti vd., 1998
α -amanitin	Plazma	3 – 200	-	HPLC	Tagliaro vd., 1991
α ve β -amanitin	İdrar	5	5 - 75	LC-MS	Maurer vd., 2000
α ve β -amanitin, phalloidin	İdrar	0,5	2-420	LC-MS	Nomura vd., 2012
α ve β -amanitin	Serum	1,5	2-420	LC-MS	Nomura vd., 2012
α ve β -amanitin	Plazma	1	2-420	LC-MS	Nomura vd., 2012
α ve β -amanitin, falloidin	İdrar	5	10-500	MALDI-TOF MS	Gonmori vd., 2012

2.3. Elektrokimyasal Sensörler

Belirli bir analite karşı seçici davranan aygıta “sensör” adı verilir. Sağlık, endüstriyel süreçler, çevresel izleme gibi alanlarda kullanılırlar. Fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak 3 grupta sınıflandırılırlar. Sensörlerde alınan sinyali anlamlı hale getiren dönüştürücüler optik, elektrokimyasal, piezo-elektrik ve termal olmak üzere 4 grupta toplanabilir (Eggins, 2002).

Elektrokimyasal sensörlerde, elektrot/çözelti ara yüzeyinde gerçekleşen tepkime sonucu oluşan sinyal belirlenir. Elektrokimyasal çalışmalar dinamik (voltametrik yöntemler) veya statik (potansiyometrik yöntemler) olmak üzere 2 şekilde gerçekleştirilebilir. Voltametrik yöntemler elektron transferini izleyen bir redoks sürecini içerirken, potansiyometrik yöntemlerde ise yüklü türlerin derişimlerinin elektrokimyasal potansiyel üzerinde yarattığı değişiklik izlenir. Elektrokimyasal yöntemlerle bir maddenin varlığının araştırılması (doğrudan analizi) için analitin elektroaktif özellikte olması gerekmektedir (Gil ve Melo, 2010). Dolaylı analizlerde ise tepkimeye girenlerden veya ürünlerden en az bir tanesinin elektroaktif özellikte olması yeterlidir. Elektrokimyasal yöntemler ile nitel veya nicel analizler yapmak mümkündür. Elektrokimyasal sensörler medikal alanda şeker, üre, laktat, kolesterol, sodyum, potasyum, oksijen, pH, pestisit, süperoksit radikalleri gibi bir çok analitin ölçümünde kullanım alanı bulmaktadır (Eggins vd., 2002; Zhang vd., 2008).

Elektrokimyasal analizlerde sıklıkla kullanılan voltametrik yöntemlerde referans, karşıt ve çalışma elektrotlarını içeren 3 elektrotlu sistem kullanılır. Voltametrik yöntemlerde çalışma ve referans elektrotlar arasına gerilim uygulanarak, karşıt ve çalışma elektrotları arasından akım ölçümü yapılır. Alınan akım cevabı, ölçümü yapılan analit derişimi ile doğru orantılıdır. Dönüşümlü voltametri (DV) zamanla doğrusal olarak artan ve azalan bir gerilim taraması yapılır. Bu yöntem analitin yükseltgenme ve indirgenme davranışının aynı anda izlenmesine olanak sağlayarak elektrot yüzeyinde gerçekleşen tepkimenin tersinir olup olmadığı, elektrokimyasal tepkimeyi takip eden bir kimyasal tepkimenin olup olmadığı gibi önemli konular hakkında bilgiler verir. Şekil 2.4’te çalışmada kullanılan elektrokimyasal düzeneğe ait bir görsel sunulmuştur.



Şekil 2.4. Elektrokimyasal çalışma düzeneği

Elektrokimyasal yöntemler kullanılarak yapılan tayin yöntemlerinde koşulların uygun olması ve optimize edilmesi halinde güvenilir sonuçlara daha kısa sürede ve düşük maliyetle ulaşmak mümkün olabilmektedir. Bu tezde, bazı biyolojik sıvılarda (kan serumu ve idrar) α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal tayinlerinin yapılması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışma süresince kullanılan cihazlara ait bilgiler Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlara ait marka bilgileri

Cihaz adı	Marka / Model bilgisi
Potantiyostat / Galvanostat	AUTOLAB PGSTAT 204
HPLC / Kolon	Shimadzu LC20A VP / Inertsil ODS3-C18 kolon (250 mm, 4.6 mm i.d) (GL Sciences Inc.)
Mikroplate spektrofotometre	BioTek PowerWave XS
Santrifüj	Hermle
Ultrasonik banyo	ISOLAB laborgerate GmbH
Etüv	New Brunswick Innova 44
pH metre	Eutech Instruments Ion 510
Laminar air flow	Thermo HERA Safe KS12
Otoklav	ALP
UV görüntüleme cihazı	CAMAG 022.9120
Ayarlanabilir otomatik pipet	Eppendorf research plus
Hassas terazi	Mettler Toledo MX 5
Manyetik karıştırıcı	Heidolph
Ultra saf su cihazı	Sartorius Arium Comfort I-1-UV-T

Çalışma süresince kullanılan kimyasal malzemeler ve kullanım amacına ait bilgiler Çizelge 3.2’de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasal malzemelerin marka bilgileri

Kimyasal malzeme adı / Marka bilgisi	Kimyasalın kullanım amacı
α -amanitin (Sigma A2263)	Makrofungus toksin standardı
β -amanitin (Sigma A1304)	
γ -amanitin (Enzo Life Sciences ALX-350-272)	
Falloidin(Sigma P2141)	
Fallasidin (Sigma P8157)	
KOH (Merck 1.05033), KH_2PO_4 (Merck 1.04873)	Tampon çözelti
Dopamin (Sigma H8502), Ürik asit (Sigma U0881), Parasetamol (Fluka 00370), Folik asit (Sigma F8890)	Girişim etkisinin araştırılması
HCl (Sigma 07102), H_3PO_4 (Sigma 04107), HClO_4 (Fluka 77230), HNO_3 (Merck 1.00443), H_2SO_4 (Sigma 07208), HSO_3F (Fluka 47500), NaOH (Sigma 06203), NH_4OH (Sigma 5003)	KUE ön işlem uygulanması Toksineksaksiyonu
Pirol-2-karboksilik asit (Alfa Aesar L13756), Anilin-2-sülfonik asit (Sigma A86805), o-fenilendiamin (Sigma), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck 1.08883), Na_2CO_3 (Sigma 13418), LiClO_4 (Fluka 62579), Pirol (Fluka), Anilin (Fluka)	Polimer sentezi
N-asetil-DL-Triptofan (Sigma A6251), Propilamin (Sigma 82100)	Template sentezi
Eastbiopharm Human Amanitin ELISA Kit	Amanitinin ELISA ile tayini
Metanol (Sigma 34885), Diklorometan (Merck 1.06049), Asetonitril (Sigma 34851), Kloroform (Sigma 24216), Etanol (Sigma 32221), 2-Propanol (Sigma 24137), Amonyum asetat (Merck 1.01116)	Template sentezi Toksineksaksiyonu HPLC mobil faz
Silika Jel 60 F ₂₅₄ Tabaka (Merck 1.05554.0001)	İnce tabaka kromatografisi

3.2. Yöntem

Bu çalışmada α -amanitin ve falloidinin toksinlerinin biyolojik sıvılardan tayini için elektrokimyasal yöntem geliştirilmesine yönelik deneyler yapılmıştır. Çalışma 4 ana iş paketinden oluşmaktadır;

1. α -amanitin ve falloidin toksinlerinin farklı elektrot sistemleri ile elektrokimyasal davranışının incelenmesi,
2. α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal tayinlerinde girişim etkisinin belirlenmesi,
3. Biyolojik sıvılarda α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal tayini,
4. Elektrokimyasal yöntemin HPLC ve ELISA yöntemleri ile karşılaştırılması.

3.2.1. α -amanitin ve falloidin toksinlerinin farklı elektrot sistemleri ile elektrokimyasal davranışının incelenmesi

Bir analitin elektrokimyasal yöntemler kullanılarak doğrudan tayin edilebilmesi için o maddenin elektroaktif olması veya elektroaktif bir ürün oluşacak dolaylı bir inceleme protokolü oluşturulması gerekmektedir. Bir maddenin elektrokimyasal davranışlarını belirlemek amacıyla dönüşümlü voltametri (DV) ve doğrusal taramalı voltametri (LSV) yöntemleri kullanılabilir. Puls uygulanan voltametrik çalışmalarda düşük derişimlerde tayin yapabilmek mümkün olmaktadır. Bu nedenle α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal davranışları dönüşümlü voltametri yöntemiyle incelendikten sonra uygun çalışma elektrodu ile diferansiyel puls voltametrisi (DPV) kullanılarak tayin çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Elektrokimyasal yöntemler ile bir analitin tayinin gerçekleştirilmesinde önemli olan bir unsur da çalışma elektrodudur. α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal tayini amacıyla karbon temelli çalışma elektrotları içeren üçlü elektrot sistemleri arasından en uygun olanı seçilmeye çalışılmıştır. Bu aşamada 3 farklı α -amanitin ve falloidin derişimi (10^{-5} , 10^{-6} ve 10^{-7} M) modifiye edilmemiş camı karbon elektrot (CKE) ve kalem ucu elektrodun (KUE) çalışma elektrodu olarak kullanıldığı

sistemlerde tayin edilmiştir. Fosfat tamponu ortamında DV yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen deneylerde toksin içermeyen fosfat tamponunda yapılan ölçümler negatif kontrol olarak kullanılmıştır. α -amanitin ve falloidin toksinlerine ait indirgenme ve yükseltgenme davranışlarının incelendiği bu iş paketinde camı karbon ve kalem ucunun ayrı ayrı çalışma elektrodu olarak kullanıldığı sistemlerin yanında iki farklı ekran baskılı elektrot sistemi de denenmiştir. Bu aşamada kullanılan diğer deney koşulları Çizelge 3.3'te sunulmuştur.

Çizelge 3.3. α -amanitin ve falloidin elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi aşamasında kullanılan deney koşulları

Çalışma elektrodu	Referans elektrot	Karşıt elektrot	Tayin Çözeltilisi	Çalışma aralığı	Tarama hızı
CKE	Ag/AgCl	Pt	0,05 M Fosfat tamponu (pH 3,0)	0 – 1,0 V	50 mV/s
KUE					
Karbon	Ag				
Karbon	Karbon				

Bu aşamada uygun çalışma elektrodu belirlendikten sonra α -amanitin ve falloidin tayini için uygun pH değeri belirlenmiştir. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponu ortamında diferansiyel puls voltametri yöntemi kullanılarak, 20 mV/s tarama hızıyla en yüksek akım cevabı elde edilen pH değeri çalışmanın diğer aşamalarında kullanılmıştır.

3.2.2. α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal tayinlerinde girişim etkisinin belirlenmesi

Bu iş paketi kapsamında biyolojik sıvılarda elektrokimyasal yöntemler ile toksin tayini gerçekleştirirken girişim yapması muhtemel elektroaktif bileşiklerin farklı pH değerlerindeki 0,05 M fosfat tamponunda davranışları KUE çalışma elektrodu kullanılarak incelenmiştir. DPV yöntemi kullanılarak yapılan araştırmalar 20 mV/s tarama hızı ile gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada girişim yapması muhtemel bileşiklerin biyolojik sıvılarda bulunduğu referans değerleri dikkate alınmıştır. Yöntemin

belirleme limiti altındaki derişimlerde biyolojik sıvılarda yer alan dopamin veya olası bir ağrı kesici alınması durumunda biyolojik sıvılarda bulunabilecek parasetamol ise 10^{-4} M derişimde ortama ilave edilerek uygun pH değeri araştırılmıştır.

Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında gerçekleştirilen elektrokimyasal tayin işlemleri standart beş boyunlu hücre kullanılarak oda koşullarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma elektrodu olarak piyasadan elde edilen Tombow marka 0,5 HB kalem ucu, referans elektrot olarak Ag/AgCl (1M KCl) ve karşıt elektrot olarak platin levha elektrot kullanılmıştır. Ölçümlerin her bir elektrot ile sadece bir kez yapılması nedeniyle kalem ucu elektrot diğer elektrot tiplerine oranla kolaylık sağlamış ve maliyet açısından daha hesaplı olmuştur. Araştırma boyunca her çalışma için 3 farklı ölçüm alınarak sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma biçiminde sunulmuştur.

3.2.2.1. Serum ve idrar ortamındaki girişim yapma ihtimali olan bileşiklerin elektrokimyasal davranışları

Biyolojik sıvılarda girişim yapma ihtimali olan folik asit, ürik asit, dopamin ve olası bir ağrı kesici alınması durumunda parasetamolün 7 farklı pH değerindeki tampon çözeltilerde elektrokimyasal davranışları DPV yöntemi ile incelenmiştir. Bu bileşenlerin yükseltgenme potansiyellerine ait bilgilerden toksin tayini sırasında herhangi bir girişim etkisi olup olmadığı konusunda yararlanılmıştır.

3.2.2.2. Zehirli mantarlardaki farklı bazı toksinlerin elektrokimyasal davranışları

Başta *A. phalloides* olmak üzere zehirli ölümcül mantarlarda bulunan β -amanitin, γ -amanitin ve fallasidin gibi diğer bazı toksinlerin elektrokimyasal davranışları DPV yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bu amaçla pH değerinin yükseltgenme potansiyeli ve akım cevapları üzerine etkisi farklı pH değerlerindeki fosfat tamponu kullanılarak araştırılmıştır. Bu toksinlerin ayrı ayrı elektrokimyasal davranışları incelendikten sonra α -amanitin ve fallooidinin elektrokimyasal tayini üzerine etkileri karışımlar hazırlanarak araştırılmıştır. Toksin karışımları ile çalışırken her iki

toksinin akım cevabı farklılığı kendi optimum pH değerlerindeki fosfat tamponlarında araştırılmıştır.

3.2.3. Biyolojik sıvılarda α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal tayini

Bu çalışmada biyolojik sıvıların deneylerde kullanılabilmesi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç Dışı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı tarafından 29.8.2013 tarihinde, 80558721 / 269 sayılı karar ile onaylanmıştır. Serum ve idrar örnekleri gönüllü olarak tez sahibi tarafından sağlanmıştır.

Bu iş paketinde biyolojik sıvılarda toksinlerin davranışlarını incelemeye önce sağlıklı bir insandan alınan serum ve idrar örneklerinin elektrokimyasal davranışları hakkında incelemeler yapılmıştır. Serum ve idrar örneklerinde toksinlerin elektrokimyasal davranışlarını izleyebilmek için zaten var olan elektrokimyasal bileşenlerin akım cevabını azaltmak amacıyla örnekler seyreltilerek çalışılmıştır. Biyolojik örneklerin seyreltme işlemi, davranışı incelenecek olan toksinin optimum pH değerindeki fosfat tamponu ile yapılmıştır. Biyolojik sıvıların seyreltilmesinin asıl amacı toksinlerin gerçek örneklerdeki davranışı, gerçek örnek bileşenlerinin toksinin akım cevabına etkisi ve farklı toksinlerin gerçek örnek ortamında birbirlerinin cevapları üzerine etkisini gözlemleyebilmektir. Bazı amatoksin (α -amanitin, β -amanitin) ve fallotoksinlerin (falloidin, fallasidin) gerçek örnek ortamlarındaki elektrokimyasal davranışları incelenirken toksinler gerçek örneklerle sırası ile eklenerek her aşamada akım cevapları incelenmiştir. Toksinlerin gerçek örneklerdeki davranışı hakkında bilgi sahibi olmak, araştırmalar sırasında kritik öneme sahiptir. Bu aşamadan sonra gerçek örnek analizlerinin gözlemlenen girişim etkisini aşmak için farklı protokollerle tekrarlanması öngörülmüştür.

3.2.3.1. Toksinlerin serumdaki elektrokimyasal davranışı

Kan örnekleri doğrudan vakumlu tüplere (Greiner bio-one VACUETTE) alınarak 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş ve serum kısmı alınmıştır. Serum örnekleri

hemen kullanılmayacak ise steril tüplere küçük hacimlerde bölünerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Serum örnekleri, üzerinde girişim etkisi araştırılacak toksinlerin uygun pH değerindeki fosfat tamponu ile 10 kat seyreltilerek amatoksin (α -amanitin, β -amanitin) ve fallotoksinler (falloidin, fallasidin) sırayla ortama ilave edilip akım cevaplarındaki değişim izlenmiştir.

3.2.3.2. Toksinlerin idrardaki elektrokimyasal davranışı

İdrar örnekleri alındıktan hemen sonra kullanılmayacağı durumlarda steril mikrosantrifüj tüplerine küçük hacimlerde bölünerek -20 °C'de muhafaza edilmiştir. İdrar örnekleri uygun pH değerindeki fosfat tamponu kullanılarak 100 kat seyreltildikten sonra amatoksin (α -amanitin, β -amanitin) ve fallotoksinler (falloidin, fallasidin) sırayla ortama ilave edilip pik akım değerlerindeki değişim izlenmiştir.

3.2.3.3. Elektrot modifikasyonu ile elektrodun α -amanitine karşı seçiciliğinin artırılması

Bu aşamada risk oranı daha yüksek olması nedeniyle öncelikli olarak α -amanitin tayini için daha duyarlı bir çalışma elektrodu modifikasyonu yapılması amaçlanmıştır. Gerçek örnek analizlerinde çalışma elektrodunun α -amanitine karşı seçiciliğini arttırmak için kalem ucu elektroda çeşitli ön işlemler uygulanmıştır. Çeşitli asit ve baz çözeltileri ile kalem ucu elektroda ön işlem uygulanması yanında, moleküler baskılanmış polimer ile modifiye kalem ucu elektrodun α -amanitine karşı duyarlılığı araştırılmıştır.

Kalem ucu elektrot modifikasyonu sırasında Tombow 0,5 HB kalem ucu elektrotlar çözelti içerisine 1,5 cm daldırılmış, referans elektrot olarak Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak ise Pt kullanılmıştır.

Modifiye edilen elektrotların α -amanitin tayininde kullanımı hakkında bilgi edinmek için 10^{-5} M derişiminde α -amanitin içeren, pH değeri 7,4 olan 0,05 M derişimindeki fosfat tamponu içerisinde DPV yöntemi ile ölçümler gerçekleştirilmiştir.

A. Asit ve baz çözeltileri kullanılarak kalem ucu elektroda ön işlem uygulanması

Bu aşamada farklı derişimlerde sülfürik asit (H_2SO_4), fosforik asit (H_3PO_4), nitrik asit (HNO_3), asetik asit (CH_3COOH), florosülfonik asit (HSO_3F), sodyum hidroksit ($NaOH$) çözeltileri kullanılarak dönüşümlü voltametri (DV) ve kronoamperometri (KA) yöntemleri ile kalem ucu elektrotlara (KUE) ön işlem uygulanmıştır. Asit ve baz çözeltileri ultra saf su kullanılarak hazırlanmış olup sadece florosülfonik asit çözeltisi hazırlığı için asetonitril kullanılmıştır. Araştırmanın bu aşamasına ait çalışma koşulları Çizelge 3.4 ve 3.5'te sunulmuştur.

Çizelge 3.4. Modifiye kalem ucu elektrot için, dönüşümlü voltametri yöntemi ile uygulanan ön işlem koşulları

Çözelti	Çalışma aralığı (V)	Tarama hızı (mV/s)	Döngü sayısı
5 M H_2SO_4	0 - +1,9 -0,8 - +1,9	50	10
5 M H_3PO_4	0 - +1,9 -1,0 - +1,9		
5 M HNO_3	0 - +1,9 -1,0 - +1,9		
5 M CH_3COOH	-1,0 - +1,9		
1 M HSO_3F	0 +1,6		
1 M $NaOH$	0 - +1,9		

Çizelge 3.5. Modifiye kalem ucu elektrot için, kronoamperometri yöntemi ile uygulanan ön işlem koşulları

Çözelti	Çalışma aralığı (V)	Süre (dk)
5 M H_2SO_4	+1,9	2
5 M H_3PO_4	+1,9	2
5 M HNO_3	+1,9	2
5 M CH_3COOH	+1,9	2
1 M HSO_3F	+1,6	2

B. α -amanitin tayini için moleküler baskılanmış polimer sentezi

Elektrokimyasal temelli sensör çalışmalarında duyarlılığı veya seçiciliği arttırmak amaçlı, elektrot yüzey modifikasyonlarında iletken polimer veya moleküler baskılanmış polimer kullanımı yaygındır. Biyolojik sıvılarda α -amanitin tayini için çeşitli polimer ve kopolimer sentezleri yapılmış olup, öncelikli olarak bu elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitine karşı duyarlılığı araştırılmıştır. DV yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen polimer sentez işlemlerinde 50 mV/s tarama hızı kullanılmıştır. Çalışma elektrodu olarak Tombow 0,5 HB kalem ucu elektrokimyasal hücrede bulunan çözelti

içerisine 1,5 cm daldırılmış, referans elektrot olarak Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak ise Pt kullanılmıştır. Moleküler baskılanmış polimer sentez işlemleri sırasında template olarak kullanılan α -amanitinin modifiye olan elektrot yüzeyinden çıkarılma işlemi kimyasal ve elektrokimyasal yollarla olmak üzere 2 farklı şekilde yapılmıştır. Çizelge 3.6’da bu iş paketinde uygulanan çalışma koşulları ve kullanılan monomerler sunulmuştur. Bu aşamada monomer olarak kullanılan anilin ve pirol sentez öncesinde damıtılmıştır.

Çizelge 3.6. α -amanitin tayini için moleküler baskılanmış polimer sentezi çalışma koşulları

Reaksiyon karışımı	Çalışma aralığı (V) / Döngü sayısı	Template çıkarma koşulları	
		Elektrokimyasal yöntem	Kimyasal yöntem
Pirol-2-karboksilik asit (50 mM), LiClO ₄ (0,1 M), α -amanitin (45 μ M), Ultra saf su	0 - +1,35 2, 5 ve 10 döngü	Fosfat tamponu (pH 5,0) -0,5 - +1,2 V 50 mV/s, 10 döngü	Etanol : 0,1M NaOH (2:1) 15 dk, 250 rpm
Pirol-2-karboksilik asit (50 mM), LiClO ₄ (0,1 M), α -amanitin (45 μ M), Pirol (50 mM), Ultra saf su	-0,5 - +1,35 2, 5 ve 10 döngü		
Pirol-2-karboksilik asit (50 mM), LiClO ₄ (0,1 M), α -amanitin (45 μ M), Pirol (50 mM), ZnSO ₄ (0.01 M), Ultra saf su	-0,5 - +1,35 5 döngü		
Pirol-2-karboksilik asit (50 mM), LiClO ₄ (0,1 M), α -amanitin (45 μ M), Pirol (50 mM), ZnSO ₄ (0.01 M), Na ₂ CO ₃ (0,1 M), Ultra saf su (Template çıkarma işleminden sonra elektrotlar 24 saat %10’luk HClO ₄ ’te bekletildi)	-0,5 - +1,35 5 döngü		
Anilin-2-sülfonik asit (50 mM), H ₂ SO ₄ (0,5 M), α -amanitin (45 μ M), Ultra saf su	-0,2 - +1,0 2, 5 ve 10 döngü		
Anilin-2-sülfonik asit (50 mM), H ₂ SO ₄ (0,5 M), α -amanitin (45 μ M), Anilin (50 mM), Ultra saf su	-0,2 - +1,0 2, 5 ve 10 döngü		

Çizelge 3.6 (devam). α -amanitin tayini için moleküler baskılanmış polimer sentezi çalışma koşulları

Reaksiyon karışımı	Çalışma aralığı (V) / Döngü sayısı	Template çıkarma koşulları	
		Elektrokimyasal yöntem	Kimyasal yöntem
<i>o</i> -fenilendiamin (50 mM), H ₂ SO ₄ (0,5 M), α -amanitin (45 μ M), Ultra saf su	-0,2 - +1,0 2, 5 ve 10 döngü	Fosfat tamponu (pH 5,0) -0,5 - +1,2 V 50 mV/s, 10 döngü	Etanol : 0,1M NaOH (2:1) 15 dk, 250 rpm
<i>o</i> -fenilendiamin (50 mM), H ₂ SO ₄ (0,5 M), α -amanitin (45 μ M), Anilin (50 mM), Ultra saf su	-0,2 - +1,0 2, 5 ve 10 döngü		
<i>o</i> -fenilendiamin (50 mM), H ₂ SO ₄ (0,5 M), α -amanitin (45 μ M), Anilin (50 mM), ZnSO ₄ (0.01 M), Ultra saf su	-0,2 - +1,0 5 döngü		

C. Moleküler baskılanmış polimer ile modifiye elektrotların α -amanitinin elektrokimyasal tayininde kullanılabilirliği

α -amanitinin yapı olarak büyük bir molekül olması nedeniyle moleküler baskılanmış polimer ile elektrot yüzey modifikasyonu sırasında Li vd. (2014) tarafından önerilen, α -amanitinin daha küçük bir kısmını temsil eden template sentezi yapılmıştır. Çalışmanın bu aşamasında gerçekleştirilen yüzey modifikasyon işlemleri sırasında template olarak α -amanitin yerine T1 ve T2 kısaltmasıyla bahsedilen ve kimyasal yollarla sentezlenmiş templateler kullanılmıştır.

a. Template sentezi

Template sentez işlemi Li vd. (2014) tarafından önerilen şekilde gerçekleştirilmiştir. 2,0 g N-asetil-DL-triptofan içerisinde 2,0 ml derişik H₂SO₄ bulunan metanolde çözülmüş, 2 saat boyunca reflaks edilmiş ve çözelti oda sıcaklığına soğuduktan sonra 0,5 M'lik sulu sodyum karbonat (Na₂CO₃) ile nötrleştirilmiştir. Sulu faz 3 kere diklorometan ile ekstrakte edildikten sonra organik faz, 1 kere sulu Na₂CO₃, 2 kere distile su ile yıkanmıştır. Diklorometan vakum altında uçurularak katı beyaz ürün elde edilmiştir. Bu ürün % 50'lik (v/v) 100 ml metanol-propilamin çözeltisinde

çözölmüş, 48 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılarak vakum altında derişik hale getirilmiş ve triklorometanda çöktürölmüştür (Li vd., 2014). Bu sentez iki farklı sıcaklıkta gerçekleştirilerek elde edilen ürünler moleküler baskılanmış polimer sentezinde template olarak kullanılmıştır. 55 °C’de gerçekleştirilen sentez ürünü T1, 70 °C’de yapılan sentez ürünü ise T2 olarak ifade edilmiştir.

b. Moleküler baskılanmış polimer sentezi

Moleküler baskılanmış polimer sentez aşaması DV yöntemi kullanılarak 50 mV/s tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Template olarak sentezlenen 2 farklı ürünün kullanıldığı çalışmalarda çalışma elektrodu olarak 0,5 Tombow HB kalem ucu, referans elektrot olarak Ag/AgCl ve karşıt elektrot olarak Pt, elektrot kullanılmıştır. Template çıkarma koşullarının elektrokimyasal yöntemler ile yapıldığı çalışma koşulları Çizelge 3.7’de özetlenmiştir.

Çizelge 3.7. T1 ve T2 varlığında gerçekleştirilen moleküler baskılanmış polimer sentez koşulları

Reaksiyon karışımı	Çalışma aralığı (V) / Döngü sayısı	Template çıkarma koşulları
Pirol (50 mM), LiClO ₄ (1,0 M), T1/T2 (10 mM), Ultra saf su	-0,5 - +1,4 V 2, 5, 10, 15 döngü	Fosfat tamponu (0,05M) (pH 5,0) -0,5 - +1,2 V 50 mV/s, 10 döngü
Anilin (50 mM), H ₂ SO ₄ (0,5 M), T1/T2 (10 mM), Ultra saf su	0 - +1,4 V 2, 5, 10 döngü	
Pirol-2-karboksilik asit (50 mM), H ₃ PO ₄ (1,0 M), T1/T2 (10 mM), Asetonitril	0 - +2,0 V 5 döngü	
Pirol-2-karboksilik asit (50 mM), 4-vinil piridin (50 mM), H ₃ PO ₄ (1,0 M), T1/T2 (10 mM), Asetonitril		
Pirol-2-karboksilik asit (50 mM), 4-vinil piridin (50 mM), H ₃ PO ₄ (1,0 M), ZnSO ₄ (0.01 M), T1/T2 (10 mM), Asetonitril		
Anilin-2-sülfonik asit (50mM), H ₂ SO ₄ (0,5 M), T1/T2 (10mM), Ultra saf su	-0,2 - +1,5 V 5, 10, 20 döngü	

Anilin-2-sülfonik asitin monomer olarak kullanıldığı sentez ortamında modifiye edilen kalem ucu elektrotların yüzeylerinde oluşan polimer tabakasının sentez sonrası yıkama işleminde sıyrılmamasına rağmen elektrokimyasal template çıkarma işlemi öncesinde yüzeyden sıyrılması nedeniyle bu grup modifiye elektrotlar α -amanitin tayin yeteneği açısından incelenmemiştir.

c. Moleküler baskılanmış polimer ile modifiye elektrotların α -amanitin tayininde kullanımı

Çeşitli monomerler varlığında yüzey modifikasyonu yapılmış kalem uçlu elektrotların pH 7,4 değerinde 0,05 M fosfat tamponu ortamında, $2,5 \times 10^{-5}$ M derişiminde α -amanitine karşı davranışı incelenmiştir. Gerekli görülmesi durumunda elektrotların herhangi bir toksin içermeyen, serum ve idrar örneklerindeki girişim yapan maddelere karşı davranışları da araştırılmıştır. Serum örnekleri pH 7,4 değerinde, 0,05 M derişiminde fosfat tamponu ile 10 kat, idrar örnekleri ise 100 kat seyreltilerek kullanılmıştır. Modifiye elektrotlar 0-0,9 V çalışma aralığında DPV yöntemi kullanılarak 20 mV/s tarama hızında, aynı elektrot sistemiyle test edilmiştir.

3.2.3.4. Biyolojik sıvılardan toksin ekstraksiyonu amacıyla katı faz ekstraksiyon kolonu için yöntem optimizasyonu

Literatürde yer alan RIA ve ELISA dışındaki yöntemler ile α -amanitin tayin çalışmalarında öncelikle toksinin biyolojik sıvılardan ekstraksiyonu işlemi yapılmıştır (Tagliaro vd., 1991; Maurer vd., 1997; Gonmori vd., 2012; Yoshioka vd., 2014; Tomkova vd., 2015). Benzer şekilde bu çalışmada çeşitli elektrot modifikasyon işlemlerinden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde girişim etkisini aşabilmek amacıyla α -amanitin tayini için bir ön ekstraksiyon işlemine gereksinim duyulmuştur. Çeşitli araştırmacılar tarafından antikor temelli tayin yöntemleri dışında, α -amanitin tayini gerçekleştirilen çalışmalarda genellikle biyolojik sıvılardan ekstraksiyon işlemi amacıyla Waters marka Oasis HLB (1cc) tip kolon tercih edilmiştir. Oasis HLB tip kolon yüksek ekstraksiyon verimi, kullanım kolaylığı, küçük hacimde çalışma imkânı tanınması gibi nedenlerle farklı araştırmacılar tarafından serum ve idrar örneklerinden

α -amanitin ekstraksiyonu için tercih edilen bir katı faz ekstraksiyon kolonu olmuştur. Bu ticari tek kullanımlık kolon, N-vinilpirolidon (hidrofilik) ve divinilbenzen (lipofilik) içeren hidrofilik-lipofilik dengeli bir kolondur ve ters faz ekstraksiyon işlemleri için uygundur.

Katı faz ekstraksiyon kolonu için temin edilen marka tarafından önerilen genel yöntemler mevcuttur. Literatür incelendiğinde Oasis HLB tip kolon kullanımı sırasında farklı protokollerin uygulandığı görülmüş ve ekstraksiyon verimini arttırmak, girişim etkisini azaltmak gibi amaçlarla bir yöntem optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla farklı ön işlemler ve çeşitli yıkama çözeltileri kullanılarak biyolojik sıvılardan α -amanitin ve falloidin ekstraksiyonu için en uygun protokol belirlenmeye çalışılmıştır.

Optimizasyon aşamasında, her protokol için 3 kez (örnek kolona yüklendikten sonra, yıkama çözeltisi kolondan geçirildikten sonra ve ekstraksiyon çözeltisi kolondan geçirildikten sonra) örnekleme yapılmıştır. Alınan örnekler mobil faz olarak metanol kullanılan ince tabaka kromatografisi (İTK) ve DPV yöntemleriyle incelenmiştir.

Bir ön inceleme aşaması olarak gerçekleştirilen İTK sırasında α -amanitin, falloidin ve öncelikli olarak girişim etkisi aşılması gereken ürik asidin metanol ve kloroformun mobil faz olarak kullanıldığı koşullarda davranışları 254 nm’de incelenmiştir. Kolondan geçirilen çözeltiler İTK ile incelendikten sonra, organik çözelti içeren tüpler 30 °C’de kurutularak ekstrakt derişimi aynı olacak şekilde pH 7,4 değerinde 0,05 M fosfat tamponu ile çözülmüş ve DPV çalışmalarında kullanılmıştır. DPV yöntemi uygulamaları sırasında referans elektrot olarak Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak Pt, çalışma elektrodu olarak kalem ucu elektrot kullanılmış ve 20 mV/s tarama hızıyla 0 - 0,9 V aralığında çalışılmıştır. Bu aşamada elektrokimyasal hücrenin 5 ml hacimde çalışma olanağı sunması nedeniyle pH 7,4 değerindeki 0,05 M fosfat tamponu ortamında ve kolondan geçirilen çözeltiler 5 kat seyreltilerek çalışılmıştır. DPV incelemeleri sırasında α -amanitinin yükseltgenme bölgesinde bulunan ve girişim etkisine neden olan pikin varlığı araştırılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sırasında uygun protokoller seçilerek biyolojik sıvılara toksin eklenmemiş olup, toksin varlığında

tekrar bu yöntemlerin kullanılabilirliği incelenmiştir.

A. Serumdan toksin ekstraksiyonu için uygun yöntemin seçilmesi

Literatürde farklı çalışma gruplarınca uygulanan katı faz ekstraksiyon işlemleri göz önünde bulundurularak Oasis HLB kolonunda kullanılması amacıyla serum için 8 farklı protokol seçeneği hazırlanmıştır. Protokoller seruma ön işlem uygulanması, yıkama aşamasında farklı çözeltilerin kullanılması gibi farklılıklar içermekte olup serum için uygulanan katı faz protokollerine ilişkin bilgiler Çizelge 3.8’de özetlenmiştir.

Kullanılan protokollere ait çözeltiler ayrı tabakalara sırasıyla örnek, yıkama çözelti(leri) ve ekstraksiyon çözeltileri kolondan geçirildikten sonra olmak üzere yüklenmiş ve mobil faz olarak metanol kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen İTK sonuçları ile DPV yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır.

Çizelge 3.8. Serumdan toksin ekstraksiyonu yöntem optimizasyonu için Oasis HLB kolonunda kullanılan protokoller

Protokol No	Örnek	Hacim (ml)	Yıkama	Hacim (ml)	Ekstraksiyon	Hacim (ml)
S1	Serum	1	%1 asetik asit (suda)	1	Metanol	1
S2	Serum	1	%5 formik asit (metanolde)	1	Metanol	1
S3*	Serum	1	%5 metanol (suda)	1	Metanol	1
			%5 metanol (kloroformda)	0,5		
S4	Serum	1	%5 metanol (kloroformda)	1	Metanol	1
S5	Serum	1	%5 metanol (suda)	1	Metanol	1
S6	Serum + %2 asetik asit (suda)	1	%5 metanol (suda)	1	Metanol	1
S7*	Serum + %2 asetik asit (suda)	1	%5 metanol + %2 asetik asit (suda)	1	%65 metanol + %2 asetik asit (suda)	1
			%5 metanol + %2 amonyum hidroksit (suda)	1		
			%65 metanol + %2 amonyum hidroksit (suda)	1		
S8	Serum + %2 asetik asit (suda)	1	Metanol	0,5	Metanol	1

* S3 ve S7 numaralı protokollerde sırası ile 2 ve 3 ardışık yıkama işlemi uygulanmıştır.

B. İdrardan toksin ekstraksiyonu için uygun yöntemin seçilmesi

Serum için yapılan ekstraksiyon seçim işlemine benzer olarak idrardan toksin ekstraksiyonu amacıyla bir protokol optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, Oasis HLB kolonunun toksinlerin idrardan katı faz ekstraksiyonunda kullanılması amacıyla 15 farklı protokol denenmiş ve girişim etkisinin aşıldığı en uygun yöntemler araştırılmıştır. Bu amaçla kullanılan çözeltiler ve yapılan ön işlemler Çizelge 3.9’da sunulmuştur.

Çizelge 3.9. İdrardan toksin ekstraksiyonu yöntem optimizasyonu için Oasis HLB kolonunda kullanılan protokoller

Protokol No	Örnek	Hacim (ml)	Yıkama	Hacim (ml)	Ekstraksiyon	Hacim (ml)
İ1	İdrar	1	%1 asetik asit (suda)	1	Metanol	1
İ2*	İdrar 10,000g, 2dk	1	%5 metanol (suda)	1	Metanol	1
			%5 metanol (kloroformda)	1		
İ3	İdrar 12.000g, 5dk	1	%5 metanol (kloroformda)	1	Metanol	1
İ4	1ml idrar + 2 ml Asetonitril 719g, 10dk, 4°C ----- Süpernatant + 5ml Diklorometan 719 g, 5dk, 4°C ----- 1ml üst (sulu) faz kullanılmıştır	1	%5 metanol (kloroformda)	1	Metanol	1
İ5	İdrar + %2 H ₃ PO ₄ (suda)	1	%5 metanol (suda)	1	Metanol	1
İ6	İdrar 3000rpm, 10dk	1	%5 metanol (suda)	1	Metanol	1
İ7	İdrar 3000rpm, 10dk	1	%5 metanol (kloroformda)	1	Metanol	1

Çizelge 3.9 (devam). İdrardan toksin ekstraksiyonu yöntem optimizasyonu için Oasis HLB kolonunda kullanılan protokoller

Protokol No	Örnek	Hacim (ml)	Yıkama	Hacim (ml)	Ekstraksiyon	Hacim (ml)
İ8*	İdrar + %2 H ₃ PO ₄ (suda)	1	%5 metanol +%2 asetik asit (suda)	1	Metanol	1
			%5 metanol + %2 amonyum hidroksit (suda)	1		
			%65 metanol + %2 amonyum hidroksit (suda)	1		
			%65 metanol + %2 asetik asit (suda)	1		
İ9	İdrar 3000rpm, 10dk	1	%1 NaOH (suda)	1	Metanol	1
İ10	İdrar + %2 H ₃ PO ₄ (suda) 3000rpm, 10dk	1	%1 NaOH (suda)	1	Metanol	1
İ11	0,5ml İdrar + 0,5ml %4 fosforik asit (suda) 3000rpm, 10dk	1	%5 metanol (suda)	1	Metanol	1
İ12	İdrar	1	%5 asetik asit (suda)	1	Metanol	1
İ13	İdrar	1	%5 sodyum hidroksit (suda)	1	Metanol	1
İ14	İdrar	1	%1 asetik asit (asetonitrilde)	1	Metanol	1
İ15	İdrar	1	Asetonitril	1	Metanol	1

* İ2 ve İ8 numaralı protokollerde sırası ile 2 ve 4 ardışık yıkama işlemi uygulanmıştır.

3.2.4. Elektrokimyasal yöntemin HPLC ve ELISA yöntemleri ile karşılaştırılması

Elektrokimyasal olarak yapılan α -amanitin ve falloidin toksinlerinin tayinleri bu amaçla en çok tercih edilen yöntemler olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve enzim bağlı immünosorbent testi (ELISA) yöntemleriyle de yapılarak elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Çalışma kapsamında HPLC ile miktar tayinleri ters faz C18 kolonda HPLC yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HPLC’de kullanılan çalışma koşulları Çizelge 3.10’da özetlenmiştir.

Çizelge 3.10. α -amanitin ve falloidin tayininde kullanılan HPLC koşulları

Cihaz	Shimadzu LC20A VP
İşlemci	Class VP chromatography manager software (Shimadzu)
Dedektör	UV- α -amanitin; 302 nm, falloidin; 291 nm (Shimadzu)
Pompa	Quaternary pump (Shimadzu)
Kolon	Inertsil ODS3-C ₁₈ kolon (250 mm, 4.6 mm i.d) (GL Sciences Inc.)
Degazer	Degasser (Shimadzu)
Enjektör	Shimadzu 1100 (Shimadzu)
Akış hızı	1 ml/dak
Çözücü Sistemi	0,05 M Sodyum asetat tamponu (pH 5.5) : Asetonitril (80:20, v/v)

α -amanitinin ELISA yöntemi ile belirlenebilmesi amacı ile “EASTBIOPHARM Human ANT ELISA Kit” marka ticari kit kullanılmıştır. Farklı α -amanitin derişimlerinin ticari ELISA kit ile belirlenmesi için üretici tarafından önerilen protokol izlenerek mikropate spektrofotometre ile absorbans değerleri belirlenmiştir. Falloidin toksininin belirlenmesine yönelik bir kit bulunmadığı için ELISA temelli kit ile tayin falloidin için gerçekleştirilememiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

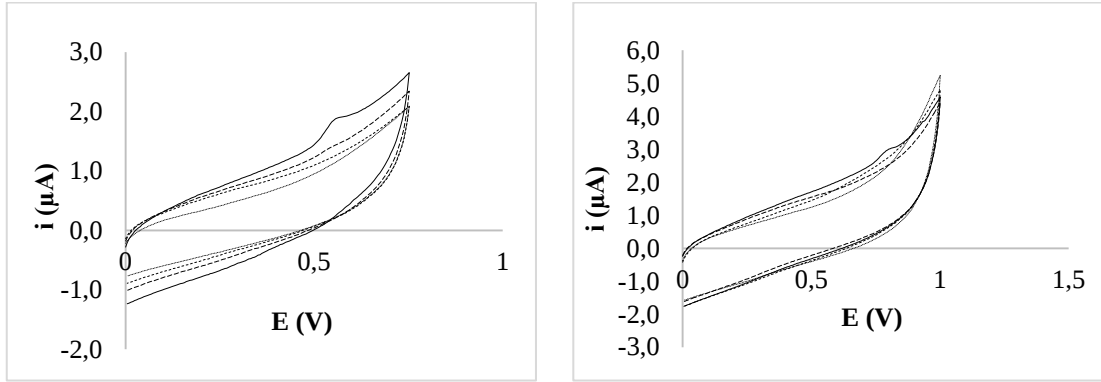
4.1. α -amanitin ve Falloidin Toksinlerinin Farklı Elektrot Sistemleri ile Elektrokimyasal Davranışının İncelenmesi

Bu aşamada elektrokimyasal tayini yapılması hedeflenen α -amanitin ve falloidin toksinlerinin, doğrudan bu yöntemler ile tayininin yapılabilirliğini araştırmak amacıyla elektroaktif özellikte olup olmadığı araştırılmıştır.

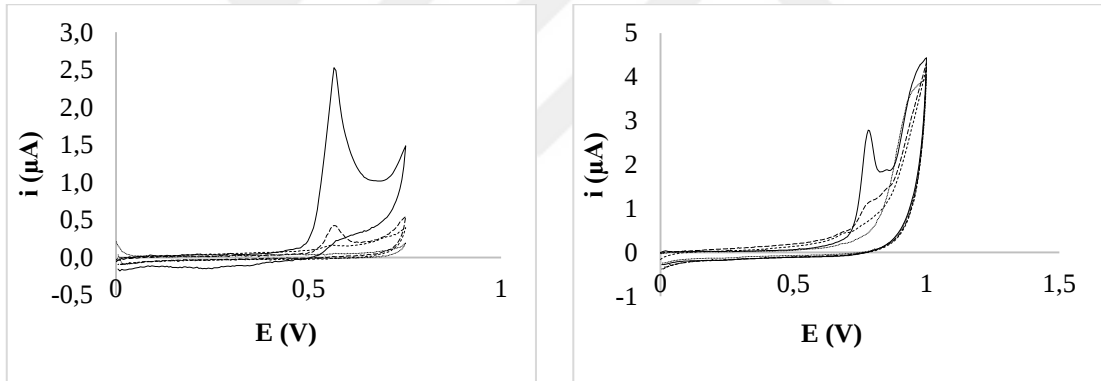
Farklı elektrot tipleri α -amanitin ve falloidinin elektrokimyasal davranışının izlenmesinde kullanılmış ve en iyi pik akım cevabının elde edildiği elektrot sistemi belirlenmiştir. Kullanılabilirliği araştırılan en iyi elektrot sistemi ile α -amanitin ve falloidin için pH optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada elde edilen veriler aşağıda sunulmuştur.

4.1.1. Farklı derişimlerde α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal davranışının incelenmesi ve uygun çalışma elektrodunun seçilmesi

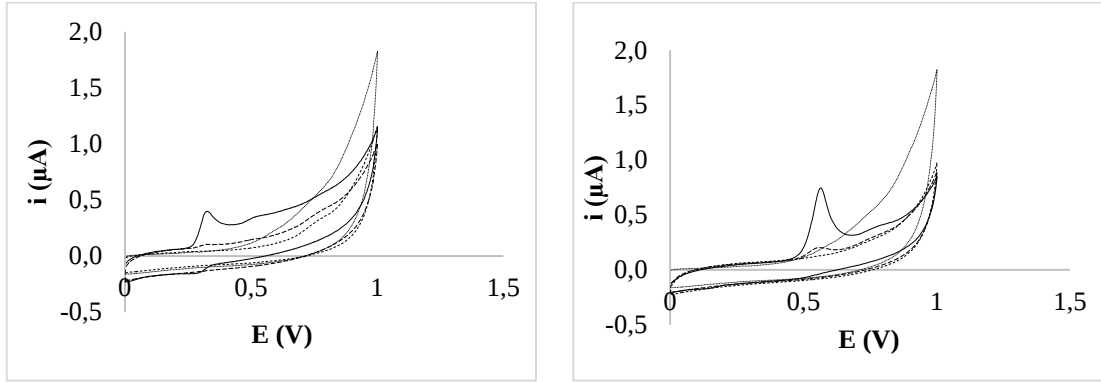
Bu aşamada farklı elektrot sistemleri ile gerçekleştirilen deneylerde α -amanitin ve falloidine ait elde edilen voltamogramlar ve akım cevapları sırasıyla Şekil 4.1 – 4.4 ve Çizelge 4.1’de sunulmuştur.



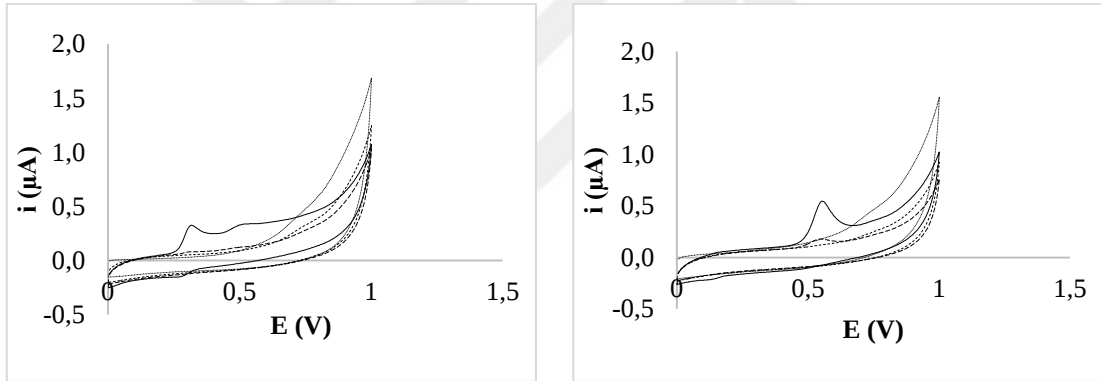
Şekil 4.1. Fosfat tamponu ortamında 10^{-5} - 10^{-7} M derişimde α -amanitin (solda) ve falloidine (sağda) ait dönüşümlü voltamogramlar (Çalışma elektrodu: Camısı karbon, Referans elektrot: Ag/AgCl, Karşıt elektrot: Pt, (..... : Fosfat tamponu, — : 10^{-5} M, ---- : 10^{-6} M, - - - - : 10^{-7} M)



Şekil 4.2. Fosfat tamponu ortamında 10^{-5} - 10^{-7} M derişimde α -amanitin (solda) ve falloidine (sağda) ait dönüşümlü voltamogramlar (Çalışma elektrodu: Kalem ucu grafit, Referans elektrot: Ag/AgCl, Karşıt elektrot: Pt, (..... : Fosfat tamponu, — : 10^{-5} M, ---- : 10^{-6} M, - - - - : 10^{-7} M)



Şekil 4.3. Fosfat tamponu ortamında 10^{-5} - 10^{-7} M derişimde α -amanitin (solda) ve falloidine (sağda) ait dönüşümlü voltamogramlar (Ekran baskılı elektrot: Çalışma elektrodu: Karbon, Referans elektrot: Ag, Karşıt elektrot: Pt, (..... : Fosfat tamponu, — : 10^{-5} M, ---- : 10^{-6} M, : 10^{-7} M)



Şekil 4.4. Fosfat tamponu ortamında 10^{-5} - 10^{-7} M derişimde α -amanitin (solda) ve falloidine (sağda) ait dönüşümlü voltamogramlar (Ekran baskılı elektrot: Çalışma elektrodu: Karbon, Referans elektrot: Ag, Karşıt elektrot: C, (..... : Fosfat tamponu, — : 10^{-5} M, ---- : 10^{-6} M, : 10^{-7} M)

Çizelge 4.1. α -amanitin ve falloidine ait farklı elektrot sistemlerinde elde edilen pik potansiyel ve akım değerleri

	α -amanitin		Falloidin	
	Yükseltgenme potansiyeli (V)	Akım (μ A)	Yükseltgenme potansiyeli (V)	Akım (μ A)
Camsı karbon elektrot	0,557	0,162	0,796	0,102
Kalem ucu grafit elektrot	0,566	2,043	0,781	1,712
Ekran baskılı elektrot Ag/C/Pt	0,325	0,247	0,564	0,547
Ekran baskılı elektrot Ag/C/C	0,315	0,185	0,552	0,340

Dönüşümlü voltamogramlar incelendiğinde her iki toksinin de tersinmez özellikte olduğu, α -amanitin ve falloidinin birbirinden farklı pik potansiyellerine sahip birer adet temel yükseltgenme piki olduğu görülmüştür. Toksin içermeyen fosfat tamponunda yapılan ölçümlerden elde edilen voltamogramlar ise, toksin varlığında görülen yükseltgenme piklerinin toksinlerin kendisine ait olduğunu ve tayin çözeltisi olarak kullanılan fosfat tamponundan kaynaklanmadığını doğrular niteliktedir. Her iki toksine ait yükseltgenme piklerinin farklı potansiyellerde olması bu iki toksinin birbirinin cevabı üzerinde girişim yapma ihtimalini düşürmektedir. Zehirli bir mantarda birden fazla siklopeptid toksinin bir arada bulunduğu düşünüldüğünde bu durum toksinlerin doğru ve duyarlı biçimde belirlenmesi açısından önemli bir avantajdır.

Ölümcül mantar zehirlenmelerinden birinci derecede sorumlu α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal tayinini gerçekleştirebilmek için tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar elde edilebilecek elektrotların seçilmesi önemli bir gerekliliktir. DV yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen veriler çalışma elektrodu olarak kalem ucu elektrodun kullanılmasının daha verimli olduğunu göstermektedir. KUE kullanılarak elde edilen pik akım cevabı α -amanitin için CKE kullanılarak elde edilen akım cevabından yaklaşık 12 kat daha yüksek iken falloidin için, bu farkın yaklaşık 16 kat olduğu görülmüştür. Benzer şekilde ekran baskılı

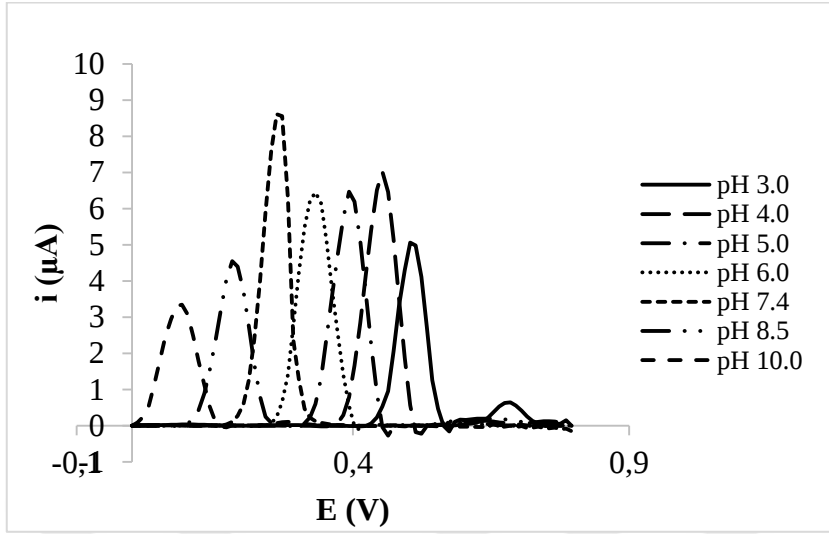
elektrotların kullanıldığı deney gruplarında da KUE kadar iyi bir akım cevabı elde edilememiştir. Yine KUE kullanılarak yapılan ölçümlerde iyi bir baseline elde edildiği ve diğer elektrot sistemlerine oranla daha düşük derişimlerde toksin tayin edilebildiği görülmektedir.

KUE kullanılarak elde edilen avantaj sadece daha düşük derişimde toksin tayini ve yüksek pik akım değerleri olmamıştır. Yukarıda sunulan dönüşümlü voltamogramlar incelendiğinde tersinmez özellikte olduğu görülen bu yükseltgenme davranışı için KUE tek kullanımlık, ucuz, temizlik işlemi gerektirmeme gibi avantajlar da sağlamıştır. Çünkü CKE kullanılmadan önce bir dizi ön işlemden geçirilmelidir ve her ölçümden sonra zaman alan bu ön işlem çok pratik bir kullanım sağlamayacaktır.

Bu aşamada elde edilen veriler ışığında α -amanitin ve falloidin tayininde kalem ucu elektrodun daha duyarlı ve başarılı olarak kullanılabileceği anlaşılmış olup bu durum literatürde ilk kez belirlenmiştir. Çalışmanın bundan sonraki aşamalarında çalışma elektrodu olarak KUE kullanılmıştır.

4.1.2. α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal tayini için uygun pH değerinin belirlenmesi

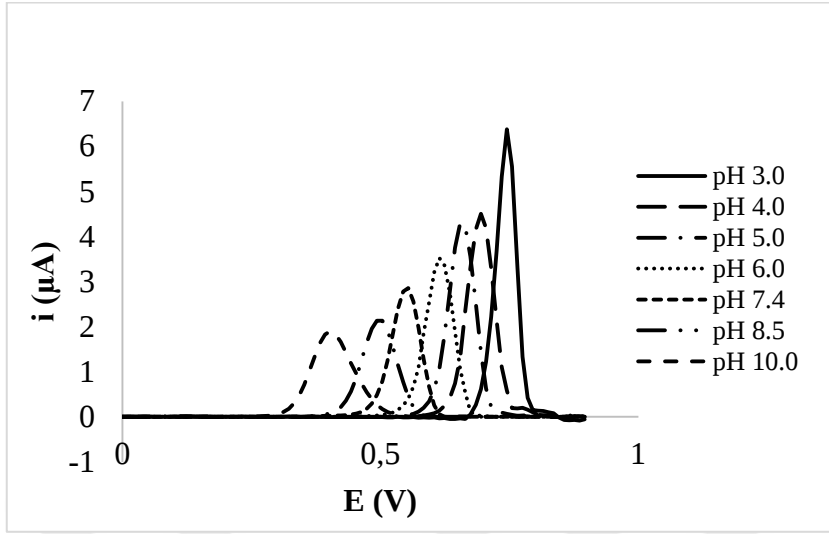
Bir analitin elektrokimyasal tayini sırasında yükseltgenme potansiyeli ve pik akım cevabını etkileyen en önemli faktörlerden birisi kullanılan tayin çözeltisinin pH değeridir. Bu nedenle α -amanitin ve falloidin toksinlerinin 7 farklı pH değerine sahip 0,05 M derişimindeki fosfat tamponunda elektrokimyasal davranışları incelenmiştir. α -amanitin ve falloidine ait voltamogramlar ve yükseltgenme pik akım değerleri sırasıyla Şekil 4.5, Çizelge 4.2 ve Şekil 4.6, Çizelge 4.3'te sunulmuştur.



Şekil 4.5. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda α -amanitine ait diferansiyel puls voltamogramları

Çizelge 4.2. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda α -amanitine ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri

pH	Yükseltgenme potansiyeli (V)	Akım (μA)
3,0	0,504	$5,304 \pm 0,546$
4,0	0,453	$7,088 \pm 0,943$
5,0	0,393	$6,517 \pm 0,103$
6,0	0,332	$6,478 \pm 0,536$
7,4	0,262	$8,551 \pm 0,149$
8,5	0,181	$4,448 \pm 0,210$
10,0	0,091	$3,309 \pm 0,031$



Şekil 4.6. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda falloidine ait diferansiyel puls voltamogramları

Çizelge 4.3. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda falloidine ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri

pH	Yükseltgenme potansiyeli (V)	Akım (μA)
3,0	0,745	$6,413 \pm 0,696$
4,0	0,695	$4,449 \pm 0,201$
5,0	0,655	$4,270 \pm 0,034$
6,0	0,614	$3,658 \pm 0,452$
7,4	0,554	$2,876 \pm 0,038$
8,5	0,493	$2,134 \pm 0,019$
10,0	0,403	$1,875 \pm 0,103$

α -amanitin ve falloidin toksinleri için yapılan DPV analiz sonuçları incelendiğinde; α -amanitine ait maksimum yükseltgenme pik akım değeri serum pH değeri olan pH: 7,4'te, falloidine ait maksimum yükseltgenme pik akım değeri pH: 3,0'da elde edilmiştir. Her iki pH değerinde α -amanitin ve falloidine ait yükseltgenme pik potansiyelleri birbirlerinden farklı çıkmıştır. pH: 3,0'da iki toksine ait yükseltgenme pik potansiyelleri arasındaki fark 0,241 V iken pH:7,4'te 0,292 V'tur.

Yükseltgenme potansiyelleri dikkate alındığında her iki pH değerinde de toksinlerin birbirleriyle girişim yapmadan tayinlerinin yapılabileceğini işaret etmektedir.

Çalışmanın bundan sonraki kısımlarında α -amanitinin tayin edilmesi durumunda pH 7,4, falloidin tayin edilmesi durumunda ise pH 3,0 değerinde fosfat tamponu kullanılmıştır. Biyolojik sıvılarda bir ölçüm yapılması durumunda ise seyreltme yapılacak ise her iki toksin için de uygun pH değerleri dikkate alınarak bu işlem gerçekleştirilmiştir.

4.2. α -amanitin ve Falloidin Toksinlerinin Elektrokimyasal Tayinlerinde Girişim Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmanın bu aşamasında ürik asit, folik asit, dopamin, parasetamol, vb. biyolojik sıvılarda girişim yapma ihtimali bulunan maddelerin analizleri gerçekleştirilmiştir. Zehirli mantar örneğinde bir arada bulunma ihtimali olan siklopeptid toksinlerin yanında α -amanitin ve falloidin de birbirinin akım cevapları üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Glukoz gibi elektroaktif olmayan ve elektroaktif olsalar bile tayin edilecek toksinler ile aynı yükseltgenme potansiyeline sahip olmayan bileşikler için girişim olmaması yeter koşul olarak kabul edilmiştir.

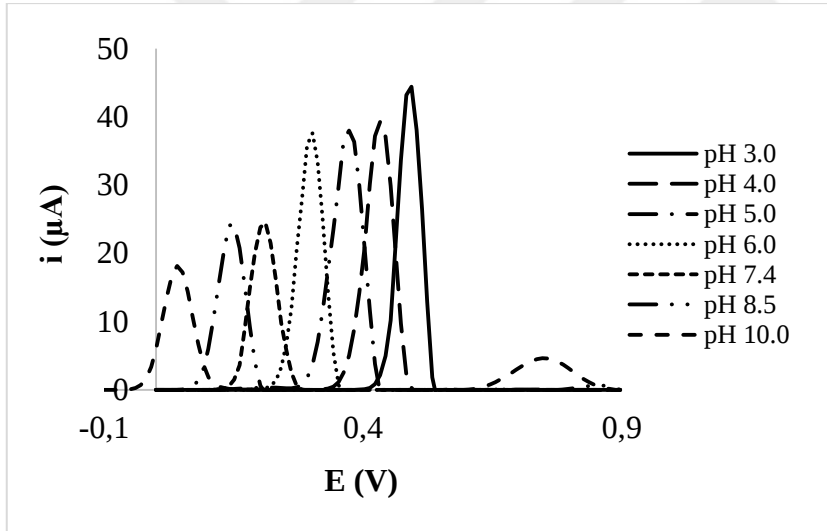
4.2.1. Serum ve idrar ortamındaki girişim yapma ihtimali olan bileşiklerin elektrokimyasal davranışları

Elektrokimyasal yöntemler ile yapılan tayin çalışmalarında girişim etkisi yoğun olarak çalışılan bazı bileşikler ürik asit, askorbik asit, glukoz ve dopamindir (Dai vd., 2009; Huang vd., 2014; Li vd., 2013, 2014; Pozo vd., 2014; Tsai vd., 2013; Wu vd., 2007; Zhu vd., 2013). Biyolojik sıvılarda aminoasit, organik asit, inorganik maddeler vb. bileşikler de bulunmaktadır. Bu iş paketinde biyolojik sıvılarda bulunan ve girişim yapma ihtimali olan ürik asit, folik asit ve dopaminin, zehirli mantarlardaki bazı toksinlerin (β -amanitin, γ -amanitin ve fallasidin), aynı zamanda olası bir ağrı kesici alınmış olma ihtimaline karşı parasetamolün farklı pH değerlerindeki fosfat tamponu

ortamında elektrokimyasal davranışları DPV yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Bu aşamada 20 mV/s tarama hızı ile çalışılmış ve çalışma elektrodu olarak KUE, referans elektrot olarak Ag/AgCl, karşıt elektrot olarak ise Pt kullanılmıştır.

4.2.1.1. Ürik asidin farklı pH değerlerindeki elektrokimyasal davranışı

Farklı pH değerlerine sahip fosfat tamponunda ürik asidin elektrokimyasal davranışları DPV yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Yapılan deneyler sırasında ürik asit, 10^{-4} M son derişimi olacak şekilde ortama ilave edilmiştir. Voltamogramlar incelendiğinde artan pH değerlerinde yükseltgenme pik potansiyellerinin katodik bölgeye doğru kaydığı görülmektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda ürik aside ait diferansiyel puls voltamogramları

Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponu ortamında ürik asit ile elde edilen yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri Çizelge 4.4'te gösterilmiştir.

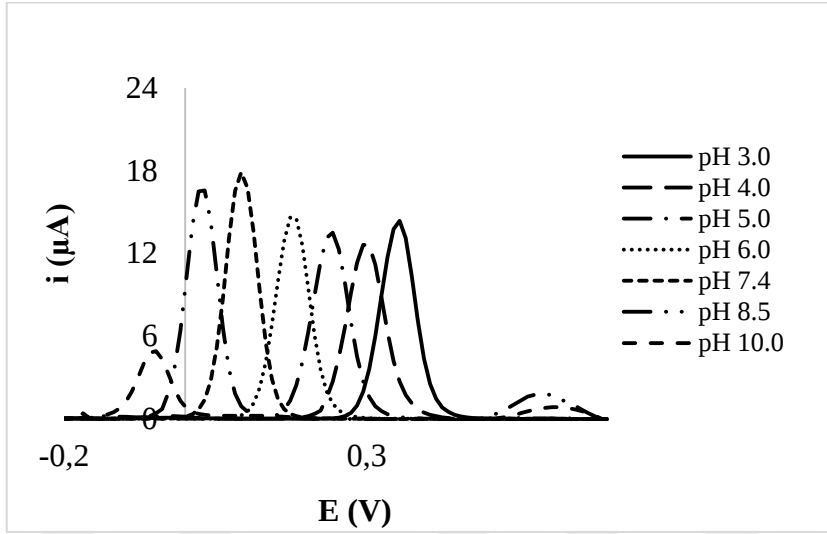
Çizelge 4.4. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda ürik aside ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri

pH	Yükseltgenme potansiyeli (V)	Akım (μA)
3,0	0,493	$46,033 \pm 4,480$
4,0	0,433	$39,777 \pm 0,422$
5,0	0,373	$38,737 \pm 0,344$
6,0	0,302	$39,227 \pm 1,008$
7,4	0,211	$24,637 \pm 1,029$
8,5	0,151	$24,000 \pm 0,912$
10,0	0,041	$17,450 \pm 0,756$

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, ürik aside ait yükseltgenme pik akım değerinin pH 3,0 iken en yüksek olduğu tespit edilmiştir.

4.2.1.2. Dopaminin farklı pH değerlerindeki elektrokimyasal davranışı

Farklı pH değerlerinde, 10^{-4} M derişimindeki dopaminin elektrokimyasal davranışları DPV yöntemi ile izlenmiştir. Dopamine ait yükseltgenme pik potansiyellerinin artan pH değerlerinde katodik bölgeye doğru kaydığı görülmüştür (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda dopamine ait diferansiyel puls voltamogramları

Dopamine ait farklı pH değerlerinde elde edilen yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri Çizelge 4.5'te gösterilmektedir.

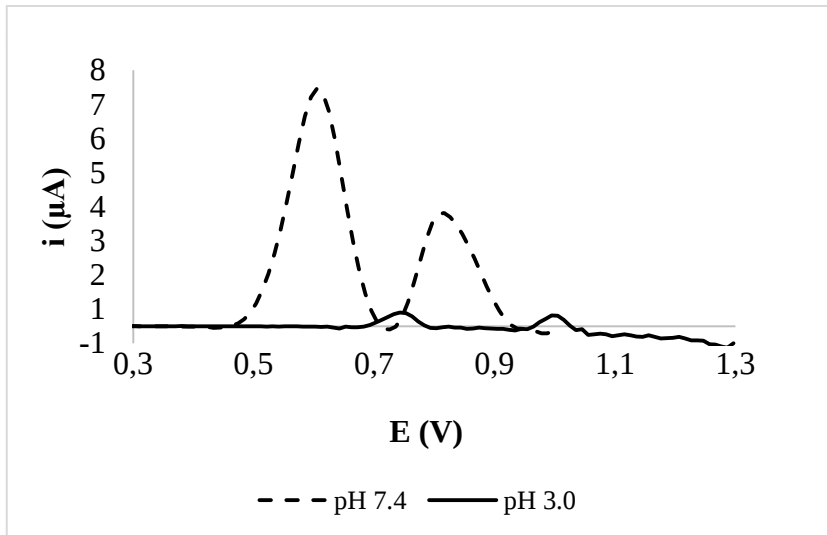
Çizelge 4.5. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda dopamine ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri

pH	Yükseltgenme potansiyeli (V)	Akım (μA)
3,0	0,355	$13,490 \pm 0,769$
4,0	0,294	$12,073 \pm 0,484$
5,0	0,244	$14,017 \pm 1,223$
6,0	0,173	$14,537 \pm 0,271$
7,4	0,093	$17,770 \pm 0,182$
8,5	0,032	$16,590 \pm 0,291$
10,0	- 0,048	$4,898 \pm 0,877$

Çizelge 4.5'te sunulan veriler değerlendirildiğinde en yüksek akım değerinin pH 7,4 değerinde elde edildiği tespit edilmiştir.

4.2.1.3. Folik asidin farklı pH değerlerindeki elektrokimyasal davranışı

Farklı pH değerlerinde, 10^{-4} M derişiminde folik asidin DPV yöntemi ile elde edilen voltamogramlar Şekil 4.9’da sunulmuştur. Folik aside ait pH: 10,0 dışındaki tüm pH değerlerinde iki adet yükseltgenme pikinin olduğu gözlenmiştir. Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde α -amanitin ve falloidin toksinlerinin en yüksek akım cevabı verdiği pH değerleri öncelikli olarak dikkate alınmıştır.



Şekil 4.9. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda folik aside ait diferansiyel puls voltamogramları

Folik aside ait farklı pH değerlerinde elde edilen yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri ise Çizelge 4.6’da gösterilmektedir.

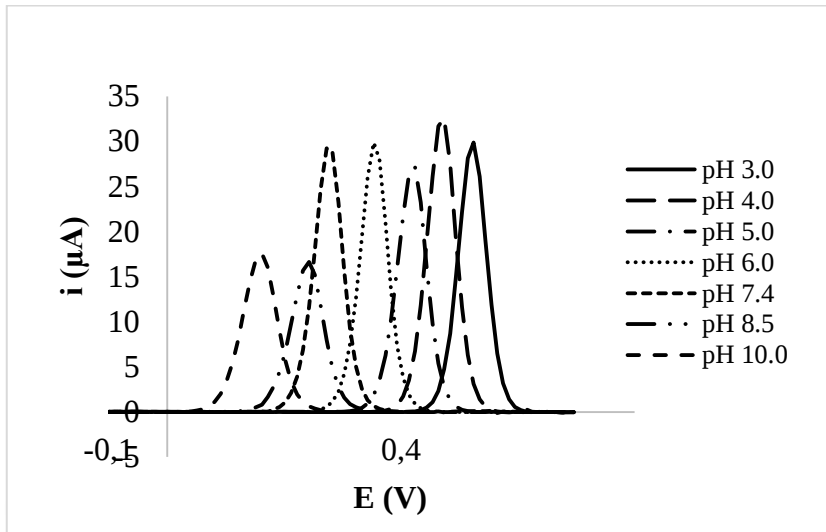
Çizelge 4.6. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda folik aside ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri

pH	Yükseltgenme potansiyeli (V)	Akım (μ A)
3,0	0,743	$0,432 \pm 0,066$
	1,005	$0,554 \pm 0,119$
4,0	0,723	$1,175 \pm 0,019$
	0,975	$1,106 \pm 0,135$
5,0	0,653	$5,066 \pm 0,010$
	0,935	$1,550 \pm 0,634$
6,0	0,622	$8,635 \pm 0,363$
	0,844	$6,673 \pm 0,152$
7,4	0,605	$7,055 \pm 0,028$
	0,817	$3,189 \pm 0,336$
8,5	0,602	$7,762 \pm 0,112$
	0,783	$1,146 \pm 0,028$
10,0	0,572	$6,670 \pm 0,302$

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, her iki yükseltgenme pik akım cevabının pH 6,0 değerinde en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Her serideki yükseltgenme piklerinde pH değerinin artması ile katodik bölgeye doğru kayma görülmektedir.

4.2.1.4. Parasetamolün farklı pH değerlerindeki elektrokimyasal davranışı

Çoğu mantar zehirlenmesi vakasında kişilerin zehirlenme belirtilerini doğru algılayamayıp semptomların giderilmesi amacıyla ağrı kesici aldıkları görülmektedir. Ağrı kesicilerin büyük çoğunluğunda parasetamol etken madde olarak bulunmaktadır. Bu nedenle zehirlenme şikayeti ile hastaneye başvuran kişilerin ağrı kesici almış olma ihtimallerine karşı 10^{-4} M derişimindeki parasetamolün farklı pH değerlerindeki elektrokimyasal davranışları da izlenmiştir. Elde edilen voltamogramlar incelendiğinde pH değeri arttıkça yükseltgenme pik potansiyellerinin katodik bölgeye doğru kaydığı görülmektedir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda parasetamole ait diferansiyel puls voltamogramları

Artan pH değerlerinde parasetamole ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri Çizelge 4.7’de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda parasetamole ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri

pH	Yükseltgenme potansiyeli (V)	Akım (μA)
3,0	0,524	$29,620 \pm 1,153$
4,0	0,474	$32,793 \pm 2,431$
5,0	0,424	$26,930 \pm 0,815$
6,0	0,353	$29,390 \pm 1,289$
7,4	0,273	$29,310 \pm 1,711$
8,5	0,242	$16,650 \pm 0,215$
10,0	0,162	$17,357 \pm 1,050$

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde parasetamole ait en iyi akım cevabının pH 4,0 değerinde alındığı tespit edilmiştir.

Serum ortamında farklı pH değerlerinde elektrokimyasal davranışı incelenen biyolojik sıvıdaki bileşenlerden dopaminin yükseltgenme piki her iki toksinin de

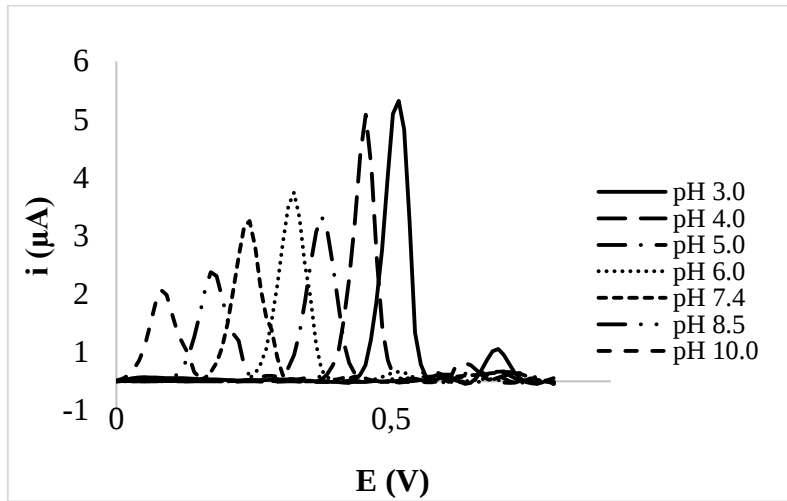
yükseltgenme bölgesinde bulunmazken, ürik asit ve parasetamolün α -amanitin için girişim yapma riski taşıdığını, folik asidin ise falloidin için yok denecek kadar az girişim yapma ihtimali olduğunu göstermiştir. Ancak bu sonuçların her bir maddenin tek başına ortama ilave edilerek elde edildiği, serum veya idrar ortamında bir arada bulunduklarında kendi aralarında olabilecek etkileşimlerin de girişim riski oluşturabileceği unutulmamalıdır. Yine ortamda bulunan ancak elektroaktif olmayan bir bileşikle de toksinler etkileşime girebilirler. Bu nedenlerle çalışmanın sonraki aşamalarında gerçek serum ve idrar örneklerine toksin ilave edilerek girişim etkisi çalışmalarına devam edilmiştir. Biyolojik sıvılarda bulunan elektroaktif bileşiklerin yalnızken davranışları hakkında bilgi sahibi olmak, gerçek örnek analizleri sırasında gözlemlenen bir yükseltgenme pikinin toksine ait olup olmadığı hakkında yorum yapabilmek için gereklidir.

4.2.2. Zehirli mantarlardaki bazı toksinlerin elektrokimyasal davranışları

Zehirli mantarlarda bulunan diğer siklopeptid toksinlerin elektrokimyasal davranışları hakkında bilgi sahibi olmak amacıyla farklı pH değerlerindeki fosfat tamponlarında DPV yöntemi ile 20 mV/s tarama hızı kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. β -amanitin, γ -amanitin ve fallasidine ait voltamogramlar ve akım cevapları aşağıda sunulmuştur.

4.2.2.1. β -amanitinin farklı pH değerlerindeki elektrokimyasal davranışı

Farklı pH değerlerinde β -amanitinin elektrokimyasal davranışları 10^{-5} M derişimindeki β -amanitin kullanılarak izlenmiştir. Şekil 4.11'de elde edilen voltamograma göre artan pH değerlerinde yükseltgenme pik potansiyellerinin katodik bölgeye doğru kaydığı görülmektedir.



Şekil 4.11. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda β -amanitine ait diferansiyel puls voltamogramları

β -amanitine ait farklı pH değerlerinde elde edilen yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri incelendiğinde en yüksek akım cevabının pH 3,0 değerinde, $4,862 \pm 0,144 \mu\text{A}$ olarak elde edildiği görülmüştür (Çizelge 4.8).

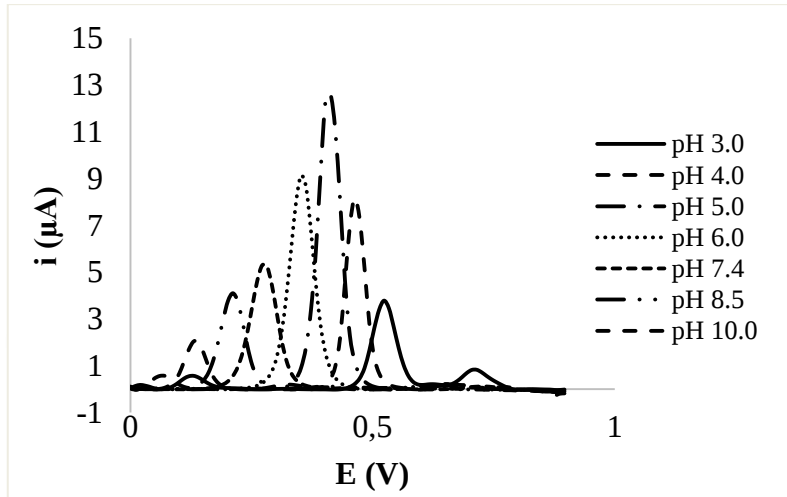
Çizelge 4.8. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda β -amanitine ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri

pH	Yükseltgenme potansiyeli (V)	Akım (μA)
3,0	0,514	$4,862 \pm 0,144$
4,0	0,454	$4,363 \pm 0,462$
5,0	0,373	$2,768 \pm 0,167$
6,0	0,323	$3,288 \pm 0,082$
7,4	0,243	$2,785 \pm 0,050$
8,5	0,172	$1,875 \pm 0,022$
10,0	0,081	$1,589 \pm 0,065$

4.2.2.2. γ -amanitinin farklı pH değerlerindeki elektrokimyasal davranışı

Farklı pH değerlerinde γ -amanitinin elektrokimyasal davranışları 10^{-5} M derişimindeki γ -amanitin kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen voltamogramlar

(Şekil 4.12) ve akım değerleri (Çizelge 4.9) incelendiğinde en yüksek akım cevabının pH 5,0 değerinde $12,805 \pm 0,858 \mu\text{A}$ olduğu tespit edilmiştir



Şekil 4.12. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda γ -amanitine ait diferansiyel puls voltamogramları

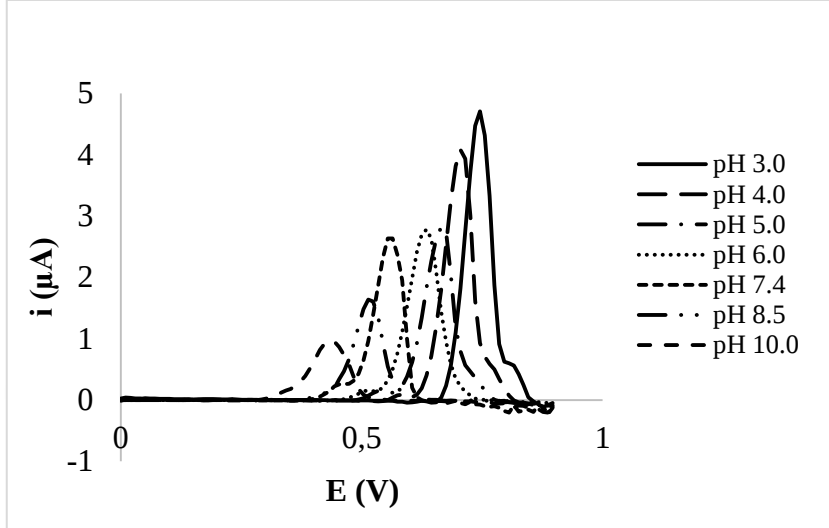
Çizelge 4.9. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda γ -amanitine ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri

pH	Yükseltgenme potansiyeli (V)	Akım (μA)
3,0	0,524	$3,282 \pm 0,407$
4,0	0,463	$8,141 \pm 0,189$
5,0	0,413	$12,805 \pm 0,858$
6,0	0,353	$9,737 \pm 0,149$
7,4	0,272	$5,326 \pm 0,361$
8,5	0,212	$4,129 \pm 0,100$
10,0	0,131	$2,062 \pm 0,010$

4.2.2.3. Fallasidinin farklı pH değerlerindeki elektrokimyasal davranışı

Farklı pH değerlerinde ve 10^{-5} M derişimindeki fallasidinin elektrokimyasal davranışları DPV yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen voltamograma göre artan pH değerlerinde yükseltgenme pik potansiyellerinin katodik bölgeye doğru kaydığı

görülmektedir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda fallasidine ait diferansiyel puls voltamogramları

Farklı pH değerlerinde elde edilen fallasidine ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri Çizelge 4.10'da gösterilmiştir. Bu verilere göre akım değerinin pH 3,0 değerinde en yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10. Farklı pH değerlerindeki fosfat tamponunda fallasidine ait yükseltgenme pik potansiyel ve akım değerleri

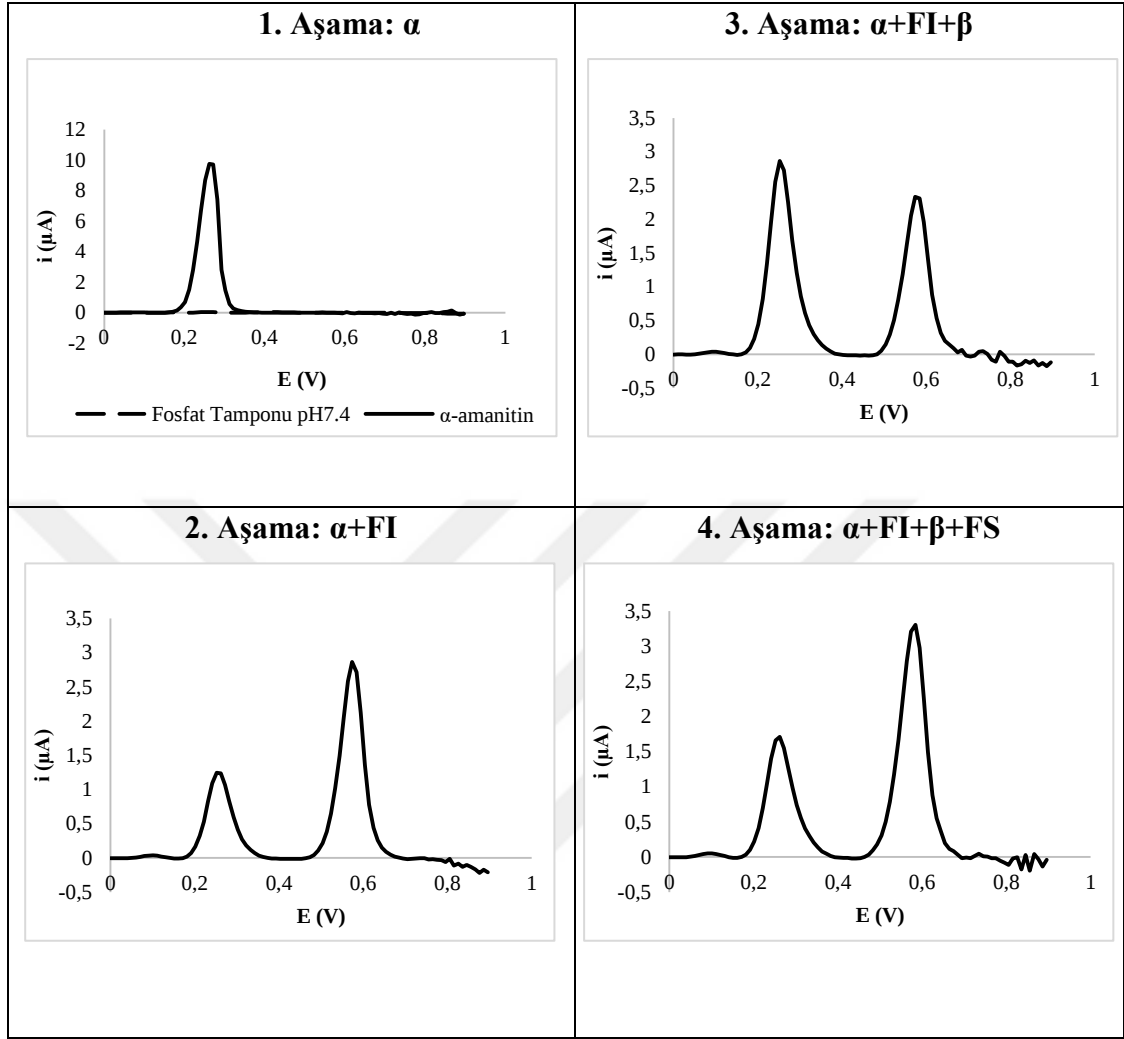
pH	Yükseltgenme potansiyeli (V)	Akım (μA)
3,0	0,745	$4,666 \pm 0,167$
4,0	0,705	$4,069 \pm 0,015$
5,0	0,665	$2,739 \pm 0,034$
6,0	0,635	$2,715 \pm 0,094$
7,4	0,554	$2,676 \pm 0,018$
8,5	0,514	$1,650 \pm 0,122$
10,0	0,433	$0,980 \pm 0,042$

Zehirli mantarların yapısında bulunan diğer siklopeptid yapıdaki toksinlerin elektrokimyasal davranışlarının incelenmesi ile elde edilen verilere göre β -amanitin ve γ -amanitin α -amanitin ile, fallasidinin ise falloidin ile aynı pH değerlerinde yakın yükseltgenme potansiyellerine sahip oldukları görülmüştür. Bu durum yapısal olarak büyük oranda benzerlik göstermelerinden kaynaklanmış ve bu toksinlerin girişim etkisi açısından risk oluşturdıklarını işaret etmiş olabilir. Ancak girişim etkisi araştırılan amatoksin ve fallotoksin üyeleri, α -amanitin ve falloidin ile benzer toksik özellikler gösterdikleri için birlikte tayin edilmeleri de yine amatoksin ve fallotoksin varlığını araştırma konusunda yararlı bir bilgidir. Tek başlarına davranışları izlenen bu toksinlerin sonraki aşamalarda bir arada tayinleri de gerçekleştirilmiştir. Ayrı ayrı incelenmelerinin bir ön bilgi olarak fayda sağladığı düşünülmüştür.

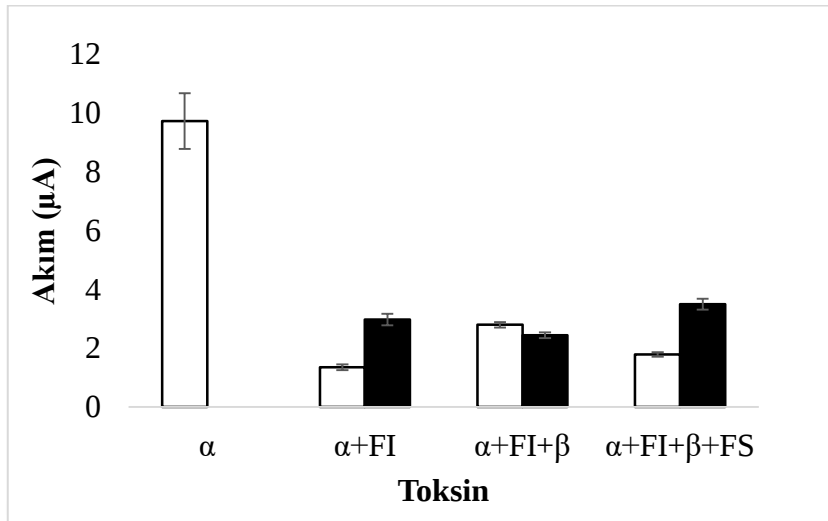
4.2.2.4. Zehirli mantarlarda bulunan diğer bazı toksinlerin α -amanitin ve falloidin toksinlerinin DPV yöntemi ile tayinine etkisi

Bu aşamada ölümcül mantar zehirlenmelerine neden olan türlerin yapısında bulunan diğer toksinlerin α -amanitin ve falloidin toksinleri ile bir aradayken tayin açısından ne tür bir etki oluşturdıklarını incelemek amacıyla toksin karışımlarının davranışları DPV yöntemi ile incelenmiştir. Toksin karışımlarının elektrokimyasal davranışları, α -amanitin ve falloidin toksinlerinin sırası ile en yüksek akım cevaplarını verdiği pH 7,4 ve 3,0 değerlerinde fosfat tamponu kullanılarak izlenmiştir. Toksinler reaksiyon ortamındaki son derişimleri 10^{-5} M olacak şekilde ardışık olarak eklenmiş ve her ekleme sonrasındaki akım cevaplarındaki değişimler izlenmiştir. Örneğin α -amanitin akım cevabına diğer toksinlerin etkisi araştırılırken; 10^{-5} M α -amanitin içeren pH değeri 7,4 olan fosfat tamponuna sırasıyla falloidin, β -amanitin ve fallasidin eklenerek her aşamada ölçüm yapılmıştır. Falloidin için de benzer olarak pH 3,0 değerinde falloidin içeren fosfat tamponu ortamında sırayla α -amanitin, β -amanitin ve fallasidin eklenmiş ve her aşamada ölçüm yapılmıştır.

pH 7,4 ve 3,0 değerlerindeki fosfat tamponunda toksin karışımları ile gerçekleştirilen araştırmalarda elde edilen voltamogramlar Şekil 4.14 ve 4.16'da, akım cevapları ise Şekil 4.15 ve 4.17 ile Çizelge 4.11 ve 4.13'te ifade edilmiştir.



Şekil 4.14. pH 7,4 değerinde hazırlanan toksin karışımından elde edilen voltamogramlar (α : α -amanitin, FI: Falloidin, β : β -amanitin, FS: Fallasidin)



Şekil 4.15. pH 7,4 değerinde hazırlanan toksin karışımından elde edilen akım cevap değişimleri (α : α -amanitin, FI: Falloidin, β : β -amanitin, FS: Fallasidin)

Çizelge 4.11. pH 7,4 değerinde hazırlanan toksin karışımından elde edilen pik potansiyelleri ve akım değerleri (α : α -amanitin, FI: Falloidin, β : β -amanitin, FS: Fallasidin)

Toksin	Yükseltgenme potansiyeli (V)	Akım (μ A)
α	0,262	9,734 $\pm$ 0,945
α +FI	0,252	1,360 $\pm$ 0,099
	0,574	2,980 $\pm$ 0,197
α +FI+ β	0,252	2,802 $\pm$ 0,094
	0,574	2,446 $\pm$ 0,099
α +FI+ β +FS	0,262	1,793 $\pm$ 0,075
	0,584	3,497 $\pm$ 0,186

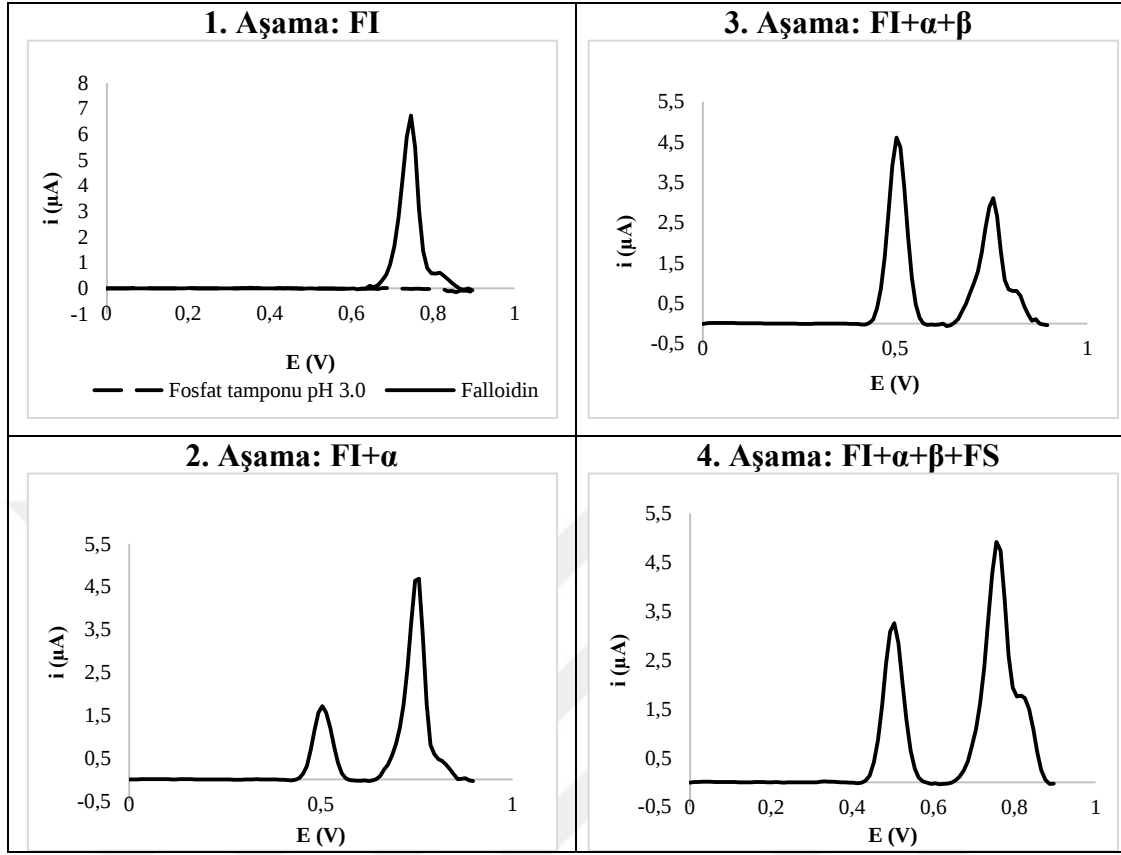
α -amanitin akım cevabındaki yüzde değişimin izlenmesi amacıyla pH 7,4 değerindeki fosfat tamponunda α amanitine ait akım cevabı 100 olarak kabul edilmiştir. Daha sonra toksin karışımı oluşturulurken her aşamada elde edilen, α -amanitin yükseltgenme potansiyelinde bulunan pikin akım cevabı değişimi % olarak hesaplanmış ve $\pm$ standart sapma değerleri ile birlikte Çizelge 4.12’de sunulmuştur. Benzer şekilde,

falloidin için de akım cevabındaki yüzde değişim miktarı hesaplanmıştır.

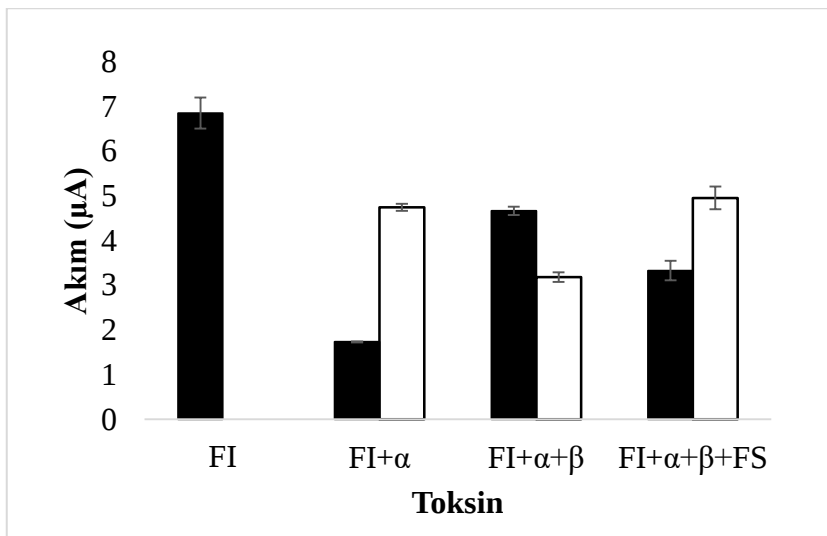
Çizelge 4.12. pH 7,4 fosfat tamponunda α -amanitine ait akım cevabının karışımın farklı aşamalarındaki % değişimi

	% akım cevabı
α	100
α +Fl	$13,972 \pm 1,012$
α +Fl+ β	$28,782 \pm 0,966$
α +Fl+ β +FS	$18,420 \pm 0,772$

Bu aşamada elde edilen veriler pH 7,4 değerindeki fosfat tamponu ortamında α -amanitin akım cevabının ortama falloidin eklenmesiyle birlikte dramatik bir düşüş gösterdiğini ortaya çıkarmıştır. Falloidin ilave edildikten sonra alınan akım cevabı pH 7,4 değerinde yalnız falloidin var iken alınan akım cevabı ile neredeyse aynıdır. Ortama β -amanitin ilave edilmesiyle beraber amatoksinlerin yükseltgenme bölgesinde bulunan pikin yüksekliğinde bir artış görülmüştür. Fallasidin ilave edildikten sonra ise benzer artış fallotoksin yükseltgenme bölgesinde bulunan pikte gözlemlenmiştir.



Şekil 4.16. pH 3,0 değerinde hazırlanan toksin karışımından elde edilen voltamogramlar (FI: Falloidin, α : α -amanitin, β : β -amanitin, FS: Fallasidin)



Şekil 4.17. pH 3,0 değerinde hazırlanan toksin karışımından elde edilen akım cevap değişimleri (FI: Falloidin, α : α -amanitin, β : β -amanitin, FS: Fallasidin)

Çizelge 4.13. pH 3,0 değerinde hazırlanan toksin karışımından elde edilen pik potansiyelleri ve akım değerleri (FI: Falloidin, α : α -amanitin, β : β -amanitin, FS: Fallasidin)

Toksin	Yükseltgenme potansiyeli (V)	Akım (μ A)
FI	0,745	$6,851 \pm 0,347$
FI+ α	0,504	$1,731 \pm 0,010$
	0,755	$4,741 \pm 0,076$
FI+ α + β	0,504	$4,663 \pm 0,095$
	0,755	$3,181 \pm 0,109$
FI+ α + β +FS	0,504	$3,326 \pm 0,217$
	0,755	$4,951 \pm 0,255$

pH 3,0 değerindeki fosfat tamponunda falloidine ait akım cevabının % değişimi $\pm$ standart sapma değerleriyle birlikte Çizelge 4.14'te sunulmuştur.

Çizelge 4.14. pH 3,0 fosfat tamponunda falloidine ait akım cevabının karışımın farklı aşamalarındaki % değişimi

Toksin	% akım cevabı
FI	100
FI+ α	$69,203 \pm 1,116$
FI+ α + β	$46,429 \pm 1,586$
FI+ α + β +Fs	$72,263 \pm 3,715$

Benzer şekilde falloidin için pH 3,0 değerindeki fosfat tamponu ortamında falloidin var iken yapılan α -amanitin ilavesi falloidine ait akım cevabını düşürmüştür. α -amanitin ilavesi ile amatoksin yükseltgenme bölgesinde oluşan akım cevabının pH 3,0 değerinde sadece α -amanitin varken verdiği cevap ile neredeyse aynı olduğu görülmüştür. Fallasidin ilavesi ile fallotoksin yükseltgenme bölgesindeki pikte bir artış gözlemlenmiştir.

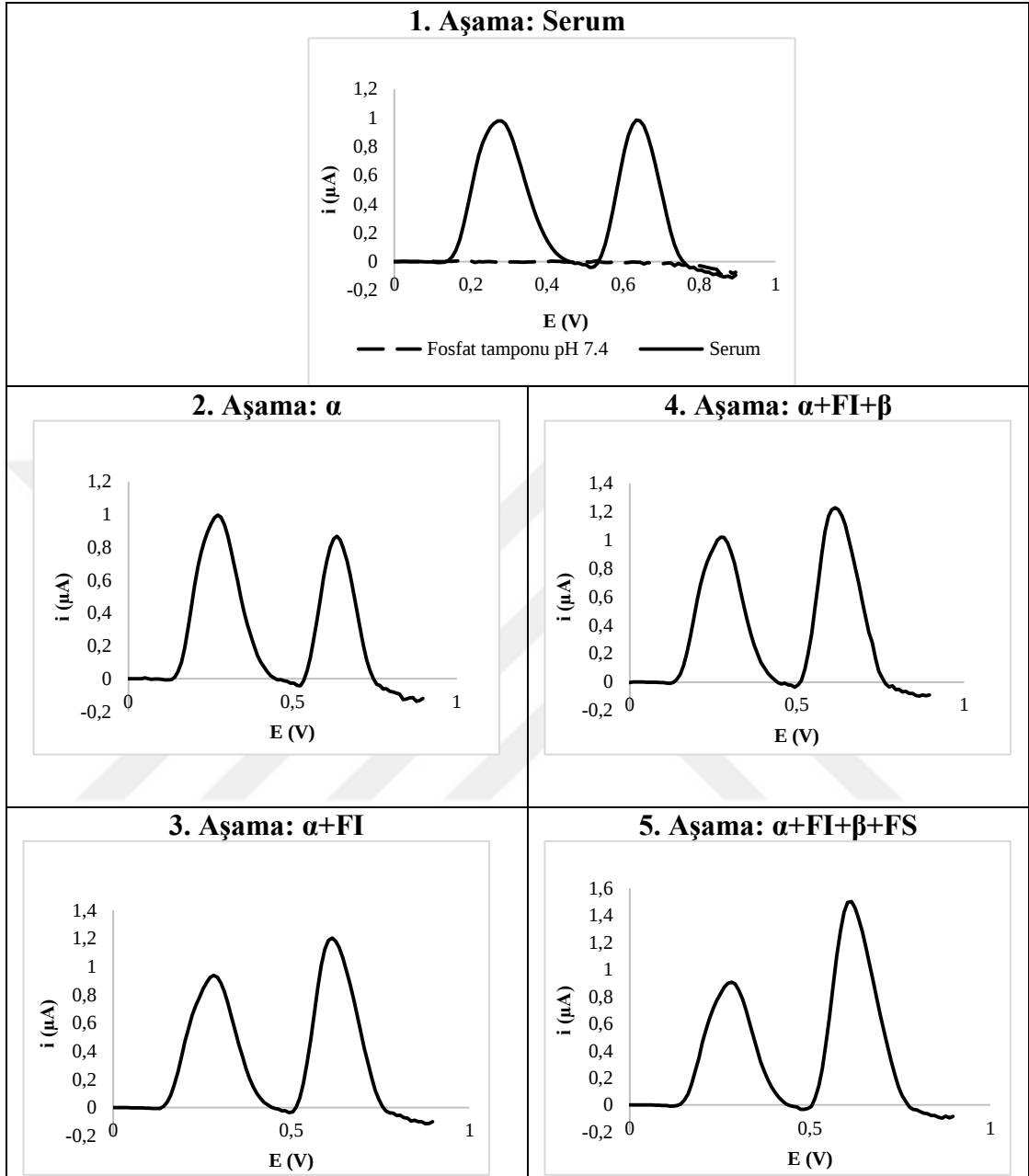
Bu veriler ışığında çalışmada kullanılan siklopeptid yapıdaki toksinlerin DPV yöntemi ile tayini sırasında birbirlerinin akım cevaplarını etkiledikleri görülmüştür. Bu etkileşimin bir nedeni de aynı kalem ucu yüzeyinde farklı analitlerin aynı anda yükseltgenmeleri olabildiği düşünülmektedir. Ancak ortama ikinci toksin olarak α -amanitin ve falloidin ilave edilmesi durumunda ortama ilk ilave edilen diğer toksinin varlığına rağmen yalnız olmaları halinde sahip oldukları akım cevabına yakın cevap vermeleri dikkat çekicidir.

4.3. Biyolojik Sıvılarda α -amanitin ve Falloidin Toksinlerinin Elektrokimyasal Tayini

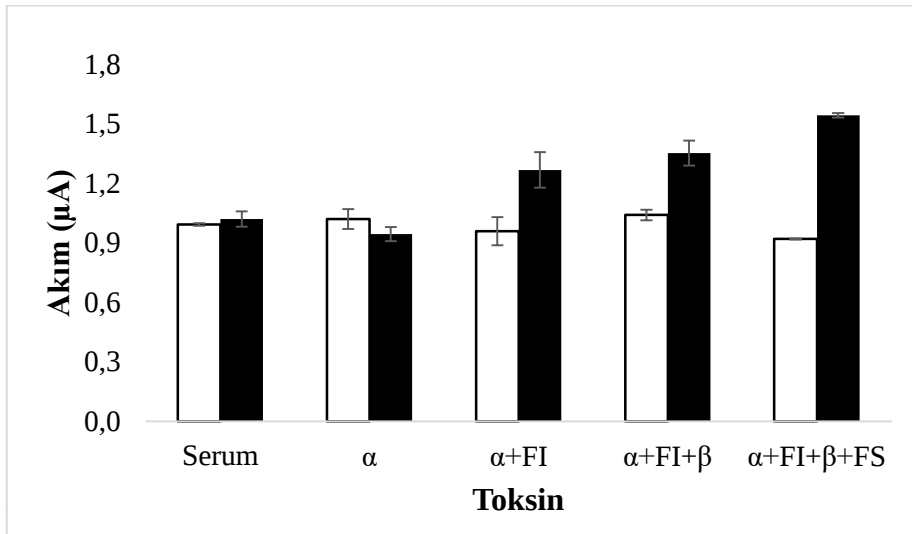
Biyolojik sıvılarda bulunan bileşenler ve zehirli mantarlarda bulunan diğer toksinler varlığında α -amanitin ve falloidin tayini yapabilmek yöntemin rutin uygulanabilir hale gelmesi için önem taşımaktadır. Bu nedenle serum ve idrar örnekleri ayrı ayrı α -amanitin ve falloidin için uygun pH değerindeki fosfat tamponu ile seyreltilerek sırayla eklenen diğer toksinler varlığında akım cevaplarındaki değişim incelenmiştir.

4.3.1. Toksinlerin serumdaki elektrokimyasal davranışı

Serum örneği 10 kat seyreltilmiş, sırasıyla α -amanitin, β -amanitin, falloidin ve fallasidin toksinleri ilave edilerek pH 7,4 ve 3,0 değerlerindeki yükseltgenme pik akım cevaplarındaki değişim incelenmiştir. Reaksiyon ortamının pH 7,4 olduğu durumda elde edilen voltamogramlar ve akım cevaplarındaki değişim sırası ile Şekil 4.18, Şekil 4.19 ve Çizelge 4.15'te sunulmuştur. pH 3,0 olduğu durumda elde edilen veriler ise Şekil 4.20, Şekil 4.21 ve Çizelge 4.16'da ifade edilmiştir.



Şekil 4.18. pH 7,4 değerinde serum ortamında hazırlanan toksin karışımından elde edilen voltamogramlar (α : α -amanitin, FI: Falloidin, β : β -amanitin, FS: Fallasidin)

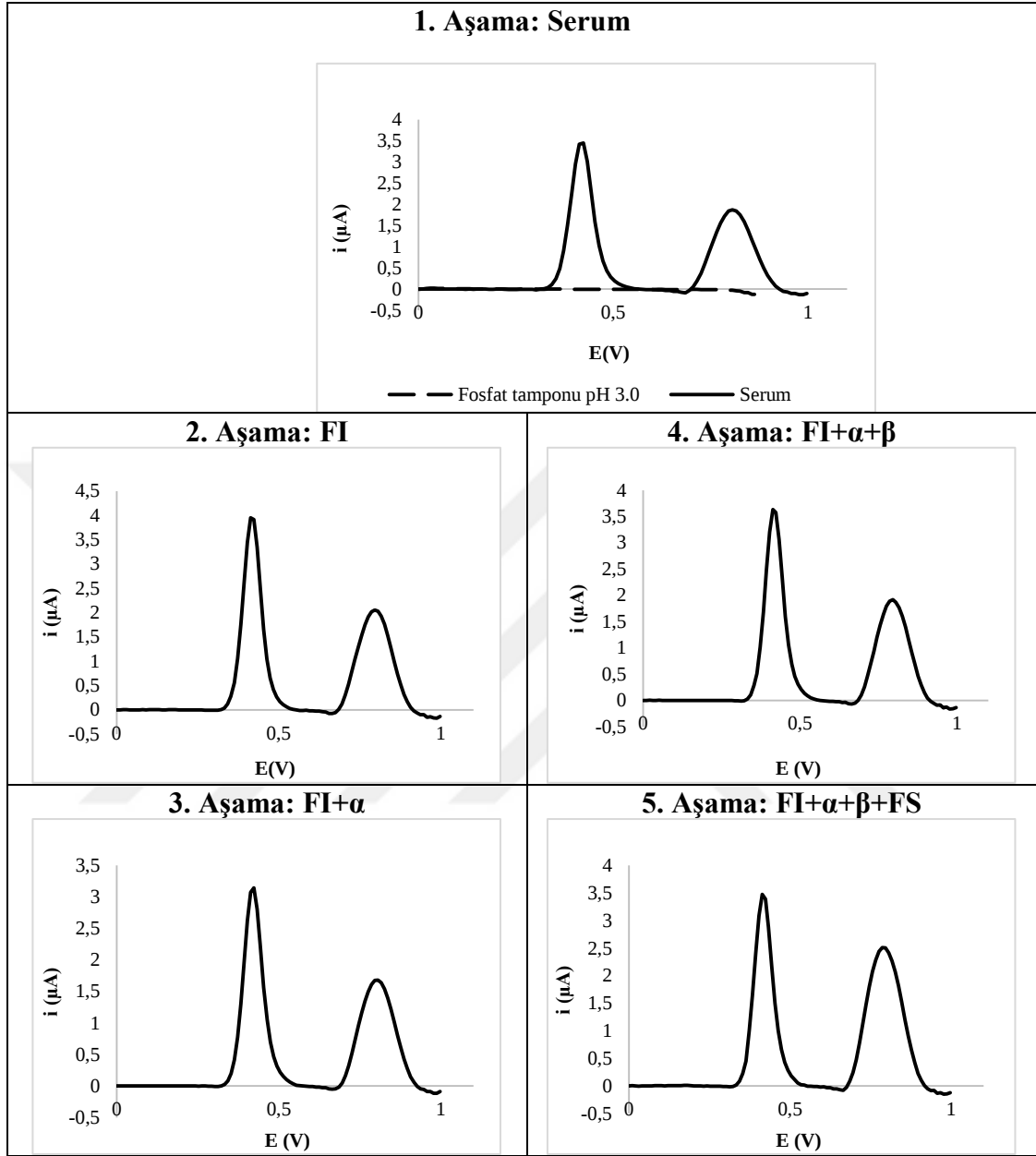


Şekil 4.19. pH 7,4 değerinde serum ortamında hazırlanan toksin karışımından elde edilen akım cevap değişimleri (α : α -amanitin, FI: Falloidin, β : β -amanitin, FS: Fallasidin)

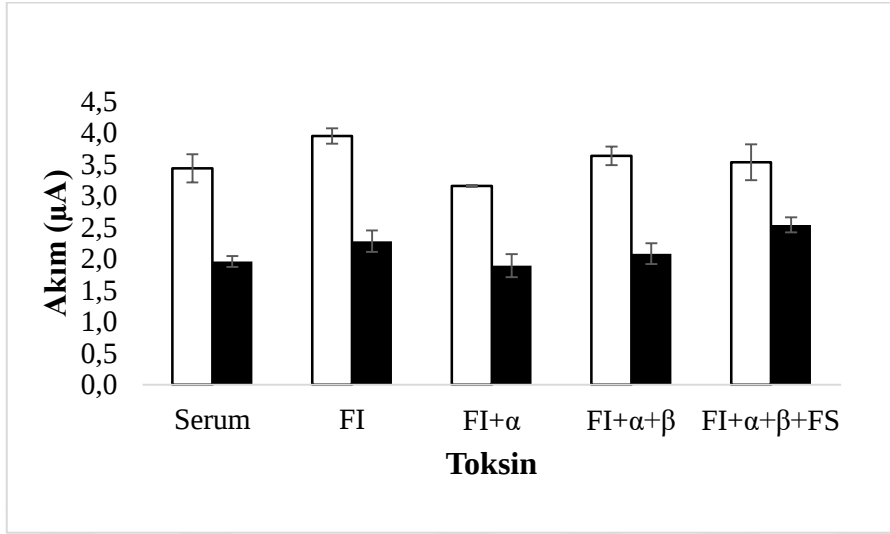
Çizelge 4.15. pH 7,4 değerinde serum ortamında hazırlanan toksin karışımına ait pik potansiyelleri ve akım cevapları (α : α -amanitin, FI: Falloidin, β : β -amanitin, FS: Fallasidin)

	Yükseltgenme potansiyeli (V)	Akım (μ A)
Serum	0,282	$0,993 \pm 0,006$
	0,635	$1,020 \pm 0,038$
α	0,272	$1,020 \pm 0,050$
	0,635	$0,944 \pm 0,036$
α +FI	0,282	$0,959 \pm 0,071$
	0,614	$1,268 \pm 0,089$
α +FI+ β	0,272	$1,041 \pm 0,027$
	0,614	$1,353 \pm 0,063$
α +FI+ β +FS	0,282	$0,919 \pm 0,003$
	0,614	$1,543 \pm 0,011$

Seyreltilmiş serum örneği ile pH 7,4 değerinde yapılan çalışmalardan elde edilen veriler amatoksinler için akım cevabında belirgin bir farklılaşma olmadığını, buna karşın fallotoksinlerde ayırt edici bir farklılık olduğunu ifade etmektedir.



Şekil 4.20. pH 3,0 değerinde serum ortamında hazırlanan toksin karışımından elde edilen voltamogramlar (FI: Falloidin, α : α -amanitin, β : β -amanitin, FS: Fallasidin)



Şekil 4.21. pH 3,0 değerinde serum ortamında hazırlanan toksin karışımından elde edilen akım cevap değişimleri (FI: Falloidin, α : α -amanitin, β : β -amanitin, FS: Fallasidin)

Çizelge 4.16. pH 3,0 değerinde serum ortamında hazırlanan toksin karışımına ait pik potansiyelleri ve akım cevapları (FI: Falloidin, α : α -amanitin, β : β -amanitin, FS: Fallasidin)

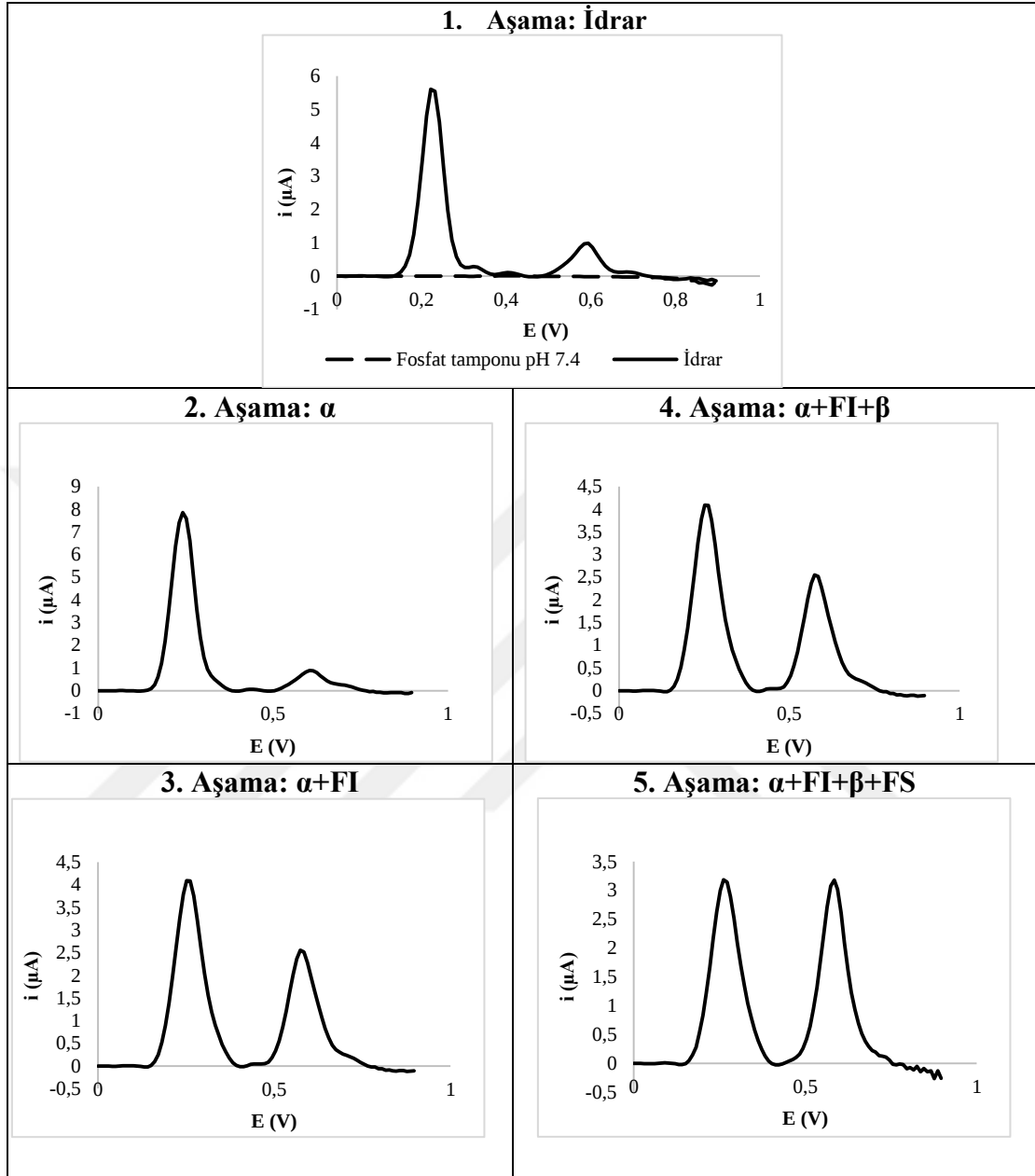
	Yükseltgenme potansiyeli (V)	Akım (μ A)
Serum	0,423	$3,439 \pm 0,224$
	0,806	$1,957 \pm 0,086$
FI	0,413	$3,954 \pm 0,120$
	0,796	$2,282 \pm 0,172$
FI+ α	0,413	$3,159 \pm 0,013$
	0,796	$1,893 \pm 0,182$
FI+ α + β	0,413	$3,639 \pm 0,149$
	0,796	$2,082 \pm 0,165$
FI+ α + β +FS	0,413	$3,536 \pm 0,287$
	0,786	$2,540 \pm 0,120$

Serum örnekleri pH 3,0 değerinde tampon ile seyreltilerek kullanıldığında her iki toksin grubu için belirgin bir akım cevap farklılığı elde edilememiştir. Her iki pH değerinde elde edilen veriler serum örneklerinde α -amanitin ve falloidinin çalışılan

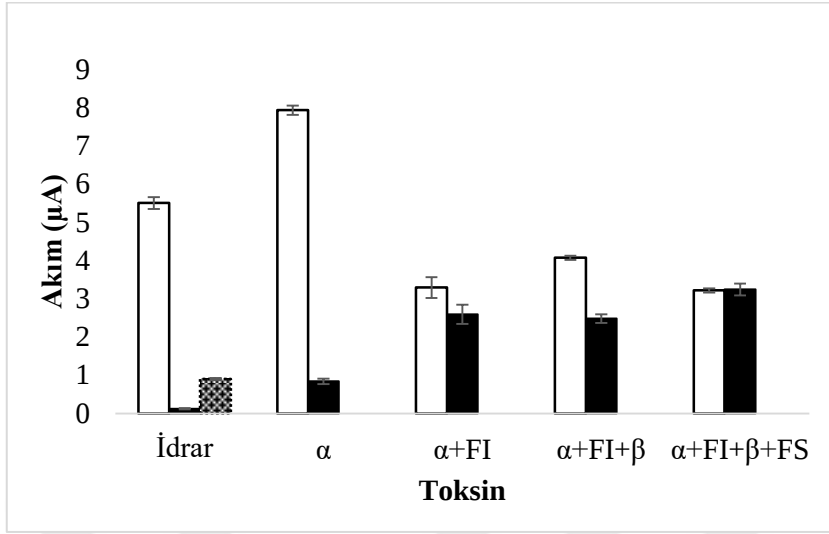
koşullar altında doğrudan güvenilir bir şekilde elektrokimyasal olarak tayin edilmesinin mümkün olmadığını göstermiştir. Toksinler için seçici bir elektrot hazırlamak veya antikör temelli olmayan diğer yöntemlerin hemen hepsinde olduğu gibi ölçüm öncesi bir ekstraksiyon işlemi yapma gerekliliği görülmüştür.

4.3.2. Toksinlerin idrardaki elektrokimyasal davranışı

İdrar örneği 100 kat seyreltilip, α -amanitin, β -amanitin, falloidin ve fallasidin toksinleri ilave edilerek pH 7,4 ve 3,0 değerlerindeki akım cevaplarındaki değişim incelenmiştir. Reaksiyon ortamının pH 7,4 olduğu durumda elde edilen voltamogramlar ve akım cevaplarındaki değişim sırası ile Şekil 4.22, Şekil 4.23 ve Çizelge 4.17’de sunulmuştur.



Şekil 4.22. pH 7,4 değerinde idrar ortamında hazırlanan toksin karışımından elde edilen voltamogramlar (α : α -amanitin, FI: Falloidin, β : β -amanitin, FS: Fallasidin)



Şekil 4.23. pH 7,4 değerinde idrar ortamında hazırlanan toksin karışımından elde edilen akım cevap değişimleri (α : α -amanitin, FI: Falloidin, β : β -amanitin, FS: Fallasidin)

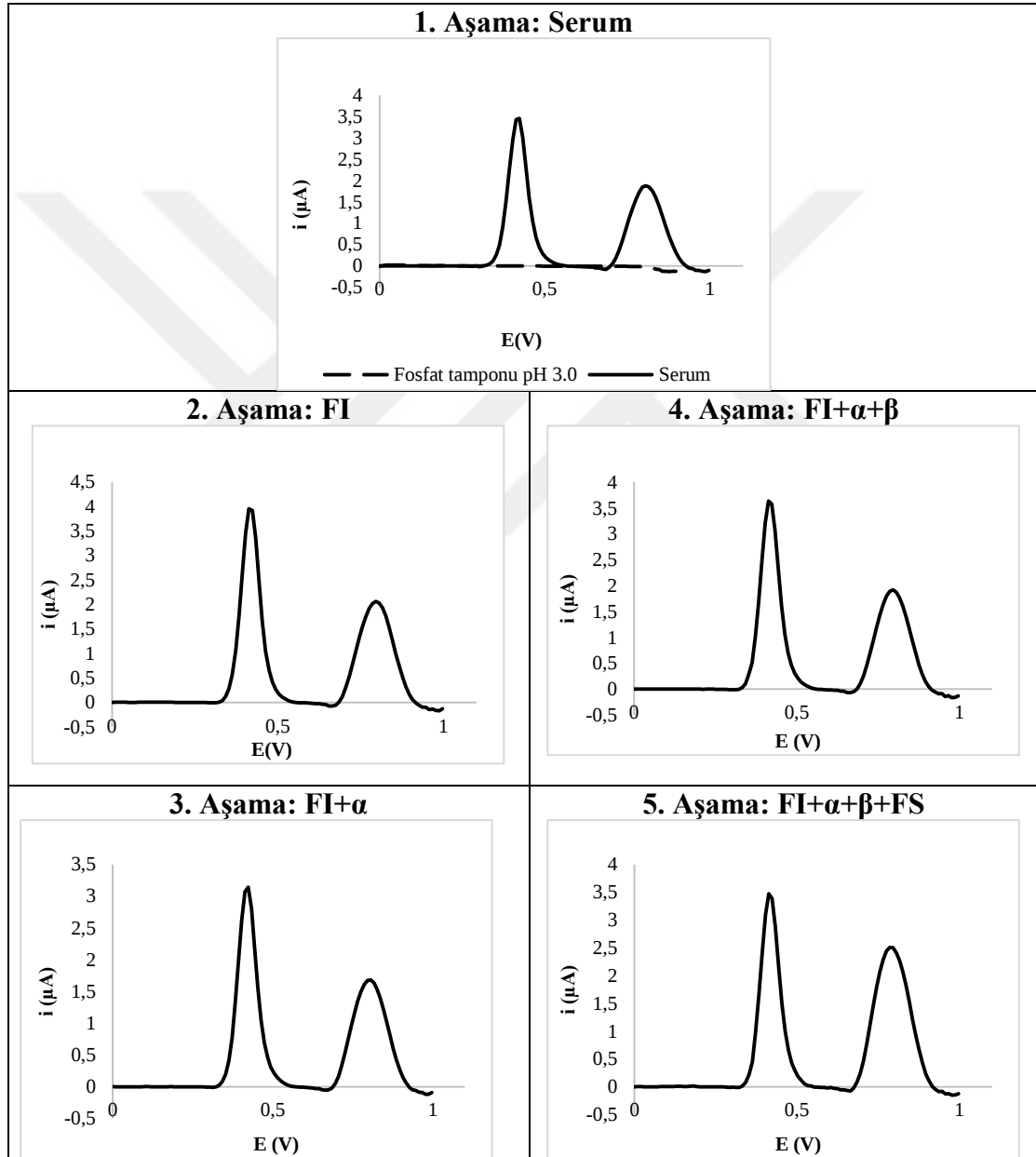
Çizelge 4.17. pH 7,4 değerinde idrar ortamında hazırlanan toksin karışımına ait pik potansiyelleri ve akım cevapları (α : α -amanitin, FI: Falloidin, β : β -amanitin, FS: Fallasidin)

	Yükseltgenme potansiyeli (V)	Akım (μ A)
İdrar	0,222	5,501 $\pm$ 0,157
	0,332	0,119 $\pm$ 0,016
	0,594	0,901 $\pm$ 0,028
α	0,242	7,930 $\pm$ 0,119
	0,604	0,841 $\pm$ 0,070
α +FI	0,252	3,292 $\pm$ 0,275
	0,574	2,592 $\pm$ 0,250
α +FI+ β	0,252	4,070 $\pm$ 0,055
	0,574	2,481 $\pm$ 0,114
α +FI+ β +FS	0,262	3,219 $\pm$ 0,054
	0,584	3,242 $\pm$ 0,155

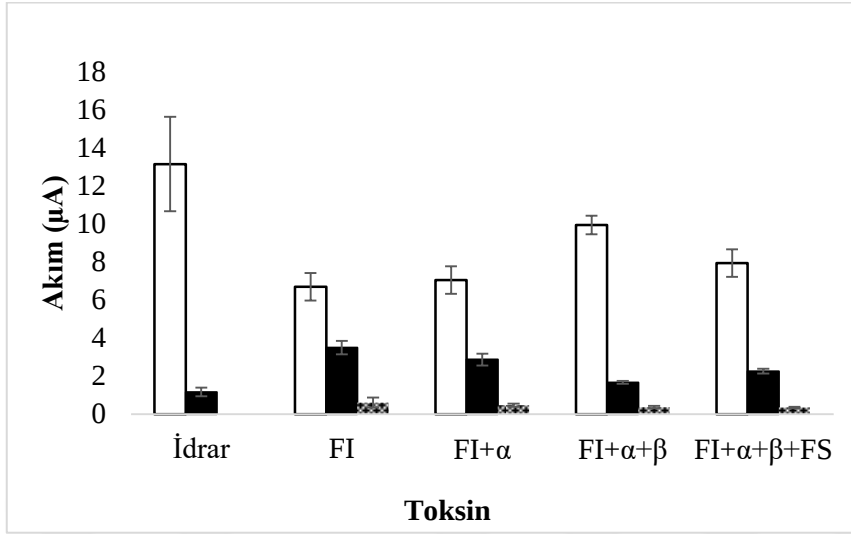
pH 7,4 değerinde fosfat tamponu ile seyreltilmiş idrar örneklerinde ortama ilave edilen amatoksin ve fallotoksinler, ortama eklendiklerinde kendi yükseltgenme

bölgelerindeki piklerin artışına neden olmuşlardır.

Seyreltilmiş idrar örneklerinde, pH 3,0 olduğu durumda toksinlerin akım cevapları değişimi ile ilgili veriler ise Şekil 4.24, Şekil 4.25 ve Çizelge 4.18’de ifade edilmiştir.



Şekil 4.24. pH 3,0 değerinde idrar ortamında hazırlanan toksin karışımından elde edilen voltamogramlar (FI: Falloidin, α : α -amanitin, β : β -amanitin, FS: Fallasidin)



Şekil 4.25. pH 3,0 değerinde idrar ortamında hazırlanan toksin karışımından elde edilen akım cevap değişimleri (FI: Falloidin, α : α -amanitin, β : β -amanitin, FS: Fallasidin)

Çizelge 4.18. pH 3,0 değerinde idrar ortamında hazırlanan toksin karışımına ait pik potansiyelleri ve akım cevapları (FI: Falloidin, α : α -amanitin, β : β -amanitin, FS: Fallasidin)

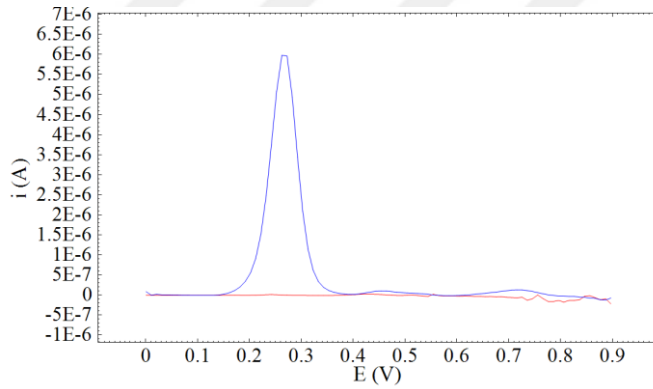
	Yükseltgenme potansiyeli (V)	Akım (μ A)
İdrar	0,504	13,157 $\pm$ 2,487
	0,846	1,162 $\pm$ 0,230
FI	0,504	6,701 $\pm$ 0,725
	0,735	3,492 $\pm$ 0,353
	0,846	0,605 $\pm$ 0,258
FI+ α	0,504	7,049 $\pm$ 0,729
	0,735	2,869 $\pm$ 0,314
	0,856	0,464 $\pm$ 0,092
FI+ α + β	0,504	9,950 $\pm$ 0,490
	0,745	1,669 $\pm$ 0,076
	0,856	0,370 $\pm$ 0,058
FI+ α + β +FS	0,504	7,947 $\pm$ 0,722
	0,755	2,257 $\pm$ 0,122
	0,826	0,344 $\pm$ 0,030

pH 3,0 değerinde fosfat tamponu ile seyreltilen idrar örneğinde de pH 7,4 değerine benzer bir durumla her iki grup toksin üyeleri de ortama ilave edildiklerinde varlıkları seyreltilmemiş idrar örneklerine oranla daha iyi görülmüştür.

4.3.3. Elektrot modifikasyonu ile elektrodun α -amanitine karşı seçiciliğinin artırılması

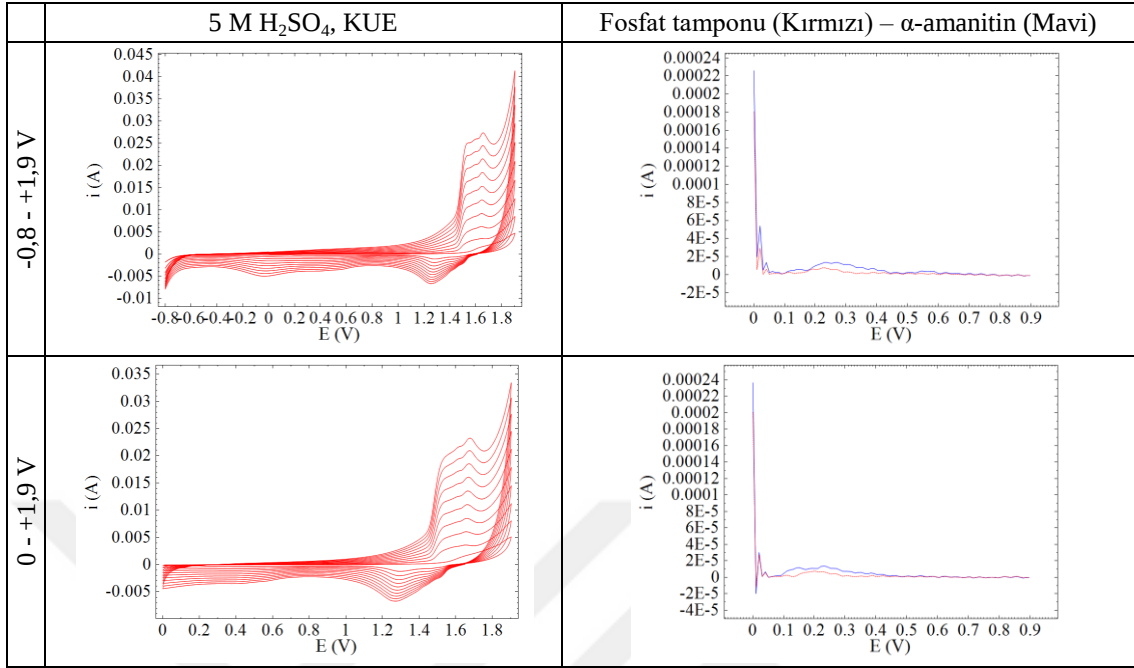
4.3.3.1. Asit ve baz çözeltileri kullanılarak kalem ucu elektroda ön işlem uygulanması

Kalem ucu elektroda asit ve baz çözeltileri ile uygulanan ön işlemin, elektrodun seçiciliği üzerine etkisi kapsamında elde edilen voltamogramlar, Şekil 4.26'da sunulan işlem görmemiş kalem ucu elektrot ile elde edilen α -amanitine ait voltamogram ile karşılaştırılarak yorumlanmıştır.

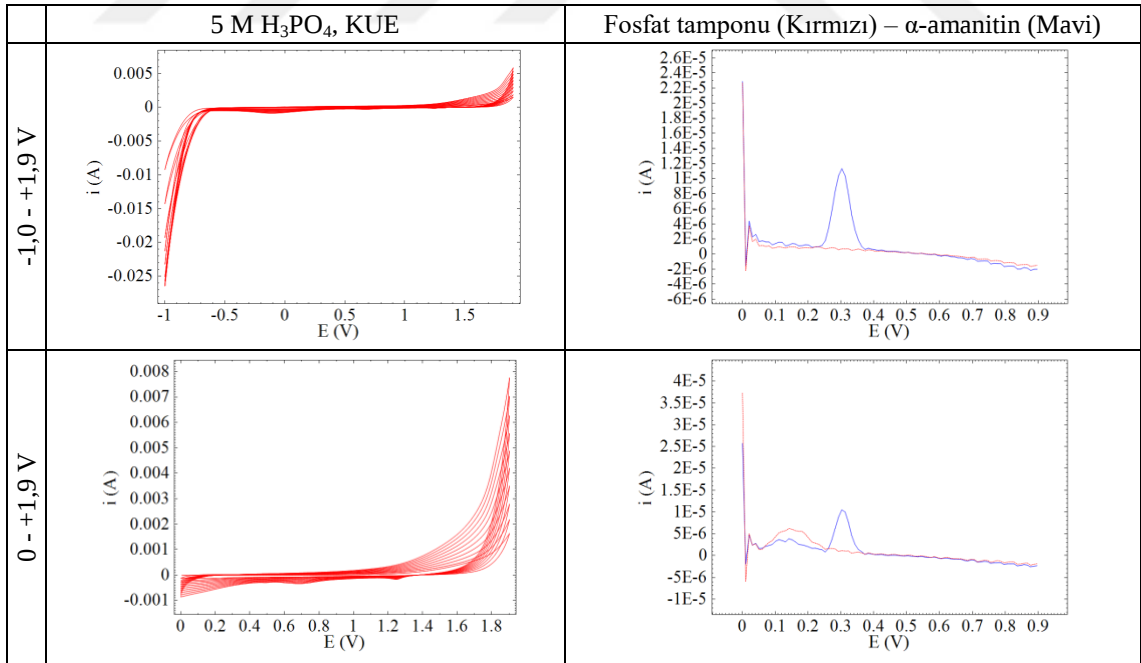


Şekil 4.26. Kalem ucu elektrot ile pH 7,4 değerinde fosfat tamponunda α -amanitine karşı elde edilen voltamogram (Kırmızı: Fosfat tamponu, Mavi: α -amanitin)

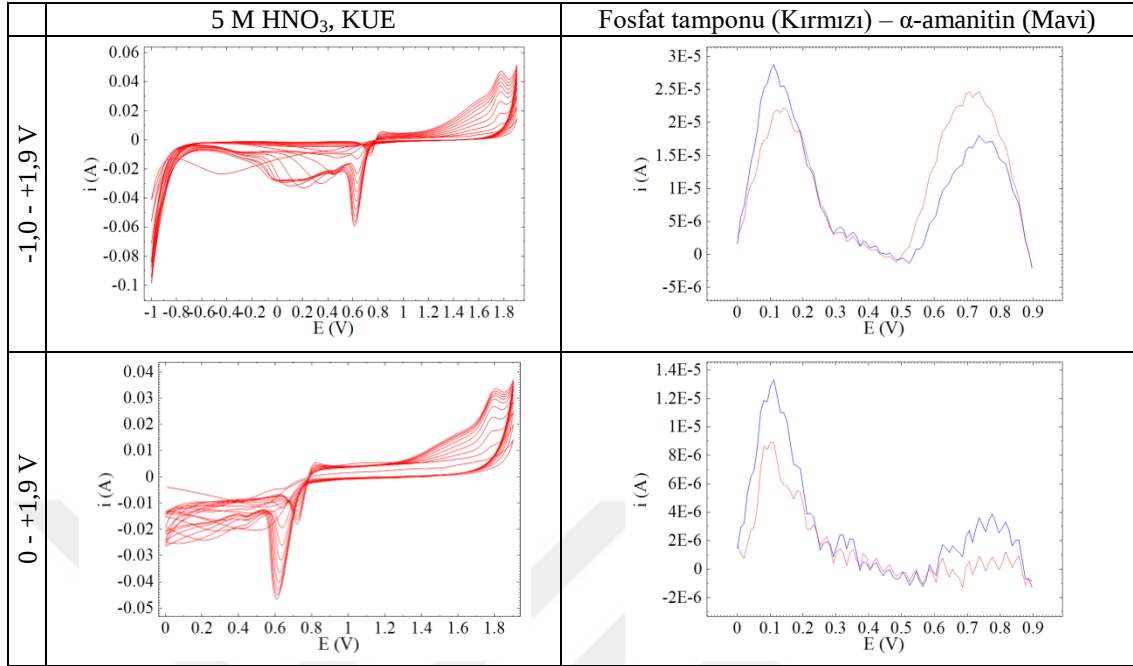
Sülfürik asit, fosforik asit, nitrik asit, asetik asit, florosülfonik asit ve sodyum hidroksit içerisinde kalem ucu elektrodun dönüşümlü voltametri yöntemi ile modifikasyonu sırasında izlenen elektrokimyasal davranışları ve fosfat tamponu içerisindeki 10^{-5} M α -amanitine karşı davranışları Şekil 4.27 – 4.32’de verilmiştir.



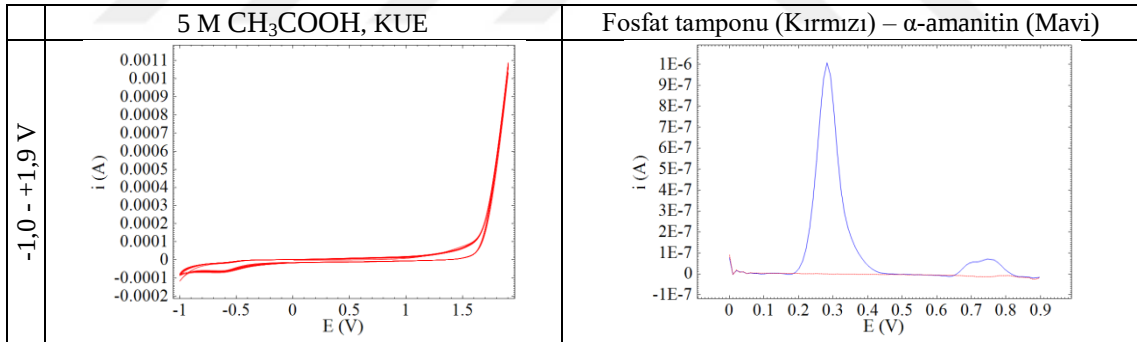
Şekil 4.27. Sülfürik asit içerisinde dönüşümlü voltametri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α-amanitin belirlenmesine etkisi



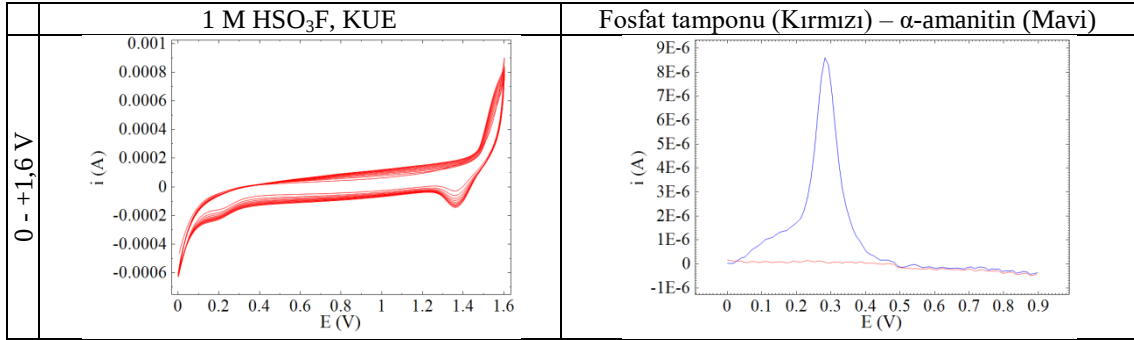
Şekil 4.28. Fosforik asit içerisinde dönüşümlü voltametri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α-amanitin belirlenmesine etkisi



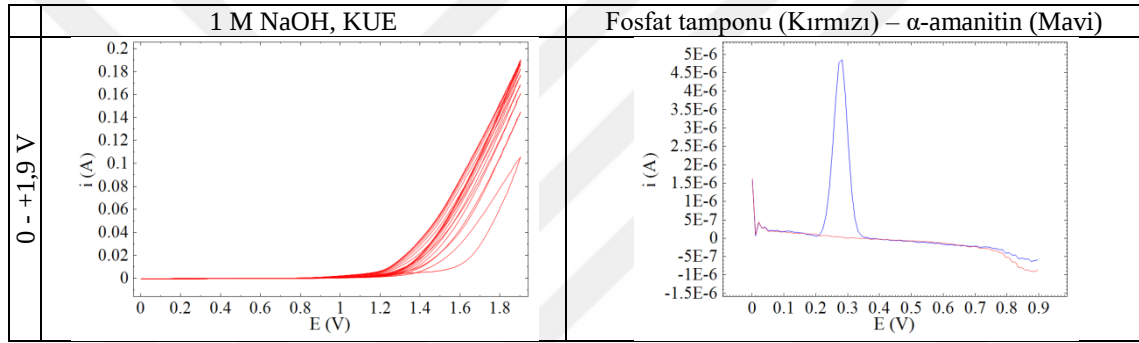
Şekil 4.29. Nitrik asit içerisinde dönüşümlü voltametri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α -amanitin belirlenmesine etkisi



Şekil 4.30. Asetik asit içerisinde dönüşümlü voltametri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α -amanitin belirlenmesine etkisi



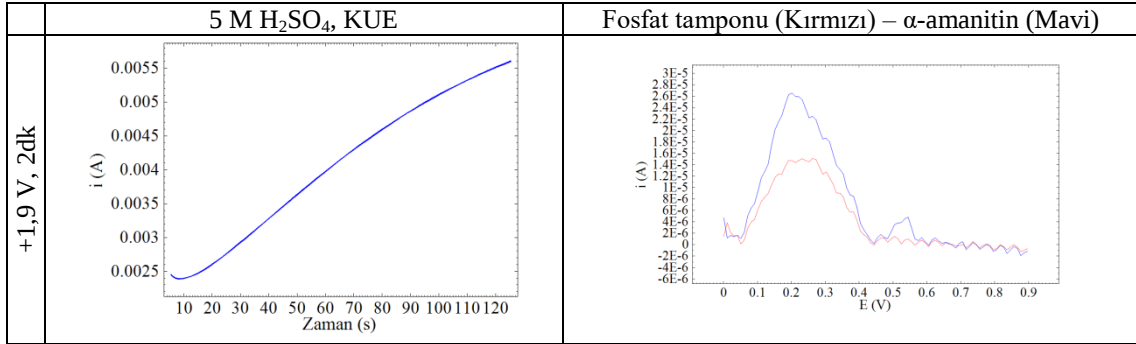
Şekil 4.31. Florosülfonik asit içerisinde dönüşümlü voltametri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α -amanitin belirlenmesine etkisi



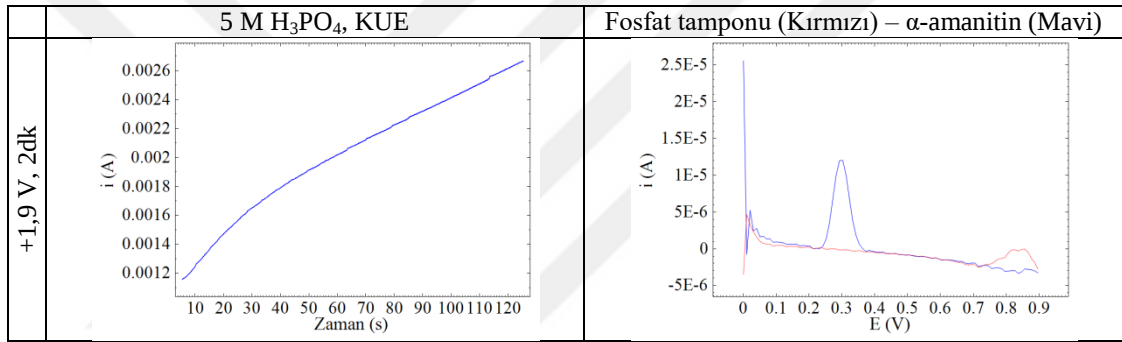
Şekil 4.32. Sodyum hidroksit içerisinde dönüşümlü voltametri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α -amanitin belirlenmesine etkisi

Asit ve baz çözeltileriyle ön işlem görmüş kalem uçlarının fosfat tamponu ortamında α -amanitin tayinine etkisine bakıldığında dönüşümlü voltametri yöntemi kullanılarak yapılan modifikasyonlarda fosforik asit, asetik asit, florosülfonik asit ve sodyum hidroksit ile işlem görmüş kalem ucu elektrotlarda α -amanitin görülebilirken, fosforik asit ile yapılan ön işleminde α -amanitine ait akım cevabı kalem ucunda elde edilen akım cevabına göre büyük oranda artmıştır.

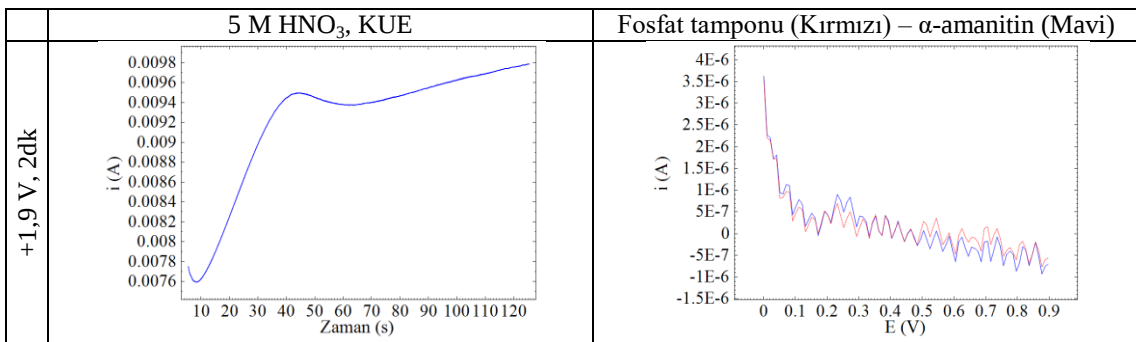
Kronoamperometrik yöntem kullanılarak yapılan kalem ucu modifikasyonu ve modifiye elektrotların 10^{-5} M amanitine karşı davranışları Şekil 4.33–4.37’de sunulmuştur.



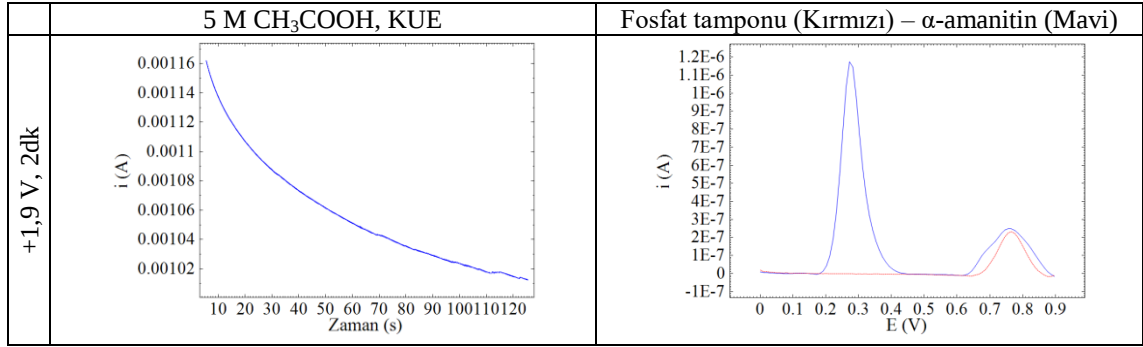
Şekil 4.33. Sülfürik asit içerisinde kronoamperometri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α-amanitin belirlenmesine etkisi



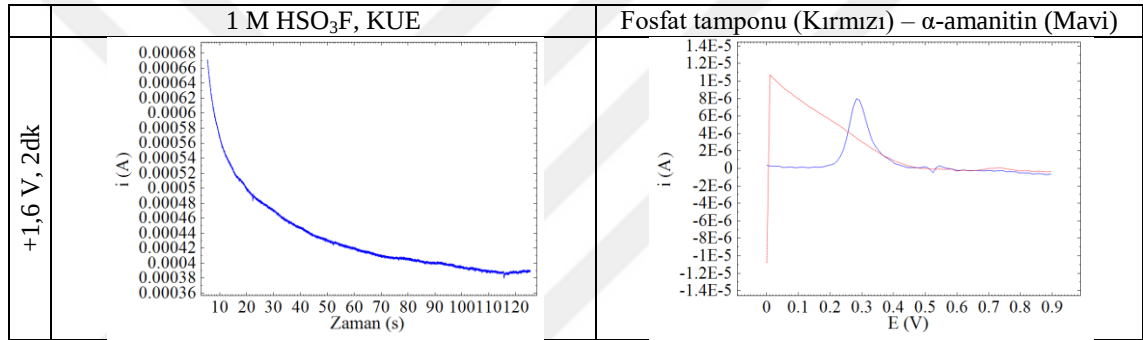
Şekil 4.34. Fosforik asit içerisinde kronoamperometri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α-amanitin belirlenmesine etkisi



Şekil 4.35. Nitrik asit içerisinde kronoamperometri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α-amanitin belirlenmesine etkisi



Şekil 4.36. Asetik asit içerisinde kronoamperometri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α-amanitin belirlenmesine etkisi

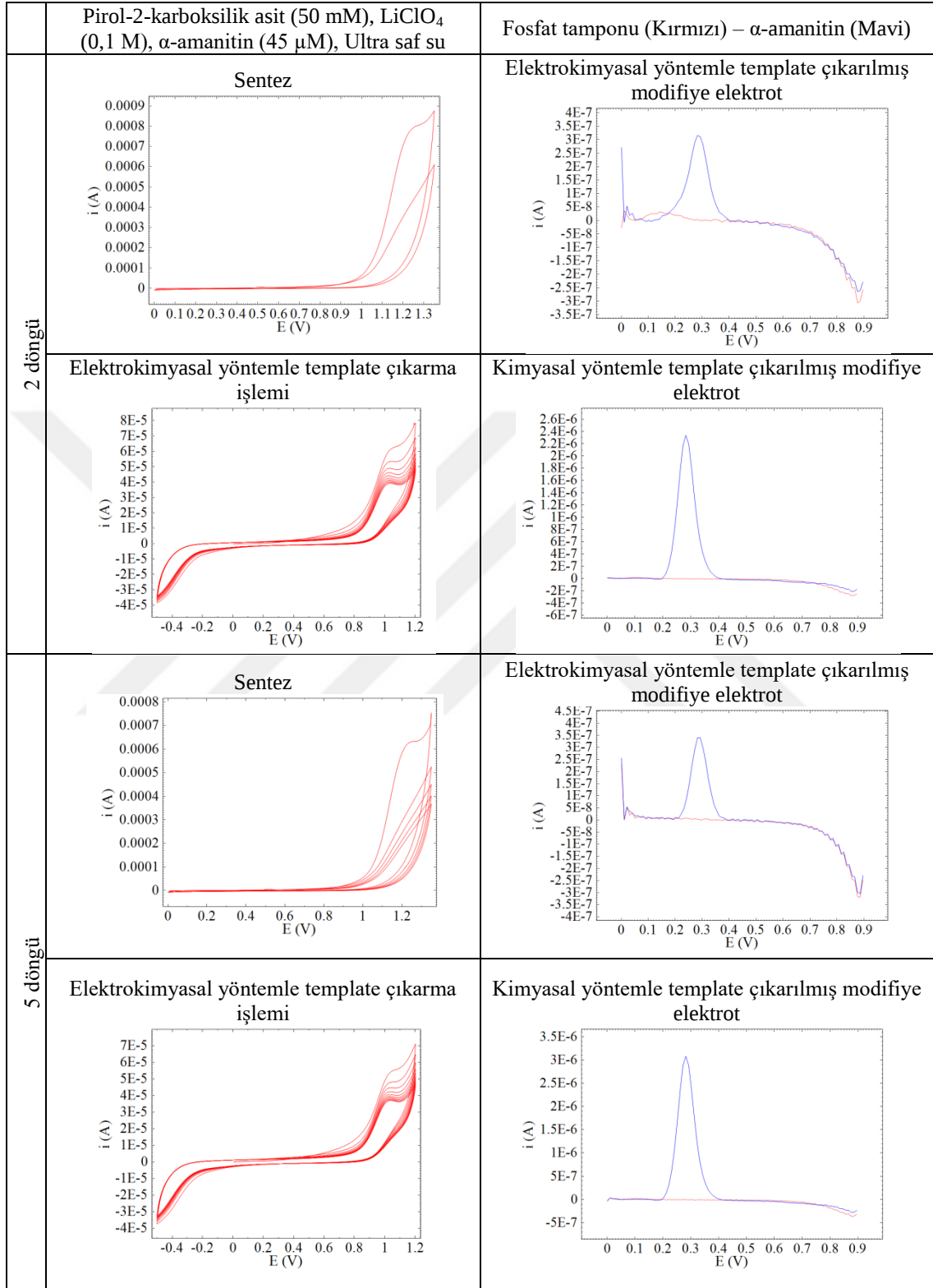


Şekil 4.37. Florosülfonik asit içerisinde kronoamperometri ile ön işlem uygulanan kalem ucu elektrodun davranışı ve α-amanitin belirlenmesine etkisi

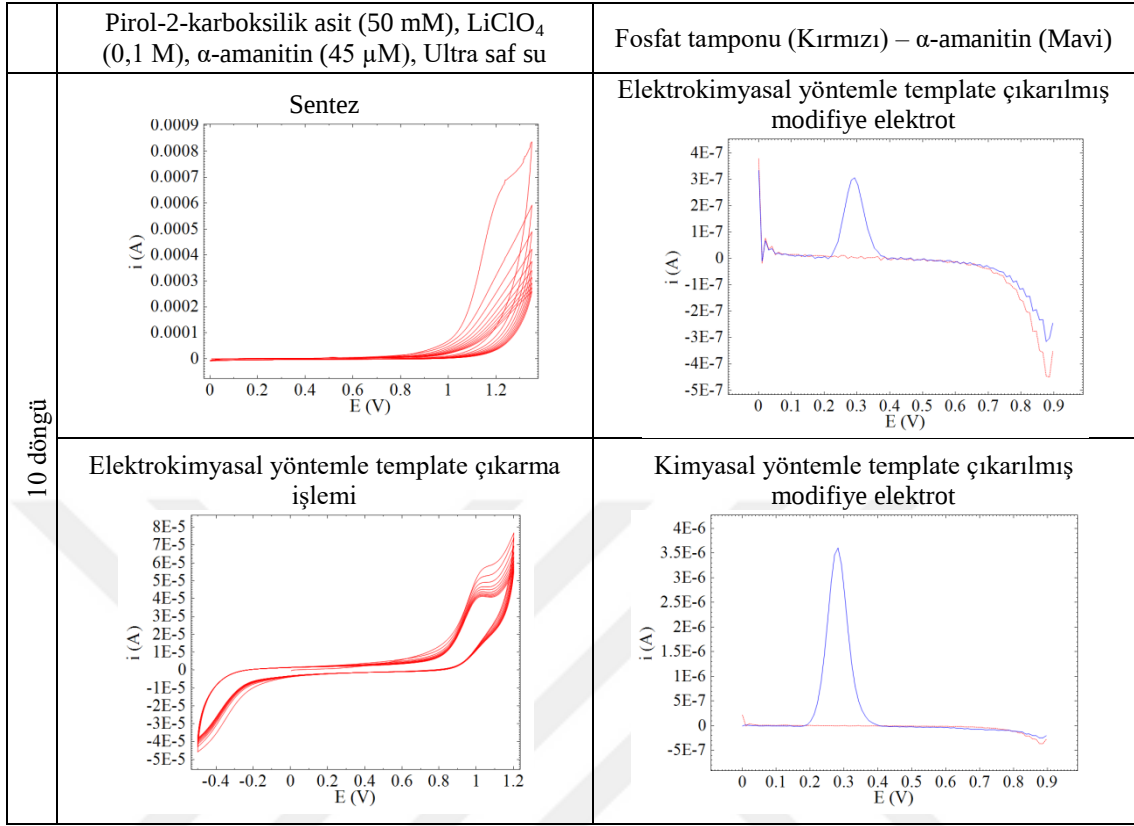
Kronoamperometrik yöntem kullanılarak uygulanan ön işlem sonrasında fosforik asit, asetik asit ve florosülfonik asitle yapılan işlem sonrası α-amanitin gözlemlenirken fosforik asitte yine akım cevabında büyük oranda artış gözlemlenmiştir.

4.3.3.2. α-amanitin tayini için moleküler baskılanmış polimer sentezi

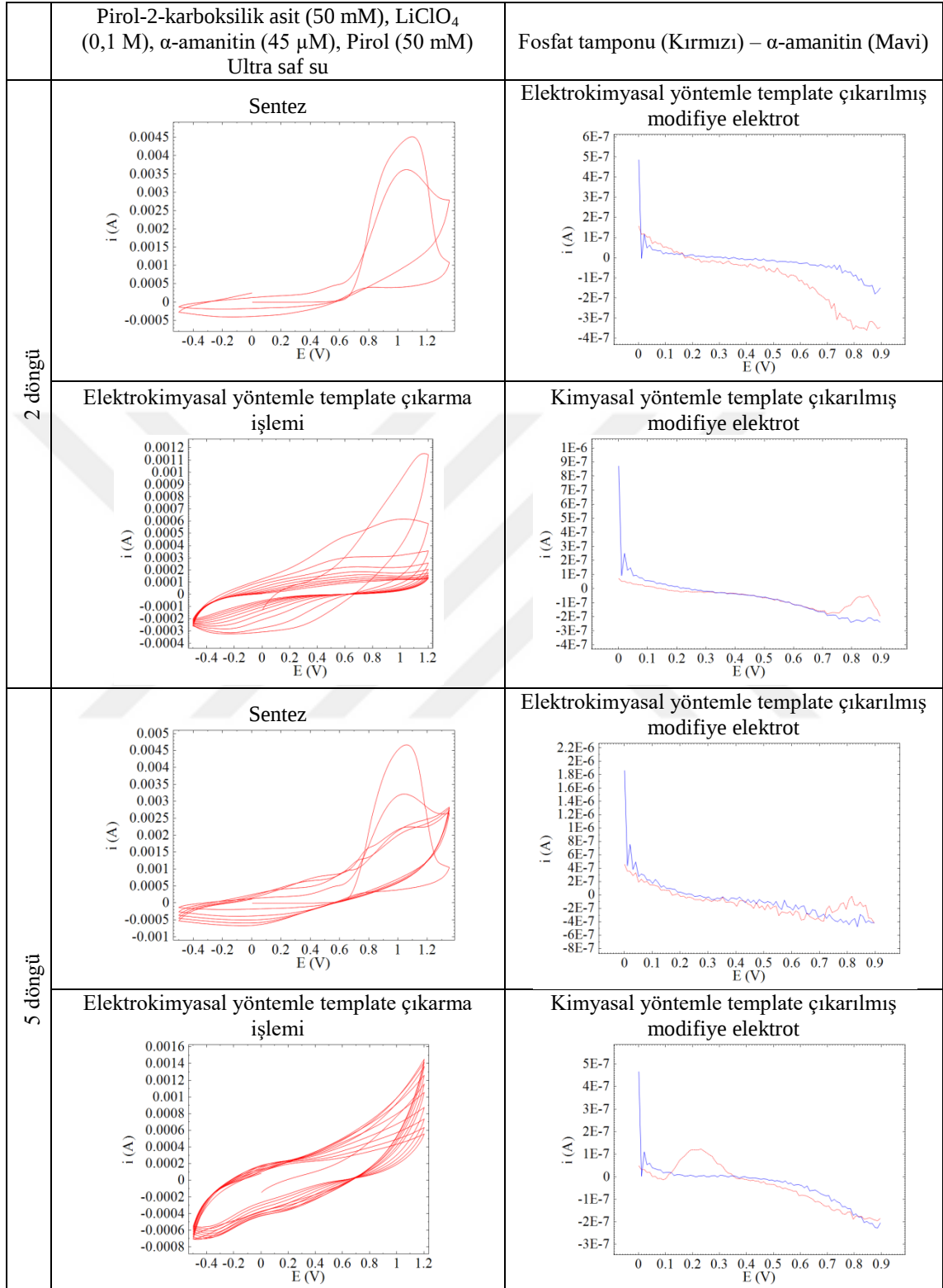
Moleküler baskılanmış elektrot ile modifiye kalem ucu elektrotlarla α-amanitin tayinine yönelik çalışmalarda elde edilen voltamogramlar Şekil 4.38–4.47’de sunulmuştur.



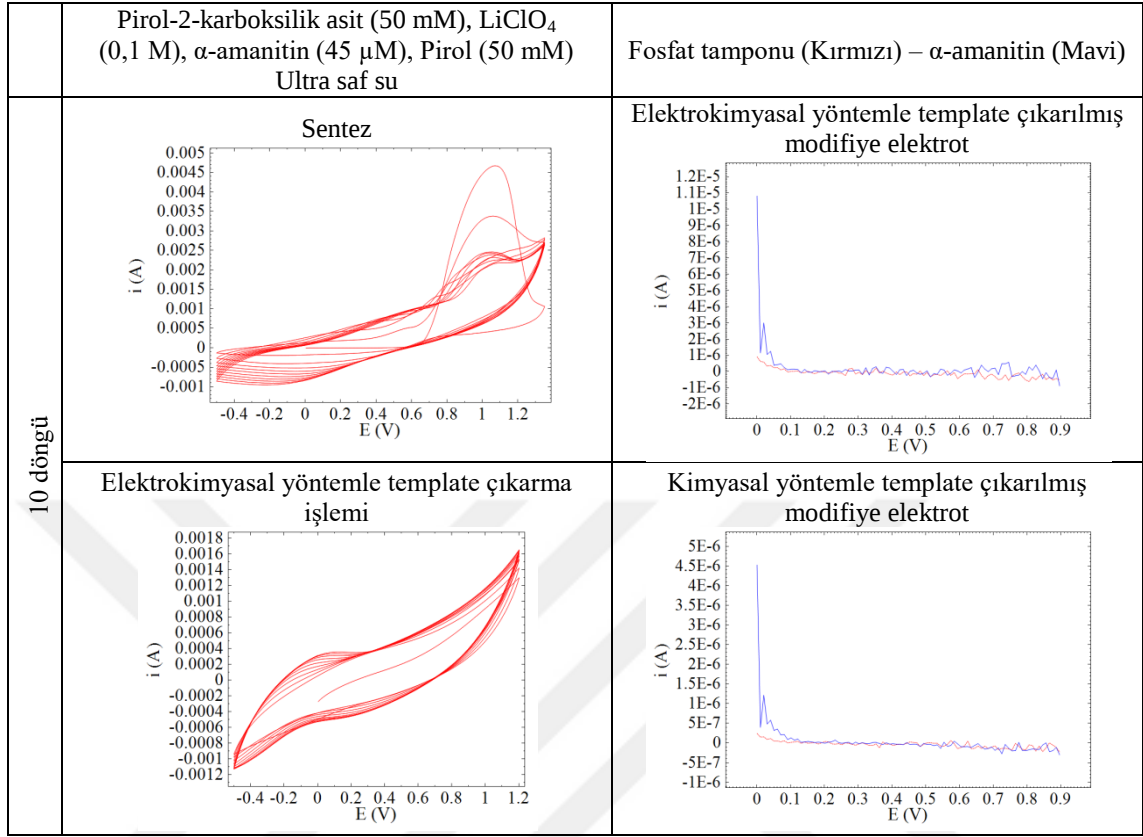
Şekil 4.38. Pirol-2-karboksilik asit ile kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitin belirlenmesine etkisi



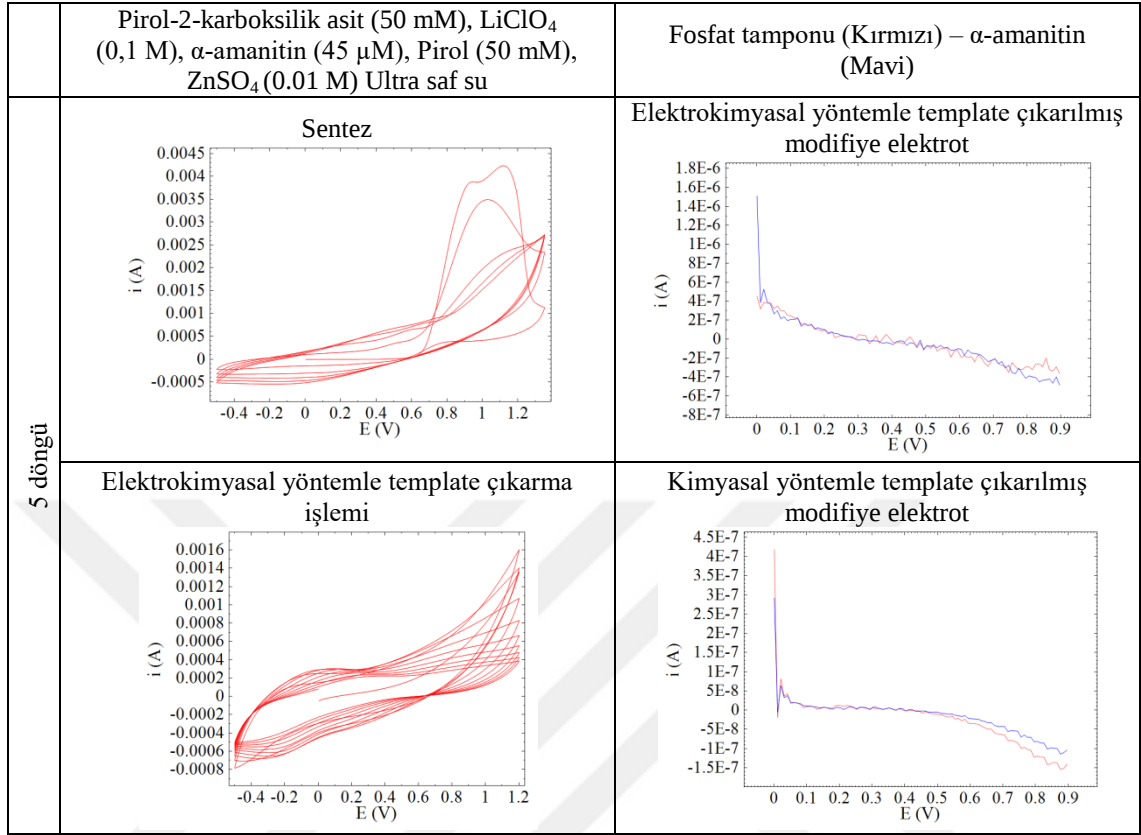
Şekil 4.38 (devam). Pirol-2-karboksilik asit ile kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitin belirlenmesine etkisi



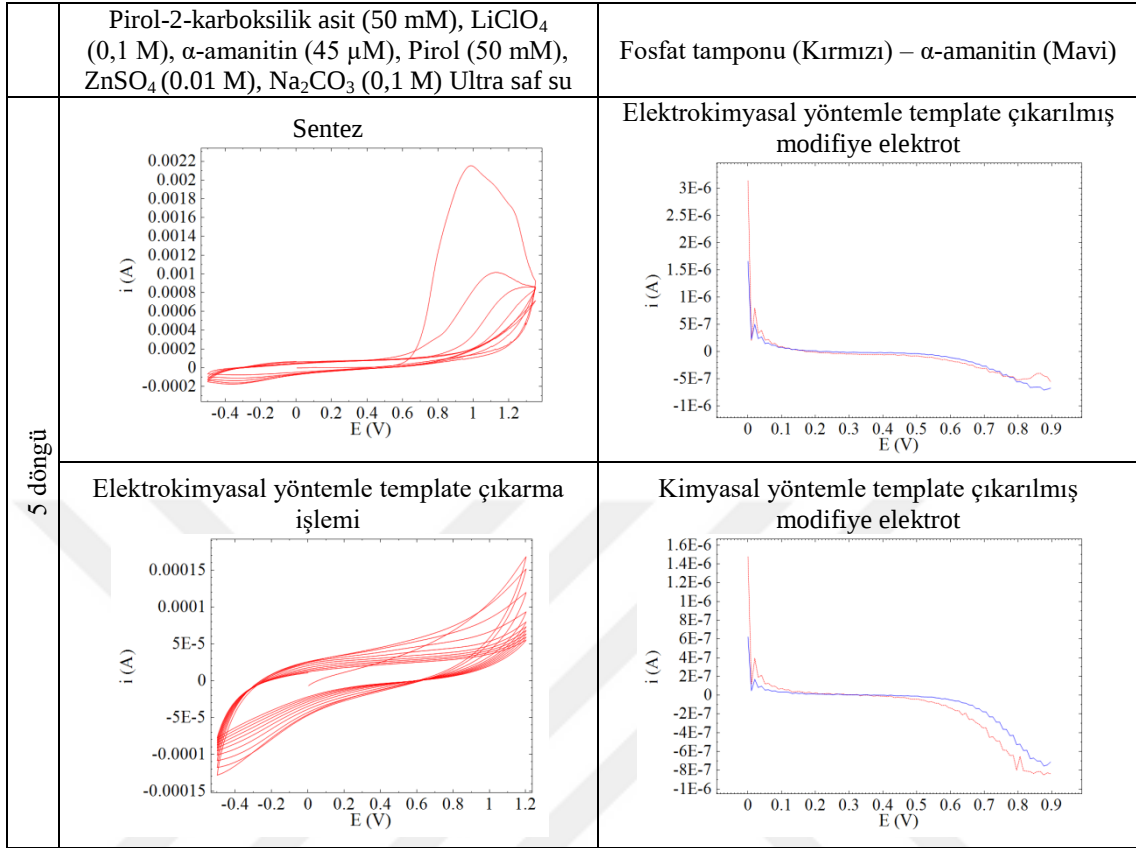
şekil 4.39. Pirol-2-karboksilik asit ve pirol varlığında kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitinin belirlenmesine etkisi



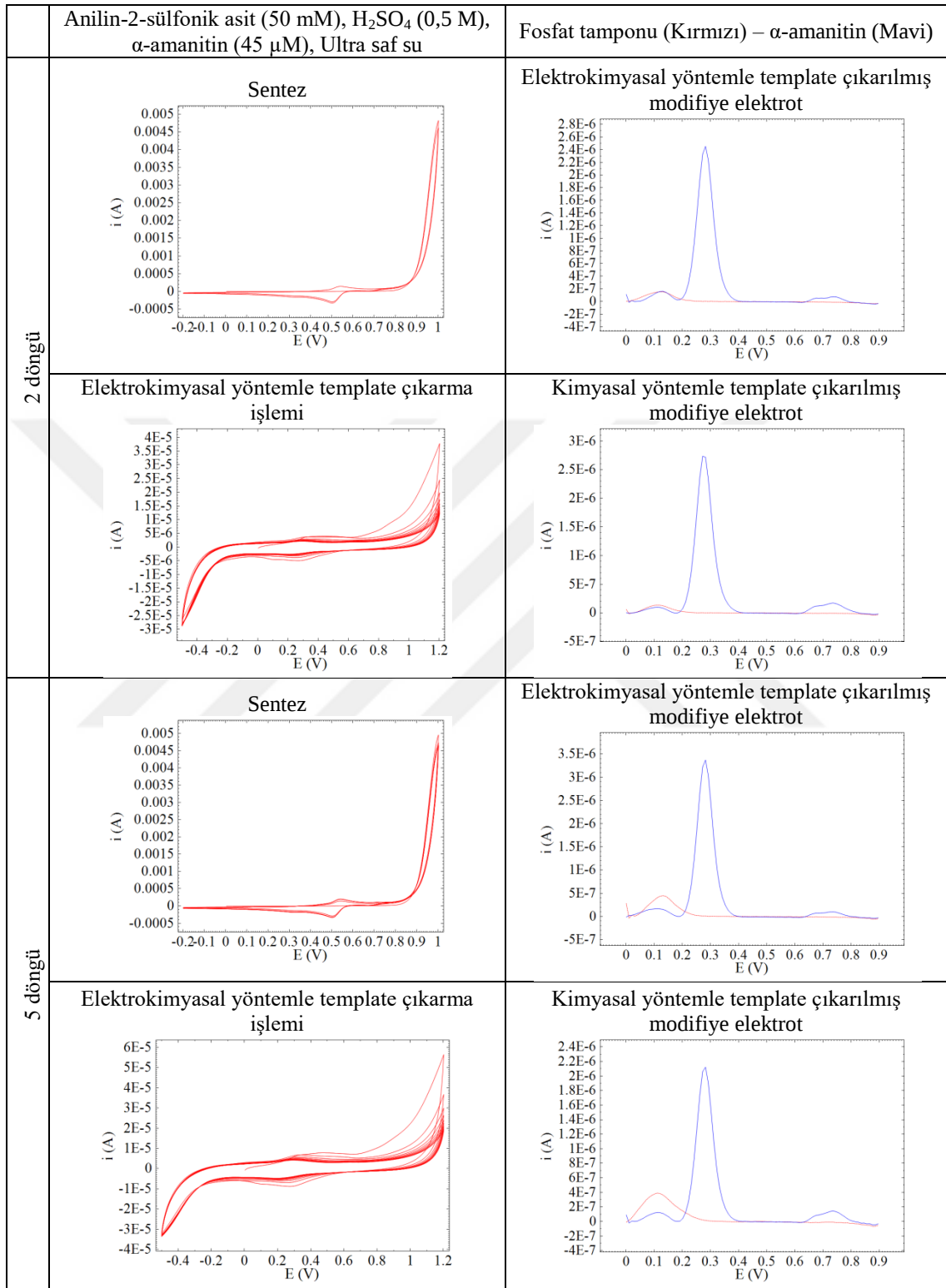
Şekil 4.39 (devam). Pirol-2-karboksilik asit ve pirol varlığında kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitin belirlenmesine etkisi



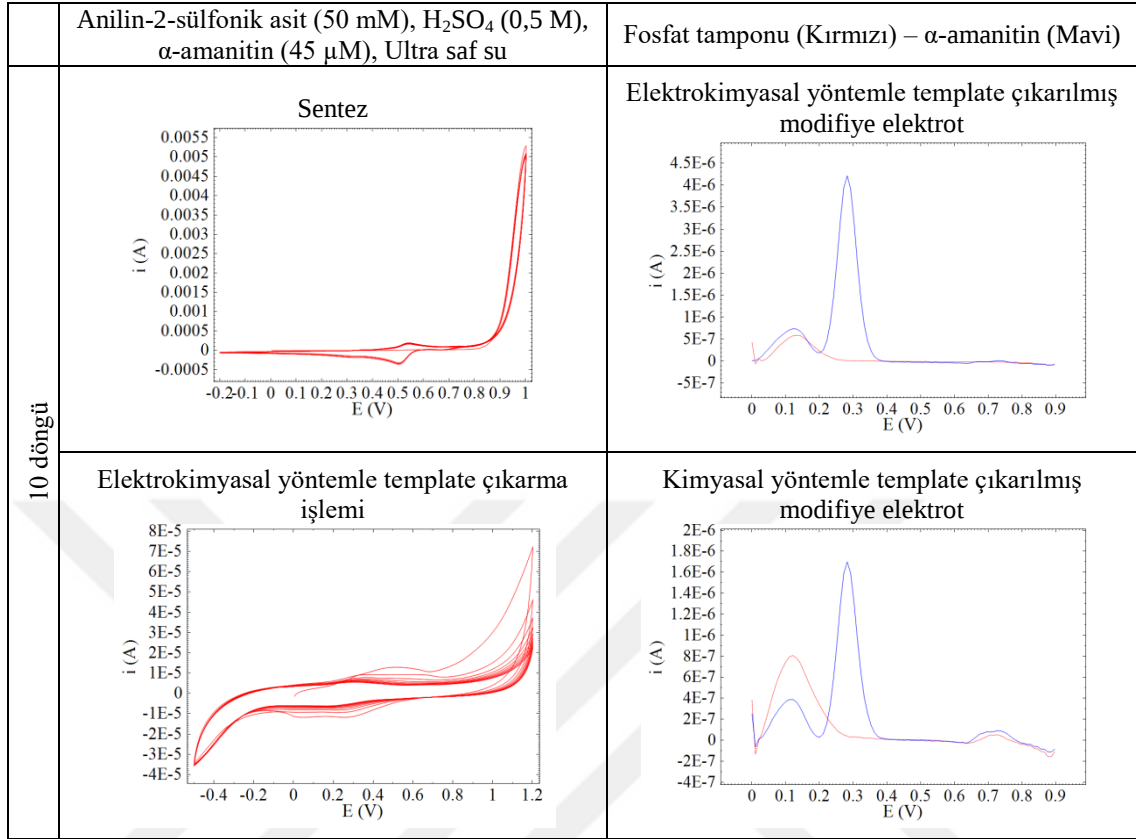
şekil 4.40. Prol-2-karboksilik asit, prol ve çinko varlığında kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitin belirlenmesine etkisi



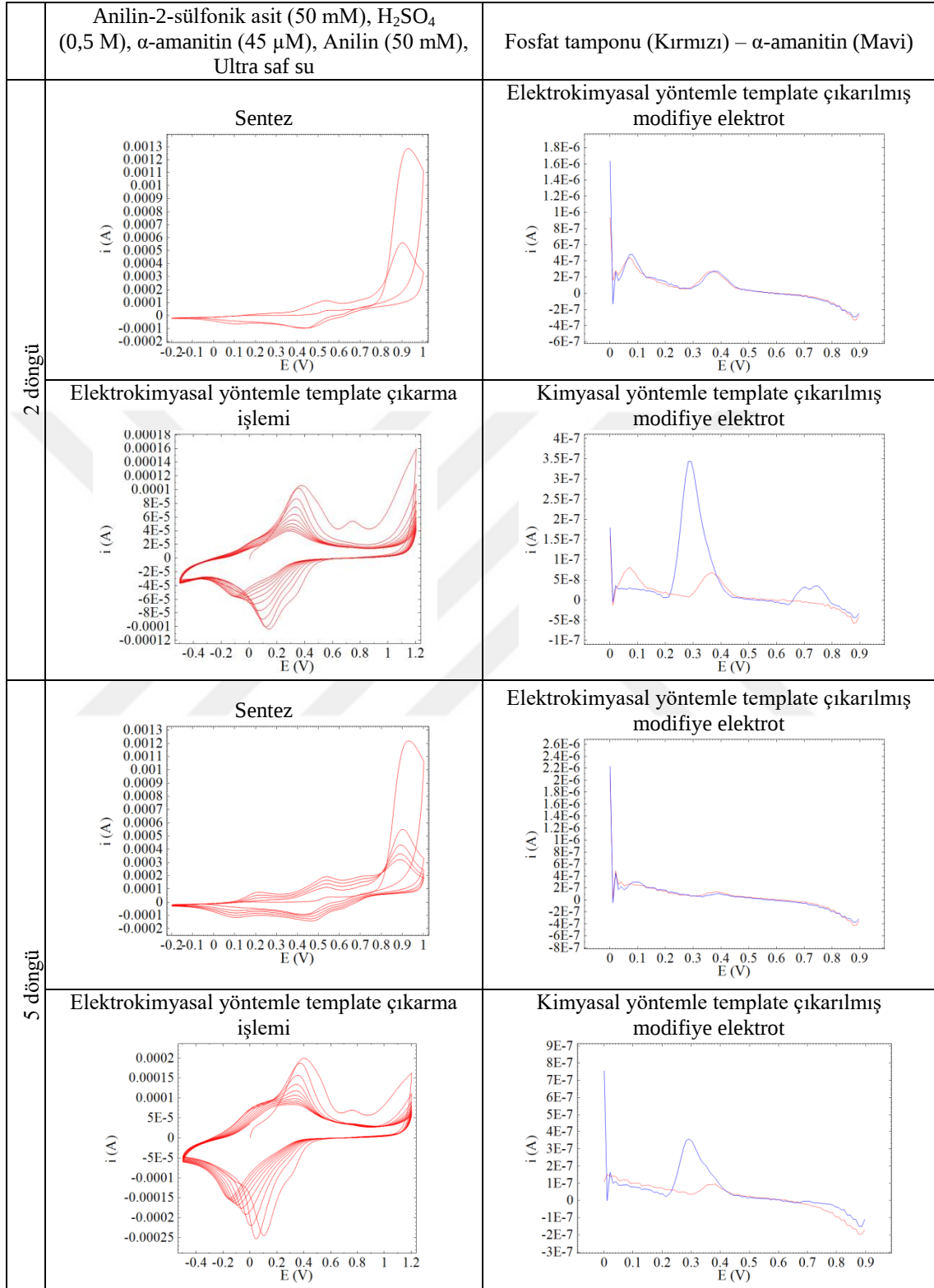
şekil 4.41. Pirol-2-karboksilik asit, pirol, çinko ve sodyum karbonat varlığında kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitin belirlenmesine etkisi



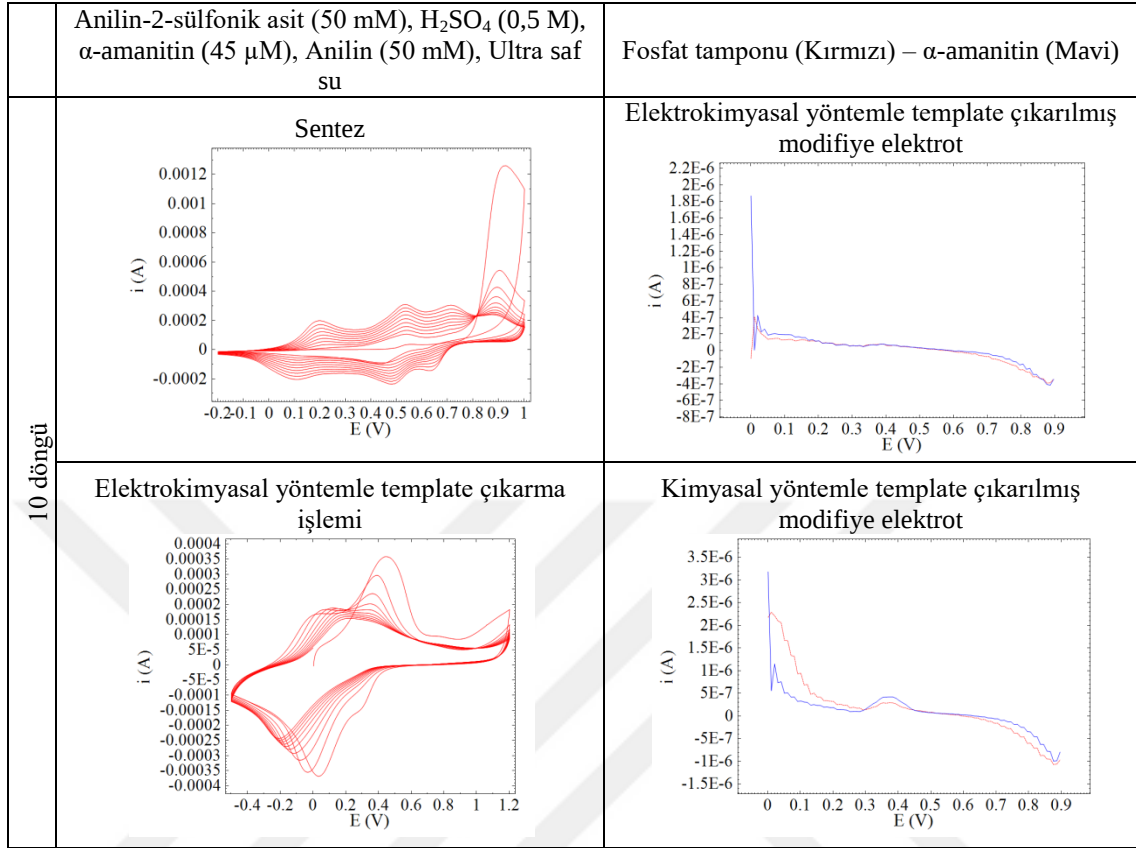
Şekil 4.42. Anilin-2-sülfonik asit ile kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitin belirlenmesine etkisi



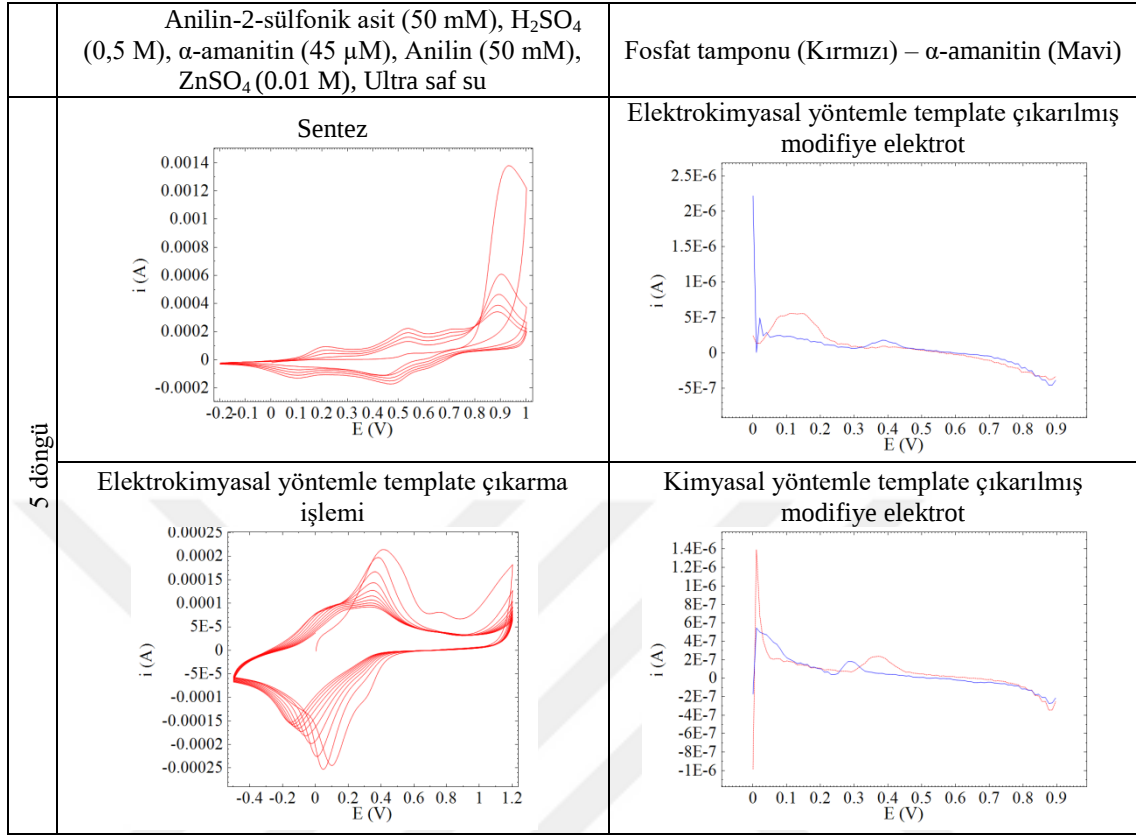
Şekil 4.42 (devam). Anilin-2-sülfonik asit ile kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitin belirlenmesine etkisi



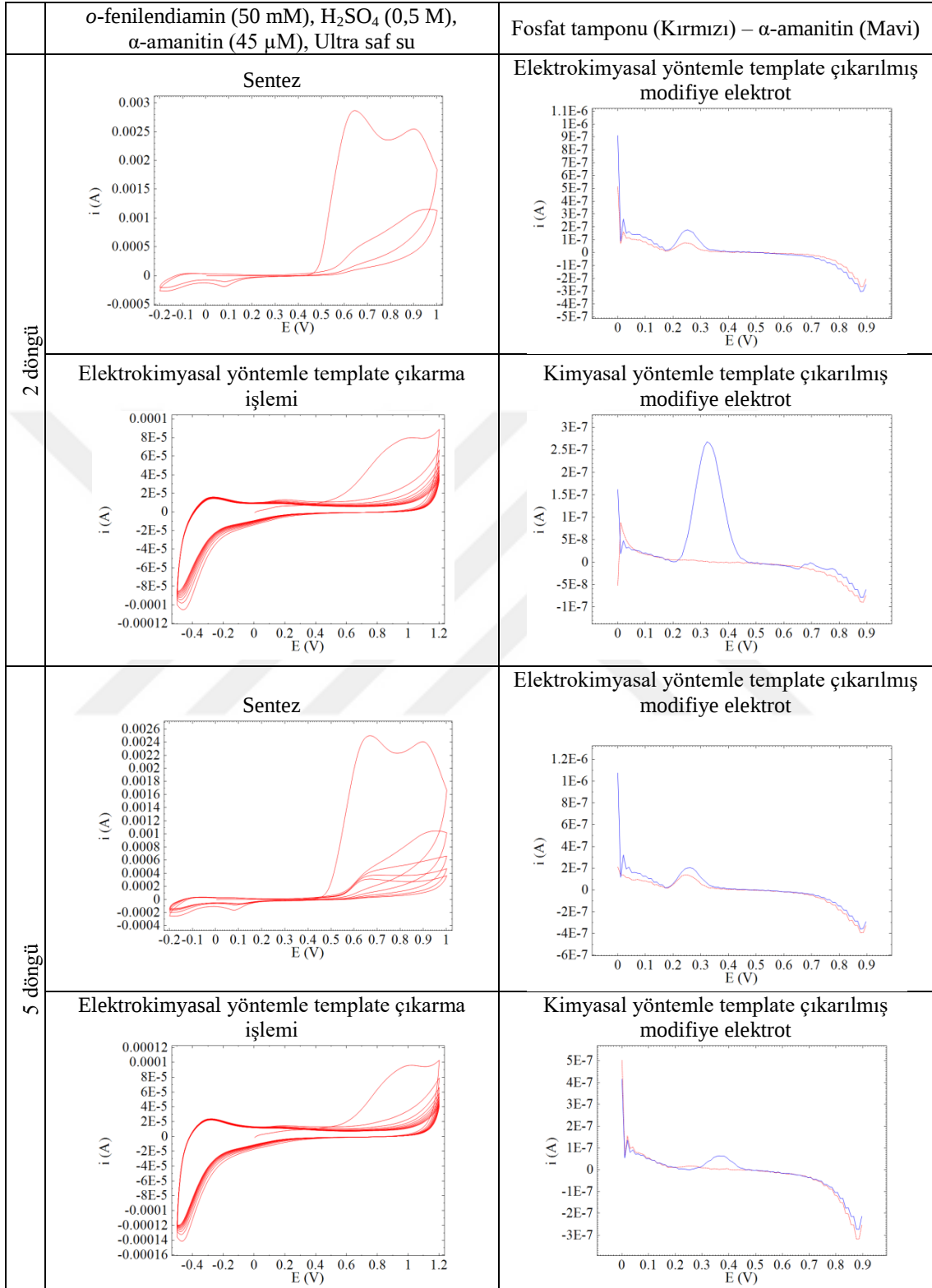
Şekil 4.43. Anilin-2-sülfonik asit ve anilin varlığında kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitin belirlenmesine etkisi



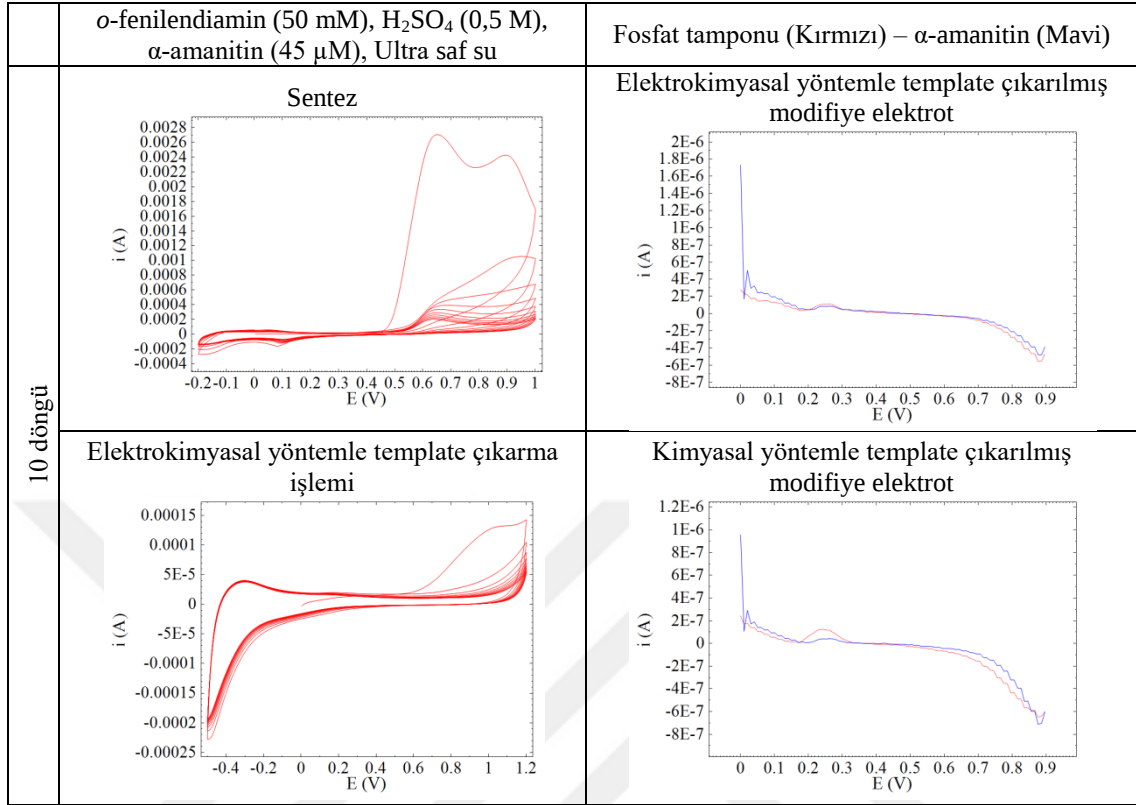
Şekil 4.43 (devam). Anilin-2-sülfonik asit ve anilin varlığında kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitin belirlenmesine etkisi



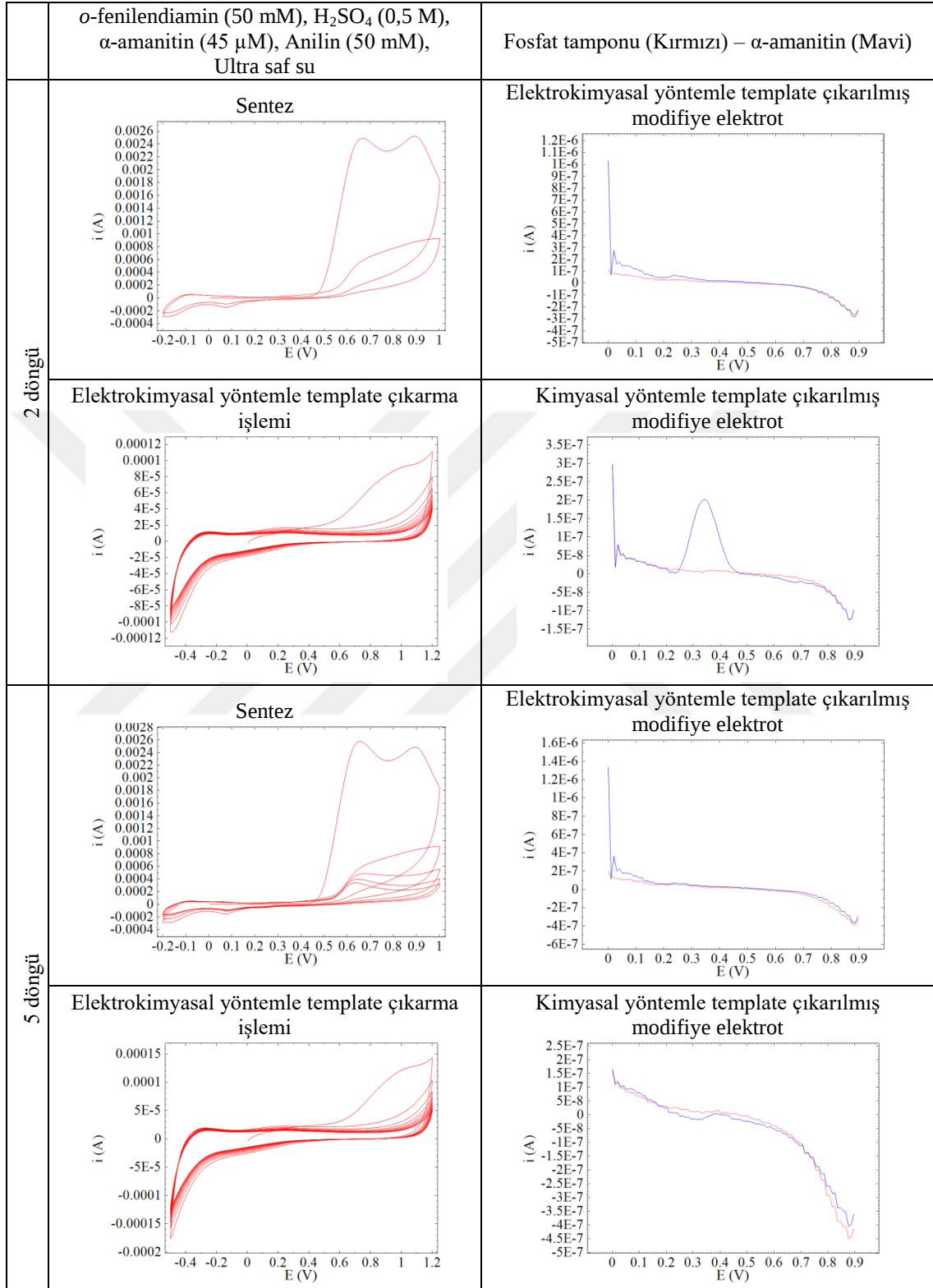
şekil 4.44. Anilin-2-sülfonik asit, anilin ve çinko varlığında kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında  -amanitin belirlenmesine etkisi



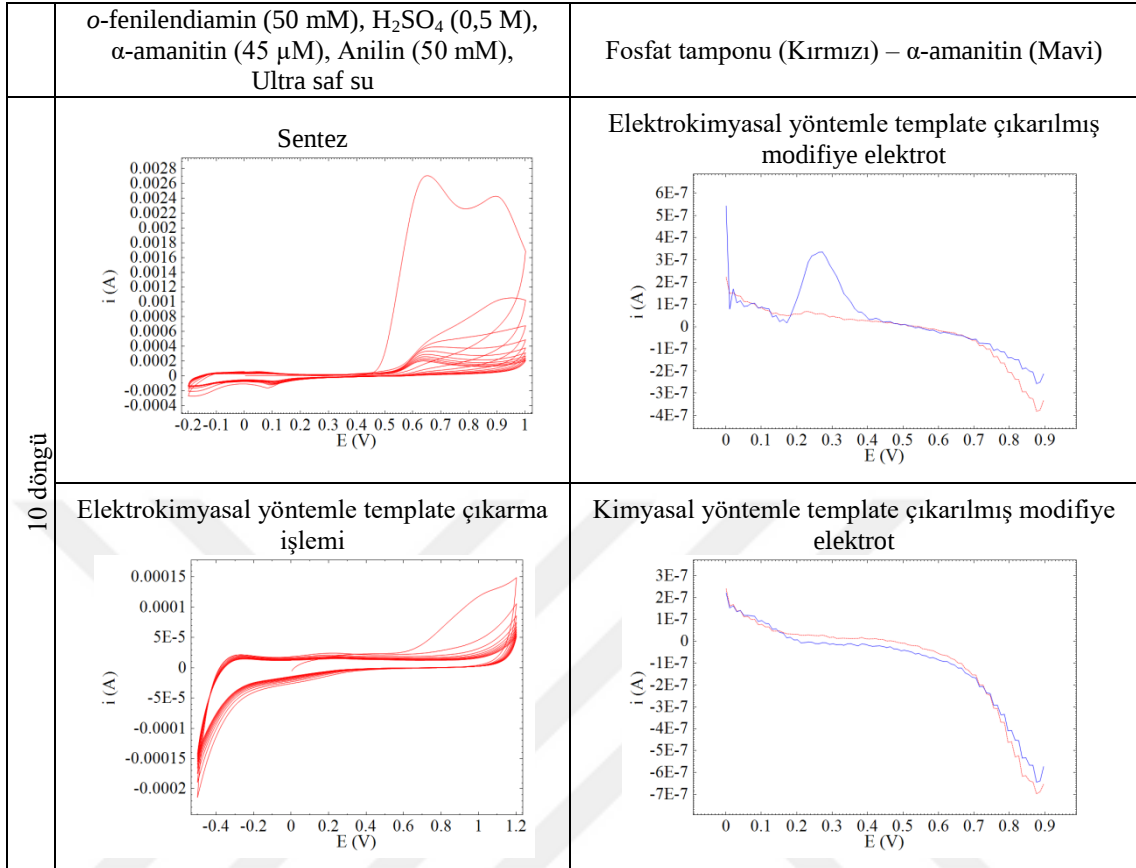
Şekil 4.45. o-fenilendiamin ile kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitin belirlenmesine etkisi



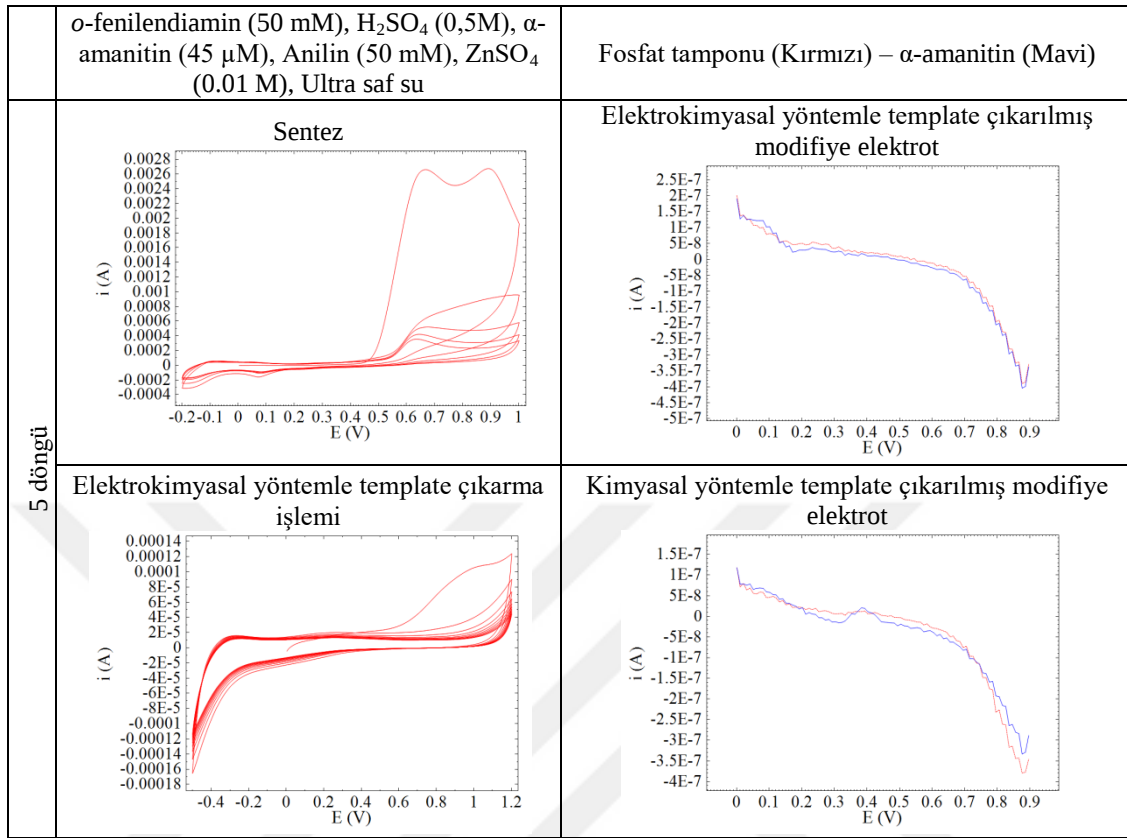
Şekil 4.45 (devam). α -fenilendiamin ile kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitin belirlenmesine etkisi



şekil 4.46. *o*-fenilendiamin ve anilin varlığında kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitinin belirlenmesine etkisi



Şekil 4.46 (devam). o -fenilendiamin ve anilin varlığında kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitin belirlenmesine etkisi



Şekil 4.47. α -fenilendiamin, anilin ve çinko varlığında kalem ucu elektrot yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi ve modifiye elektrodun fosfat tamponu ortamında α -amanitin belirlenmesine etkisi

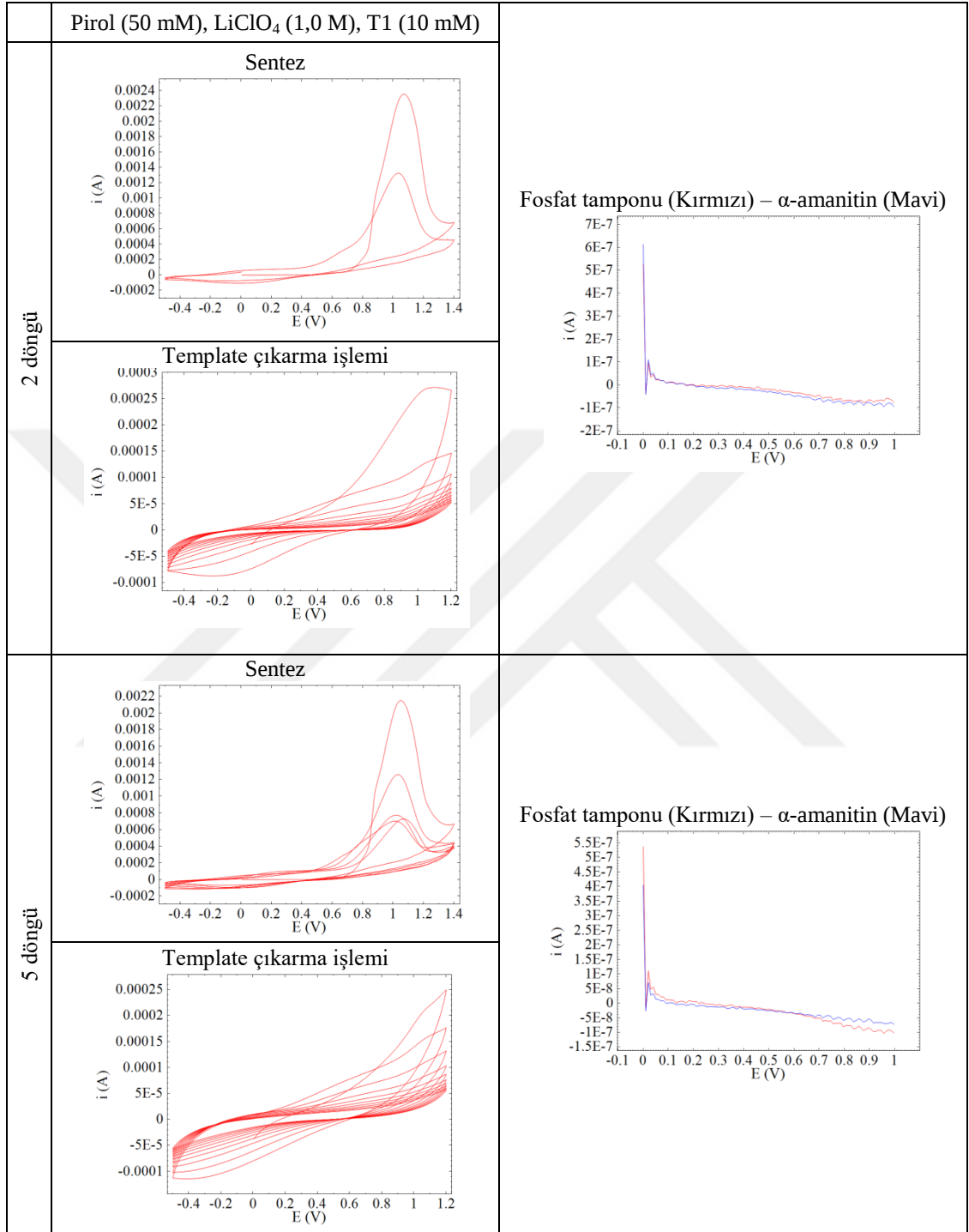
α -amanitin tayini için elektrot modifikasyonu çalışmalarında elektrot yüzeyinde yapılan modifikasyonların verimliliği, fosfat tamponu içerisinde α -amanitin tayini yapılarak değerlendirilmiştir. Ancak, kalem ucu ile elde edilen α -amanitine ait akım cevabı üzerine çıkılamadığı gibi bazı gruplarda cevap alınamamıştır. Bu nedenle bu yöntem ile de istenilen akım cevabının elde edilemediği anlaşılmıştır. Bu durumun sentez sırasında yapıya alınan α -amanitin verimli bir şekilde tekrar yapıdan çıkarılamaması veya sentez sonrası kullanılan modifiye elektrotlarda α -amanitin elektrot yüzeyinde yükseltgenmesi için uygun grupları taşıyamaması gibi nedenleri olduğu düşünülmektedir. α -amanitin büyük bir molekül olmasının yanında, maliyetli oluşu gibi nedenlerle moleküler baskılanmış polimer sentezi sırasında düşük derişimlerde reaksiyon ortamına ilave edilmesinin de bu durumu etkilediği düşünülmüştür.

Pirol ve anilin monomerleri kullanılarak sentezlenen polimerlerde döngü sayısı arttıkça yüzeyde kalınlaşan film gözle görülmüş olsa da polianilin ile modifiye edilmiş elektrotların kimyasal template uzaklaştırma aşamasında yüzeyden sıyrıldıkları görülmüştür.

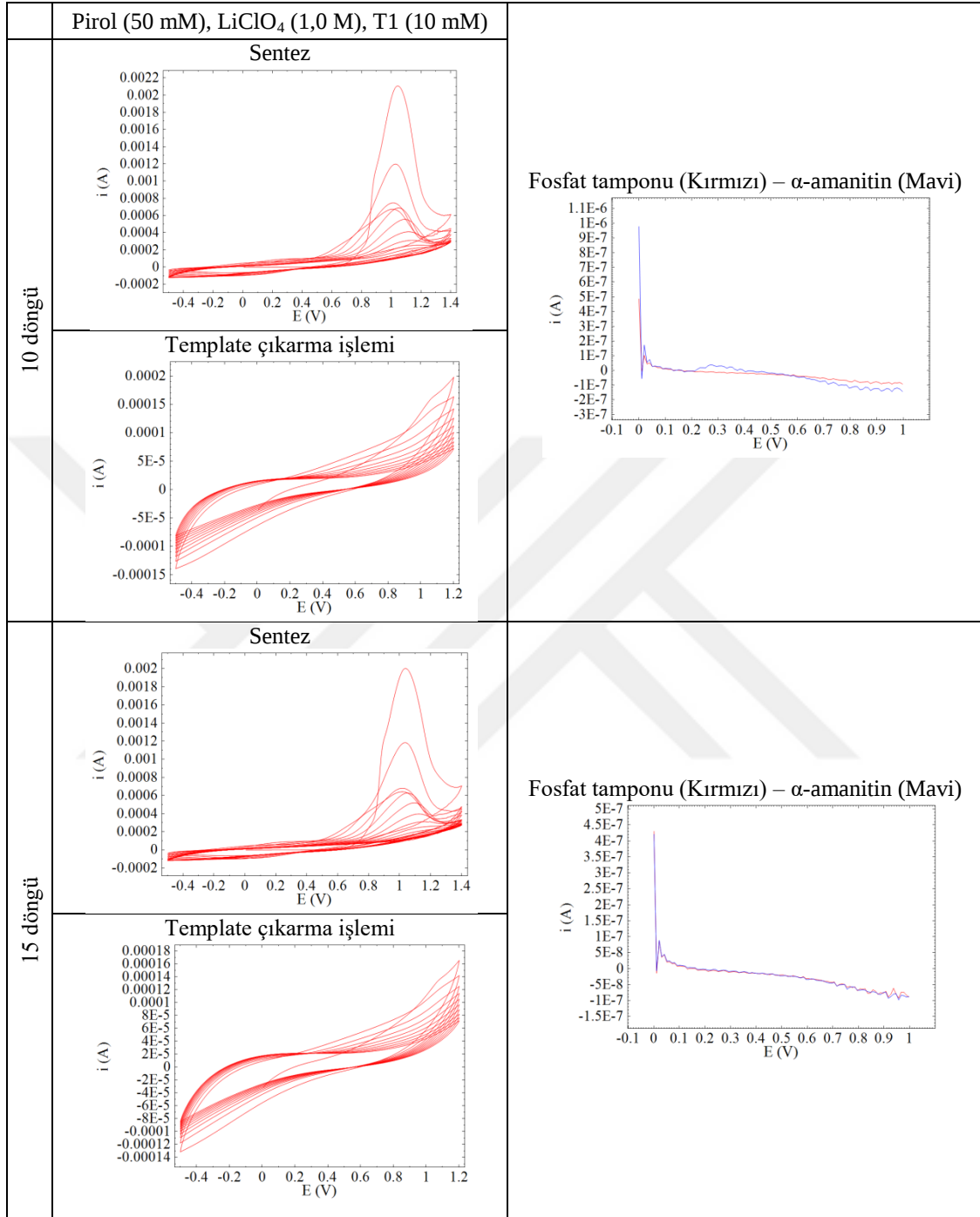
Bu aşamaya kadar yapılan elektrot modifikasyon işlemlerinde α -amanitin için istenen duyarlılıkta elektrot üretilmemesi nedeniyle α -amanitine oranla daha küçük ve daha ucuz bir template kullanımı gereksinimi doğmuştur. Bu nedenle yakın zamanda bir araştırma grubunun (Li vd., 2014) α -amanitin yapısına spesifik olan bir bölgeyi sentezleyip template olarak kullanmalarından esinlenilerek üçüncü bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Elektrotların moleküler baskılanmış polimer ile modifikasyonu için, α -amanitin yapısına spesifik olan bir bölge kimyasal yolla sentezlenerek template olarak kullanılmıştır (Li vd., 2014).

4.3.3.3. Moleküler baskılanmış polimer ile modifiye elektrotların α -amanitin tayininde kullanımı

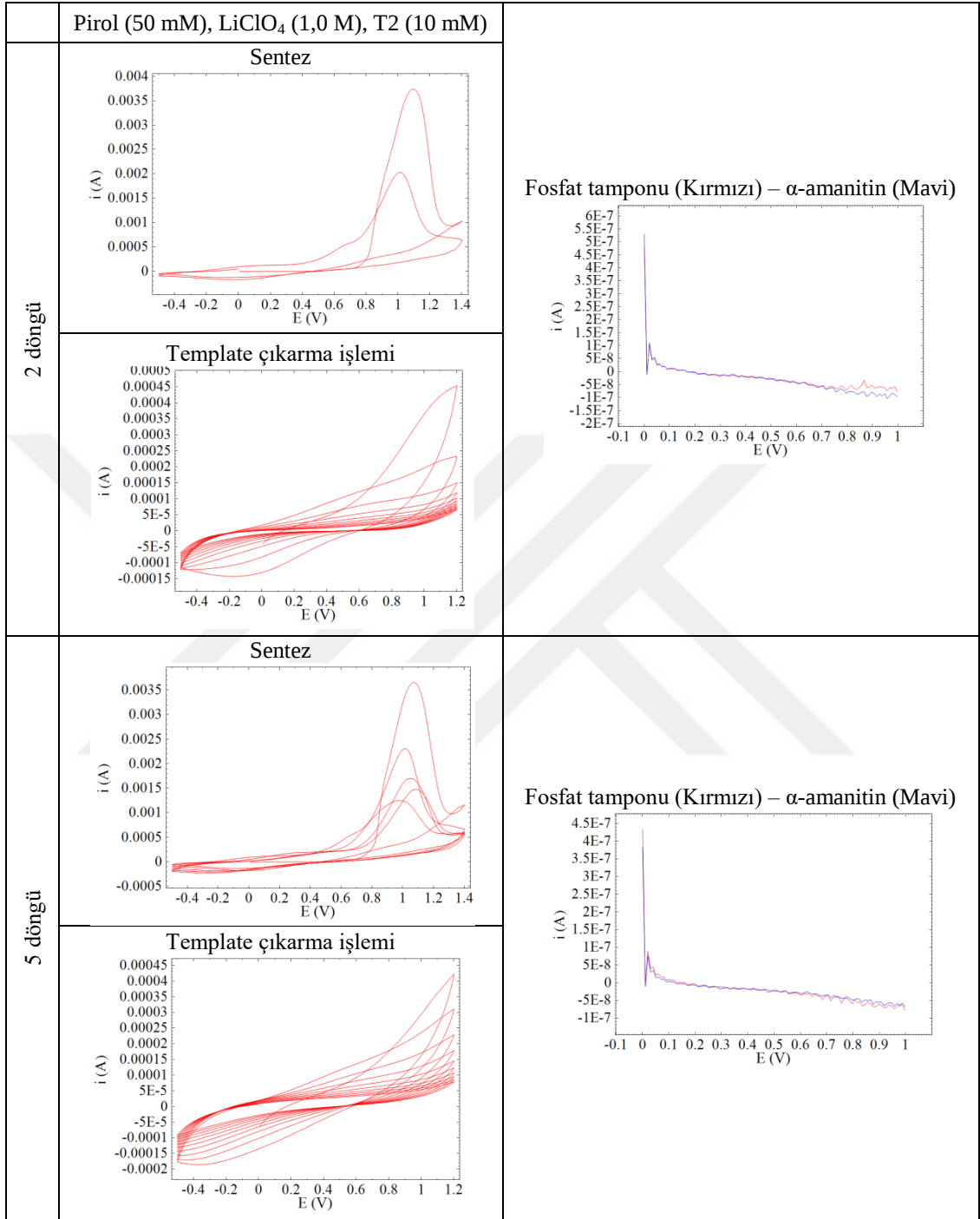
Bu aşamada elde edilen sonuçlar Şekil 4.48 – 4.57’de sunulmuştur.



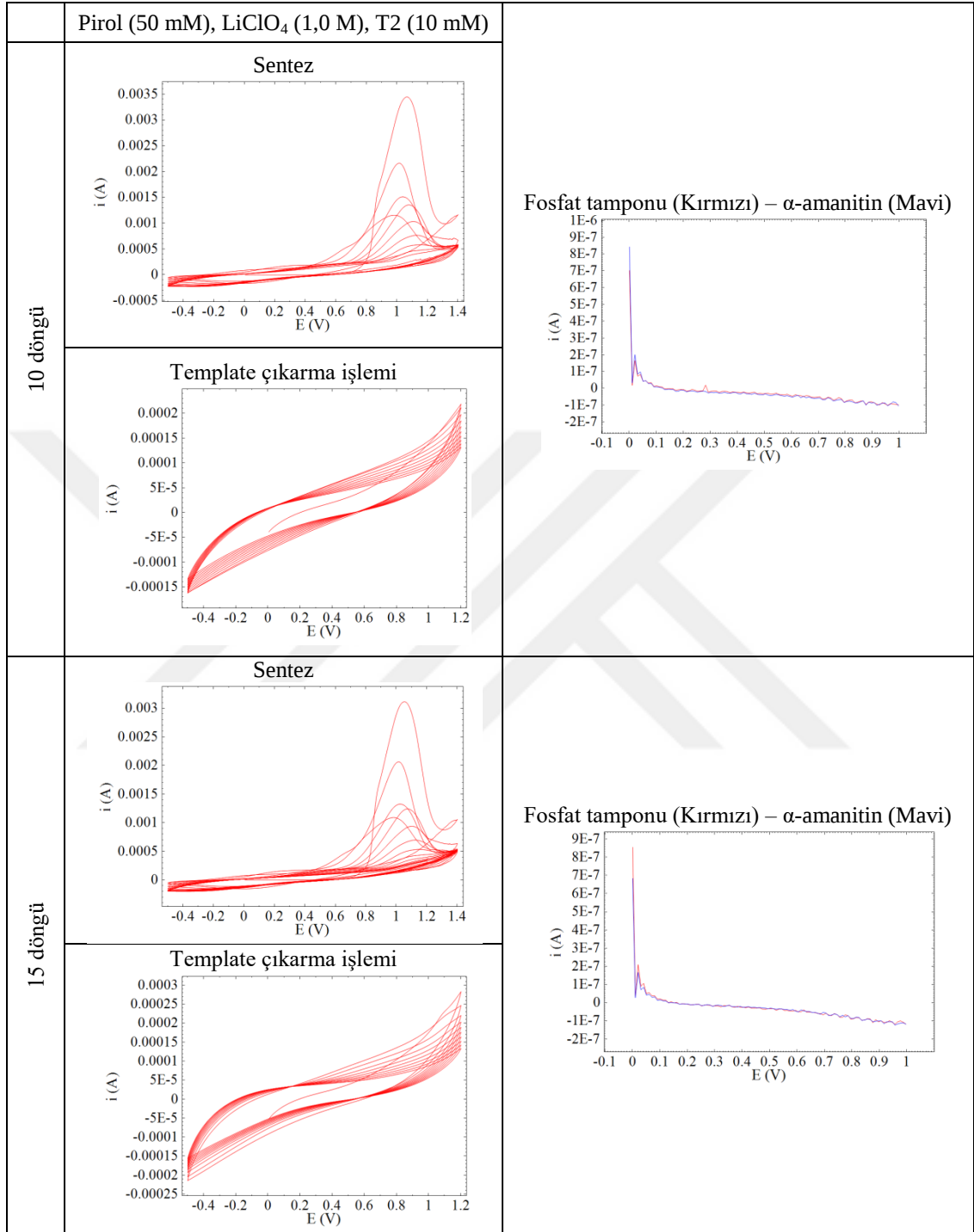
Şekil 4.48. T1 ve pirol varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi



Şekil 4.48 (devam). T1 ve pirol varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi



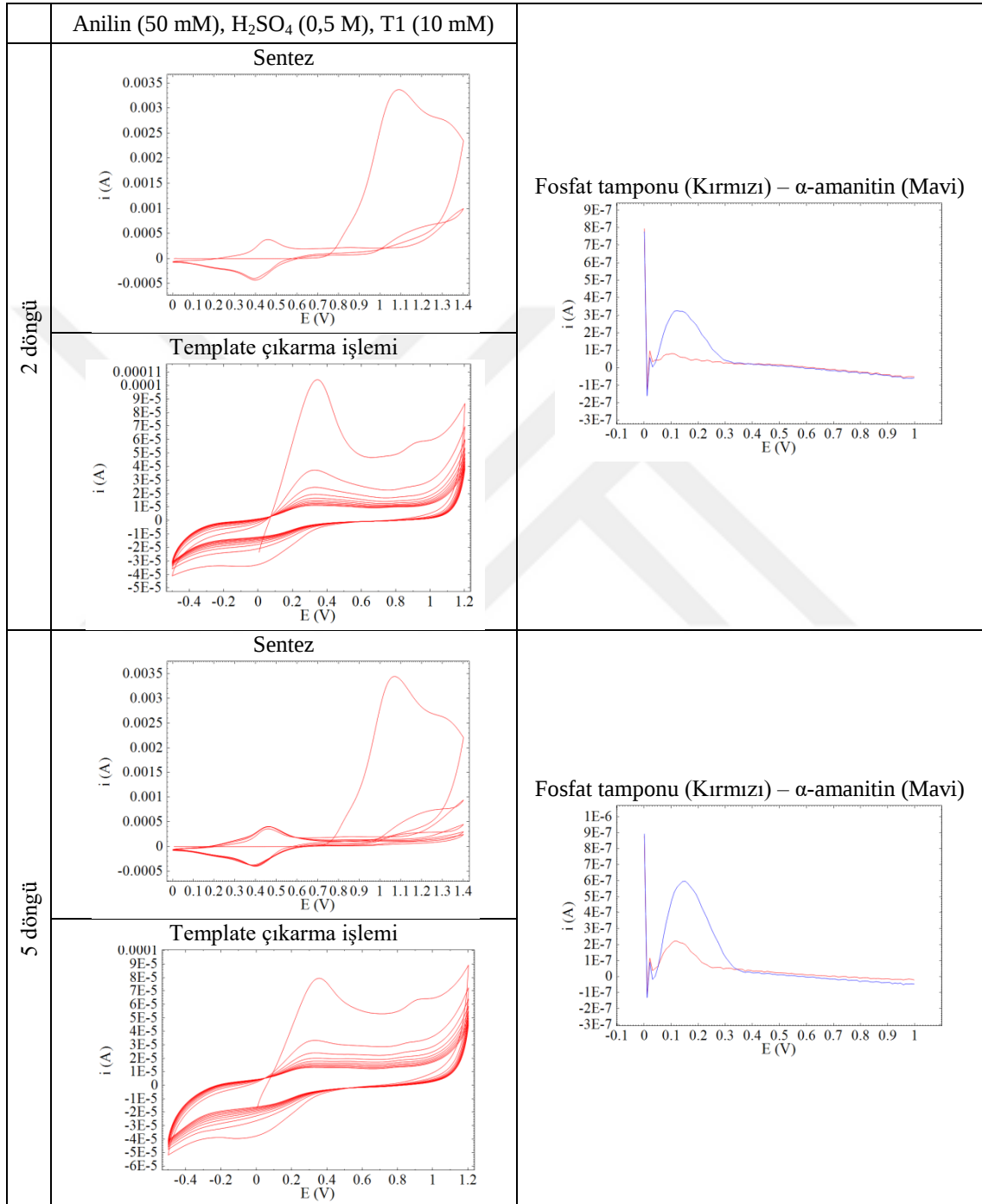
Şekil 4.49. T2 ve pirol varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi



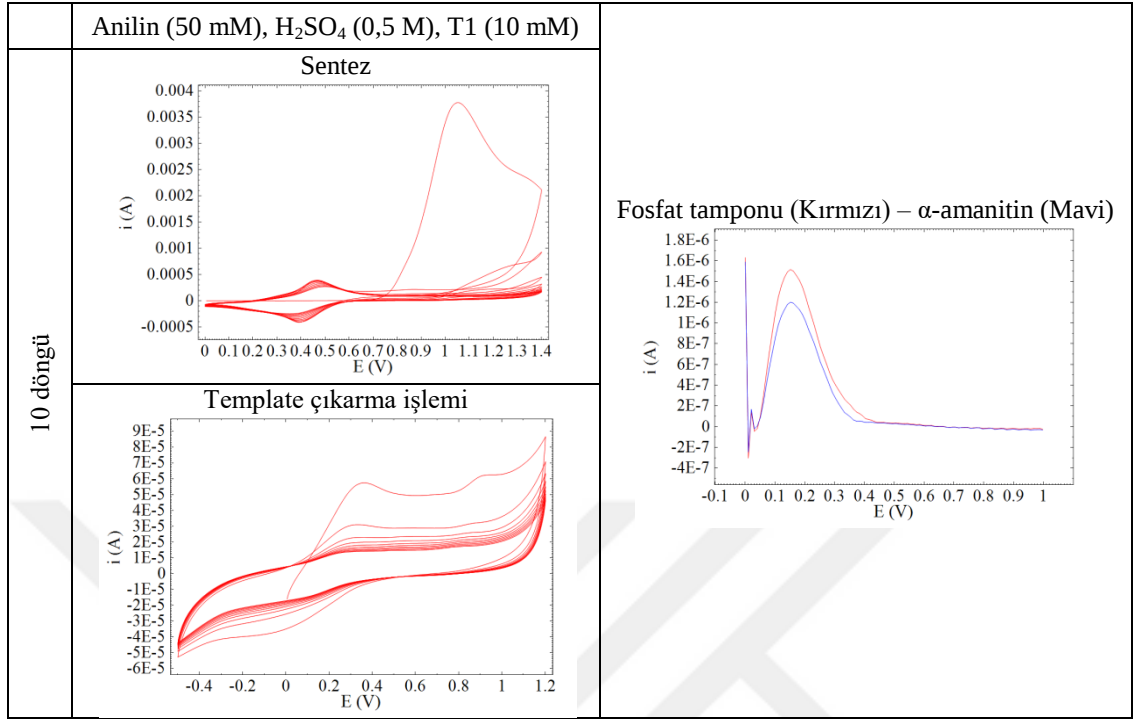
Şekil 4.49 (devam). T2 ve pirol varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve  -amanitinin tayinine etkisi

Şekil 4.48 ve 4.49’da sunulan voltamogramlar dikkate alındığında her iki grupta hazırlanan elektrotların 0,05 M derişimindeki fosfat tamponu (pH 7,4) ortamında

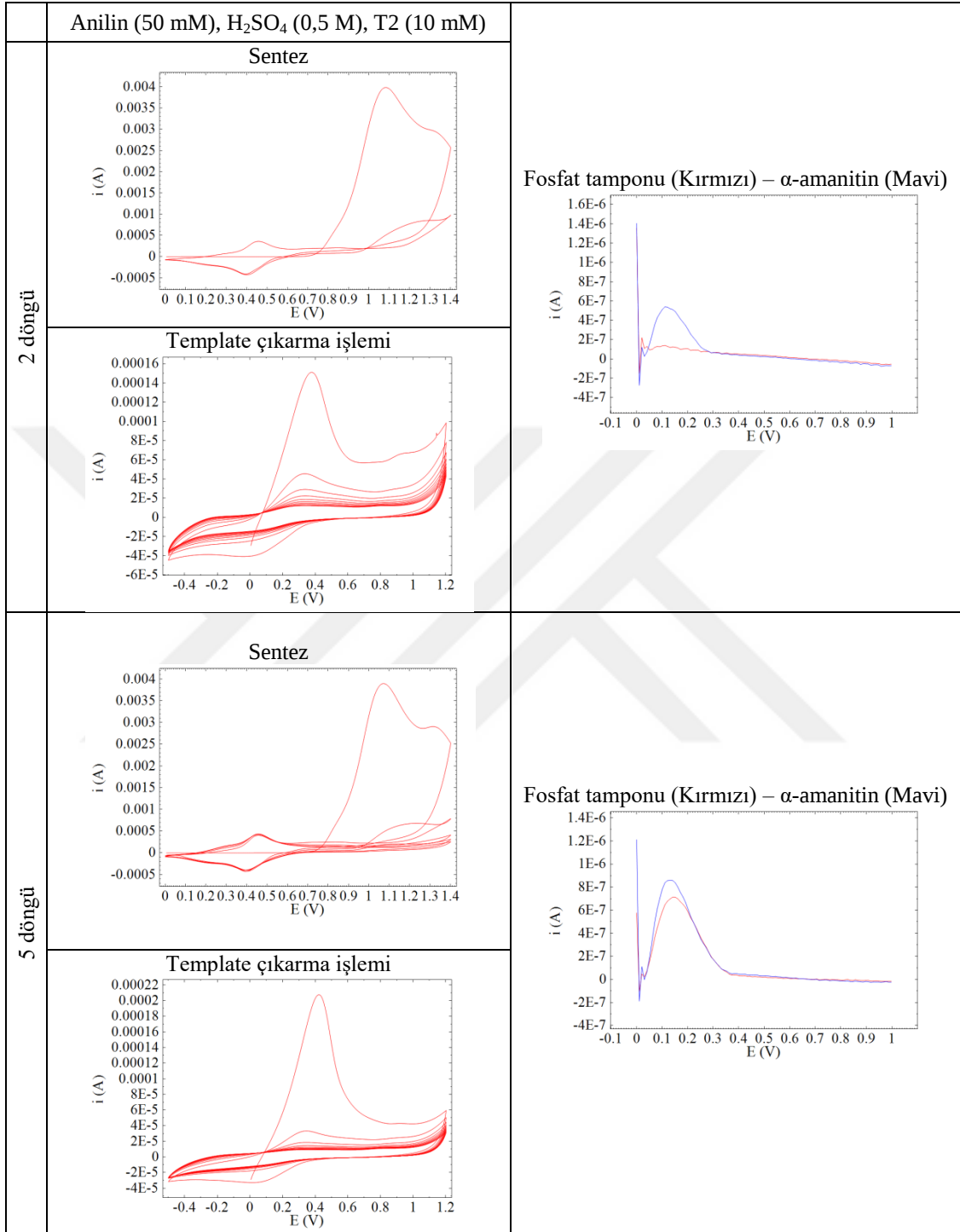
α -amanitine karşı duyarlı olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle serum ve idrar ortamında bu grupta hazırlanan elektrotlar denenmemiştir.



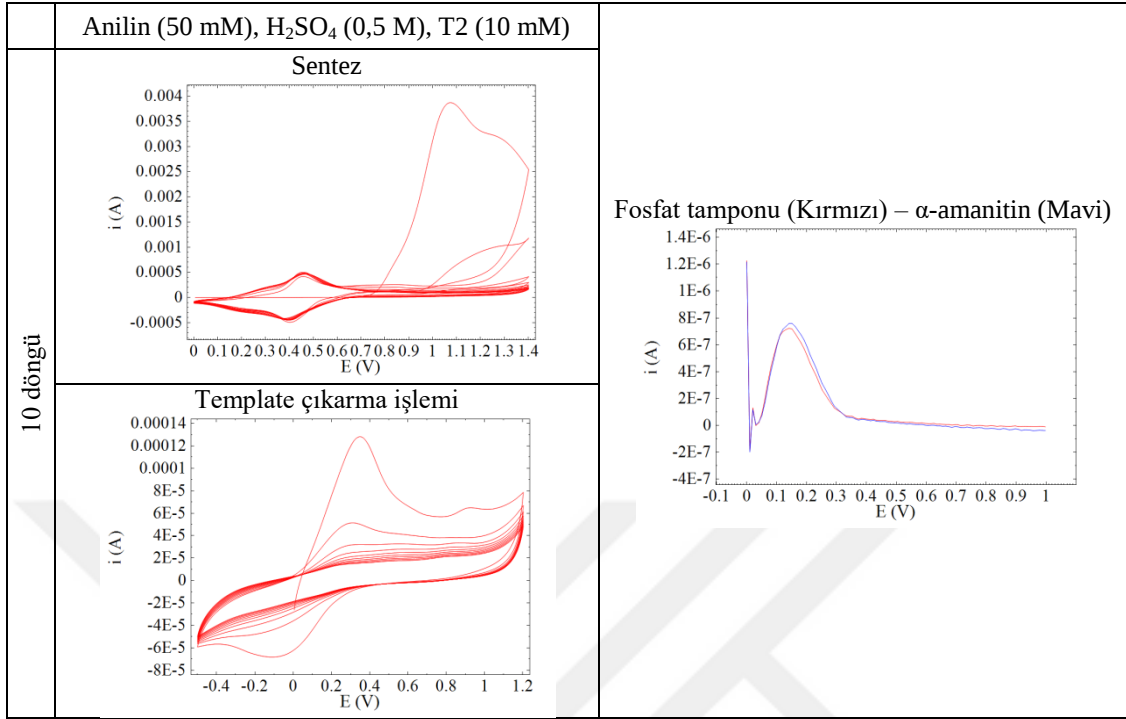
Şekil 4.50. T1 ve anilin varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi



Şekil 4.50 (devam). T1 ve anilin varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi

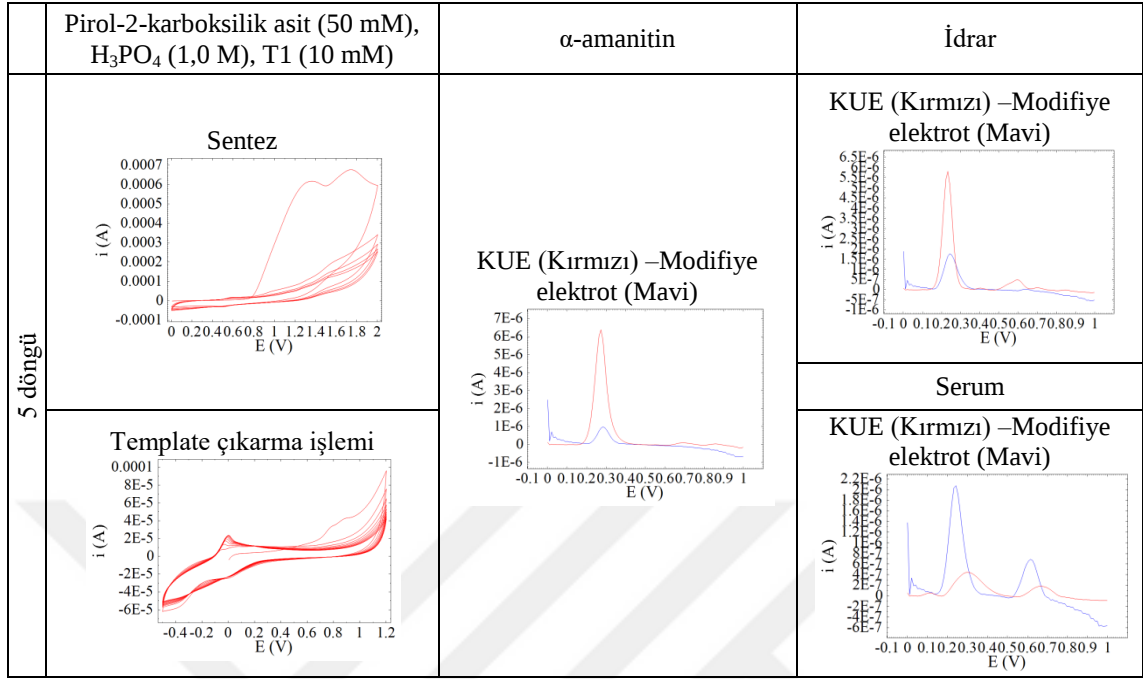


Şekil 4.51. T2 ve anilin varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve  -amanitinin tayinine etkisi

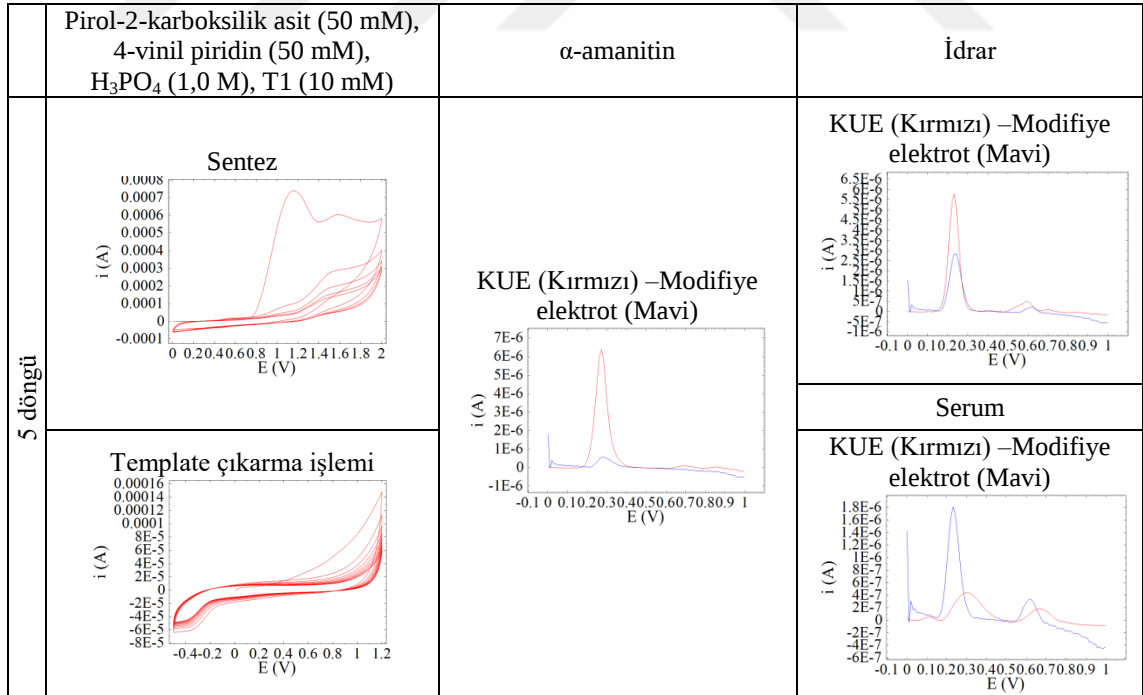


Şekil 4.51 (devam). T2 ve anilin varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi

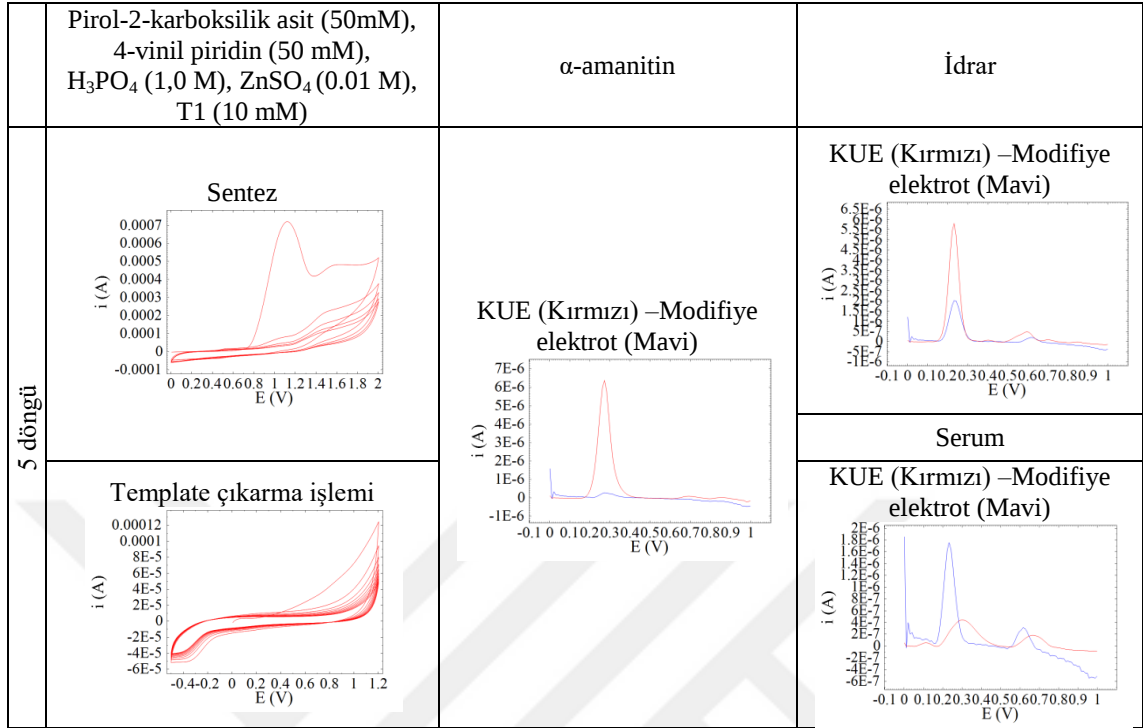
Şekil 4.50 ve 4.51’de sunulan voltamogramlar değerlendirildiğinde anilin varlığında template kullanılarak yapılan elektrot modifikasyon işlemlerinin α -amanitin tayini için anlamlı olmadığı görülmüş ve bu elektrotlarla da serum veya idrar ortamında denemeler yapılmamıştır.



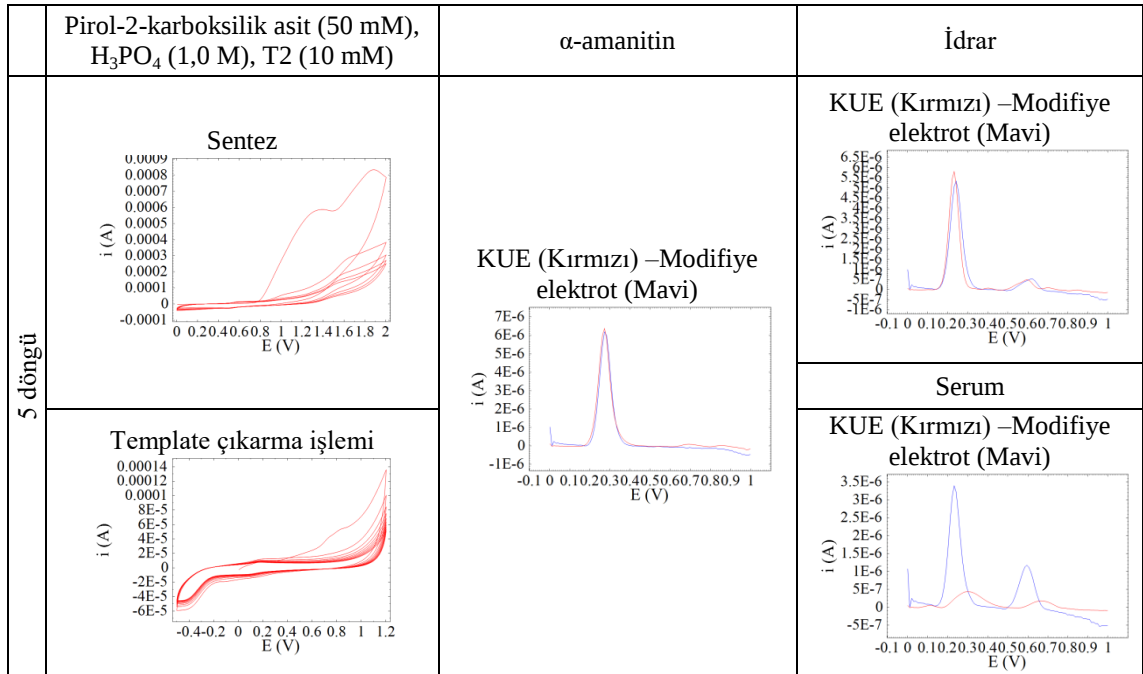
Şekil 4.52. T1 ve pirol-2-karboksilik asit varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi



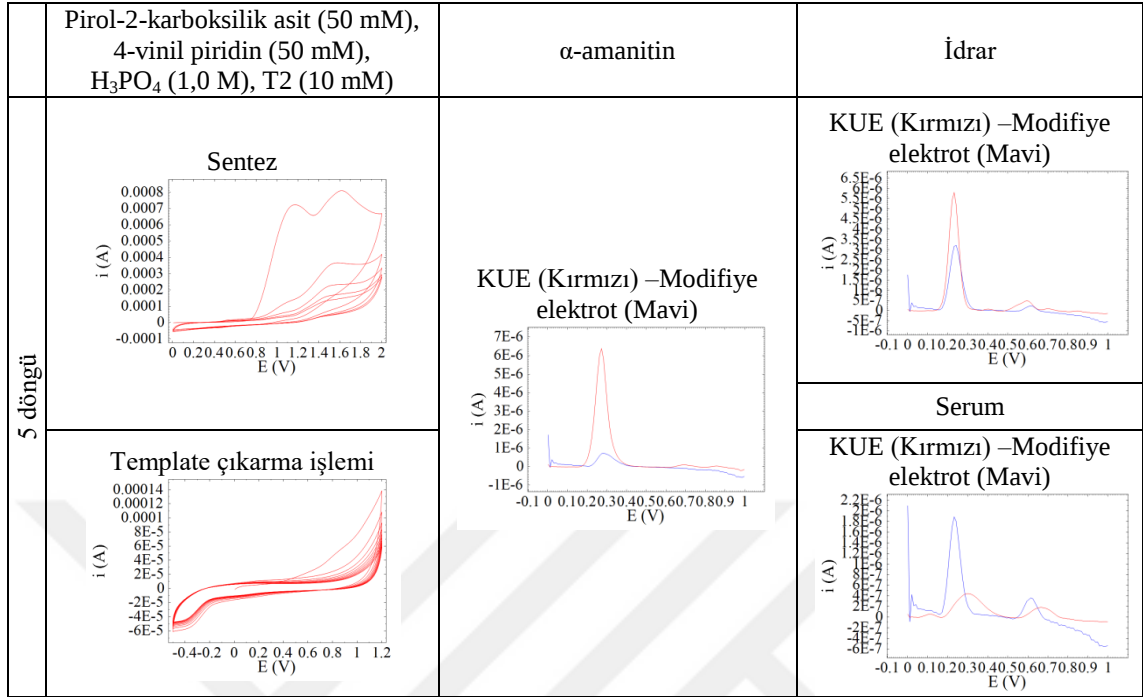
Şekil 4.53. T1, pirol-2-karboksilik asit ve 4-vinil piridin varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi



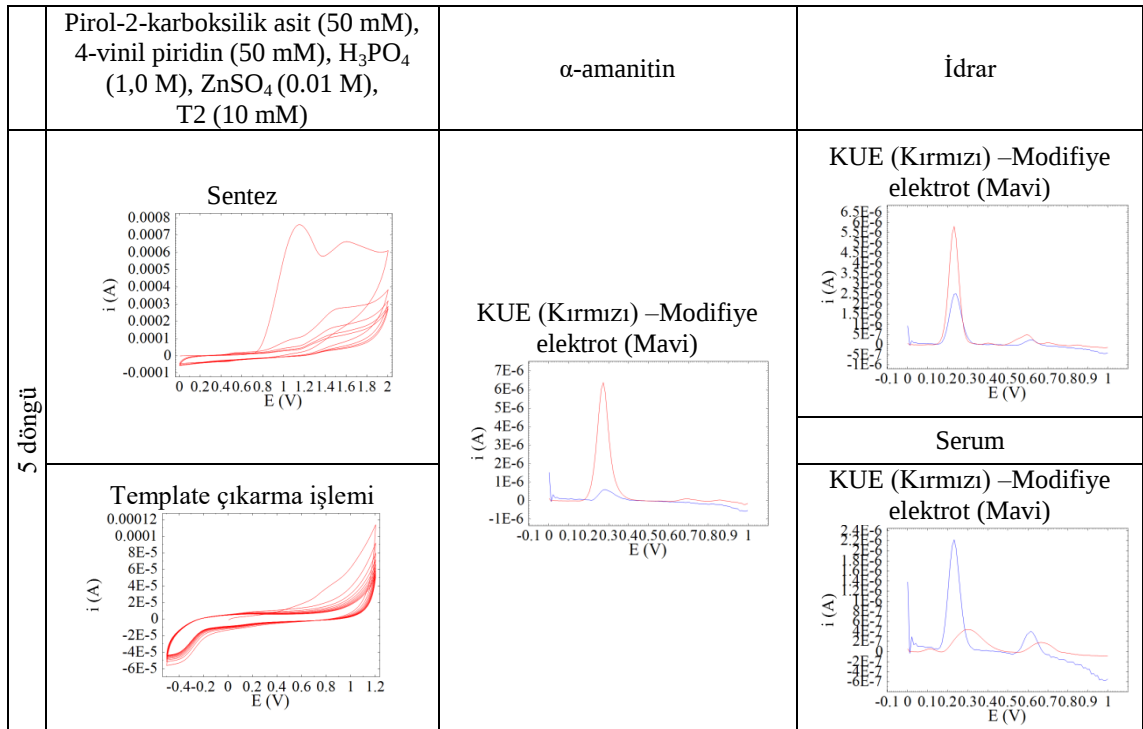
Şekil 4.54. T1, pirol-2-karboksilik asit, 4-vinil piridin ve çinko varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi



Şekil 4.55. T2 ve pirol-2-karboksilik asit varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi



Şekil 4.56. T2, pirol-2-karboksilik asit ve 4-vinil piridin varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi



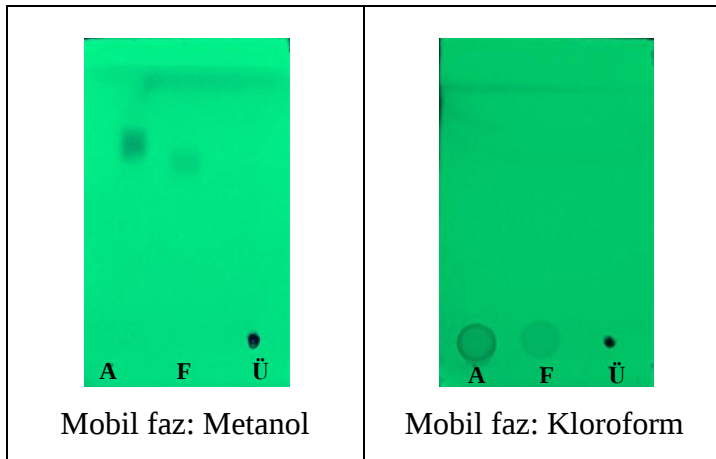
Şekil 4.57. T2, pirol-2-karboksilik asit, 4-vinil piridin ve çinko varlığında modifiye edilen kalem ucu elektrotlara ait voltamogramlar ve α -amanitinin tayinine etkisi

Sentezlenen template elektroaktif özellikte olup, elektrokimyasal yöntemlerle moleküler baskılanmış polimer sentez aşamasında kullanılmıştır. Çalışmanın bu aşamasına kadar yapılan üç farklı elektrot modifikasyon işlemleri ile biyolojik sıvılarda α -amanitin tayini yapılabilmesi için istenilen seçicilik ve duyarlılıkta sonuçlar elde edilememiştir.

Bu sonuçlar dikkate alındığında α -amanitin tayini için öncelikle biyolojik sıvılardan ekstrakte edilip sonrasında elektrokimyasal tayini yapılması hedeflenmiştir.

4.3.4. Biyolojik sıvılardan toksin ekstraksiyonu amacıyla katı faz ekstraksiyon kolonu için yöntem optimizasyonu

Metanol ve kloroformun ayrı ayrı mobil faz olarak kullanıldığı, α -amanitin, falloidin ve ürik asidin silika jel ince tabakalarda yürütüldükten sonra 254 nm'deki görüntüsü Şekil 4.58'de sunulmuştur.



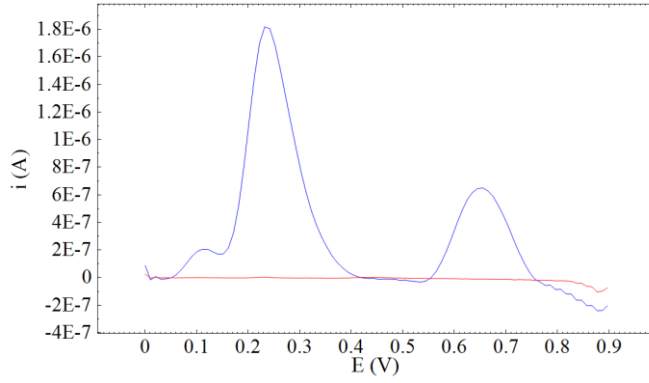
Şekil 4.58. α -amanitin, falloidin ve ürik asidin İTK sonuçları (A: α -amanitin, F: Falloidin, Ü: Ürik asit)

Eldeki ince tabaka görüntüleri incelendiğinde mobil faz olarak metanol kullanıldığında toksinlerin başlangıç noktasından hareket ettiği gözlenirken ürik asidin başlangıç noktasında kaldığı, kloroform kullanıldığında ise her üç maddenin de başlangıç noktasında kaldığı görülmüştür.

Analiz öncesi biyolojik sıvılardan α -amanitin ve falloidin ekstraksiyonu için manual (Maurer vd., 1997) ve ticari/tek kullanımlık katı faz ekstraksiyon kolonunun (Tagliaro vd., 1991, Zhou vd., 2011, Yoshioka vd., 2014, Gonmori vd., 2012, Tomkova vd., 2015, Leite vd., 2013) tercih edildiği çalışmalar literatürde bulunmaktadır. Bu çalışmalar incelendiğinde, ticari katı faz ekstraksiyon kolonlarının geri dönüşüm oranının klasik ekstraksiyon yöntemlerine göre daha yüksek ve daha stabil olduğu görülmüştür. Literatürdeki veriler dikkate alınarak seçilen hidrofilik-lipofilik dengeli bir katı faz ekstraksiyon kolonu olan Oasis HLB kolonu edinilmiş, serum ve idrar için gerek markanın önerdiği gerekse de literatürde kullanılan protokoller dikkate alınarak bir yöntem optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Serum için 8, idrar için 15 farklı protokol öncelikli olarak girişime neden olan bileşenlerin etkisinden kurtulmak için denenmiştir. DPV yöntemi kullanılarak kolondan geçirilen çözeltilerin davranışları incelenmiş ve her iki toksinin de yükseltgenme bölgelerinde pik olup olmadığı incelenmiştir. Daha sonra seçilen protokoller biyolojik sıvılara toksin ilave edilerek tekrarlanmıştır.

4.3.4.1. Serumdan toksin ekstraksiyonu için uygun yöntemin seçilmesi

Fosfat tamponu (pH 7,4) ile 5 kat seyreltilmiş seruma ait diferansiyel puls voltamogramı Şekil 4.59'da, katı faz ekstraktraksiyonu amacı ile uygulanan farklı protokoller ile elde edilen çözeltilerin diferansiyel puls voltametrisi sonuçları ise Şekil 4.61'de sunulmuştur. Voltamogram incelendiğinde elektroaktif bileşenlere ait piklerin akım cevabının düşük olduğu görülmektedir ancak ortamda elektroaktif olmayan bileşenlerin de girişim etkisine neden olarak toksinlere ait cevapları maskeleyiği önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlarda görülmüştür.

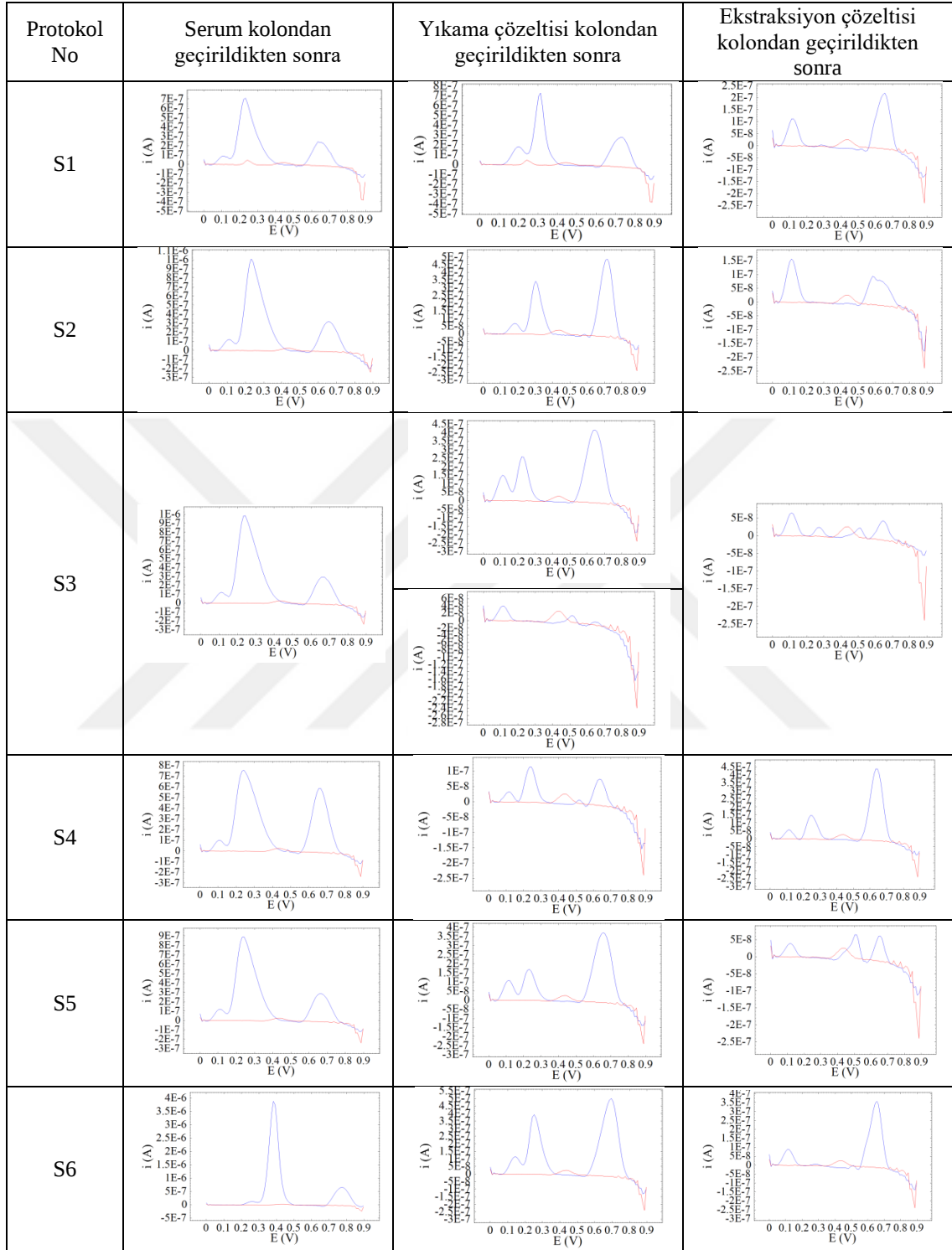


Şekil 4.59. Seruma ait diferansiyel puls voltamogramı (Fosfat tamponu: Kırmızı, Serum: Mavi)

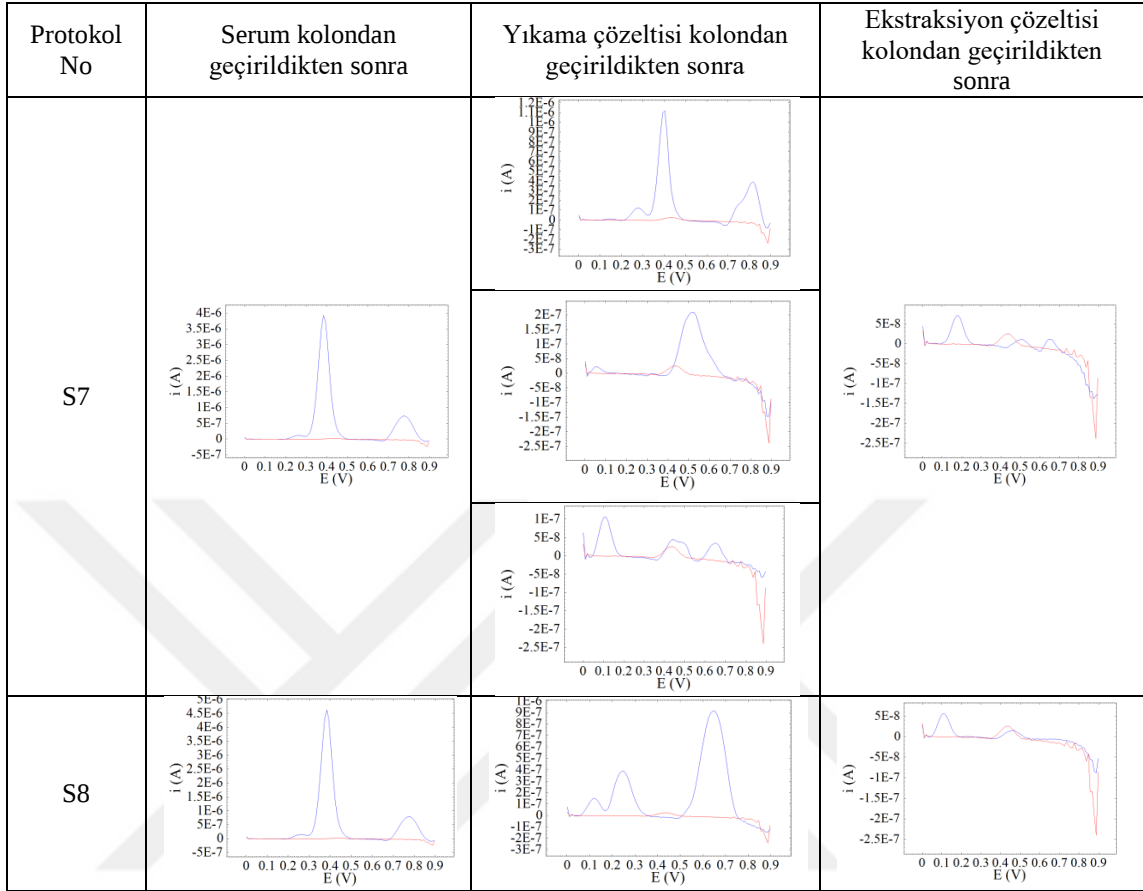
Serum için uygulanan katı faz ekstraksiyon protokollerinden elde edilen çözeltilerin ince tabaka görüntüleri Şekil 4.60'ta sunulmuştur.

Protokol no: S1 	Protokol no: S2 	Protokol no: S3 	Protokol no: S4
Protokol no: S5 	Protokol no: S6 	Protokol no: S7 	Protokol no: S8

Şekil 4.60. Seruma ait katı faz ekstraksiyon kolonundan geçirilmiş çözeltilerin İTK görüntüleri (Tüm ince tabakalarda soldan sağa; örnek, yıkama çözeltisi/çözeltileri, ekstrakt)

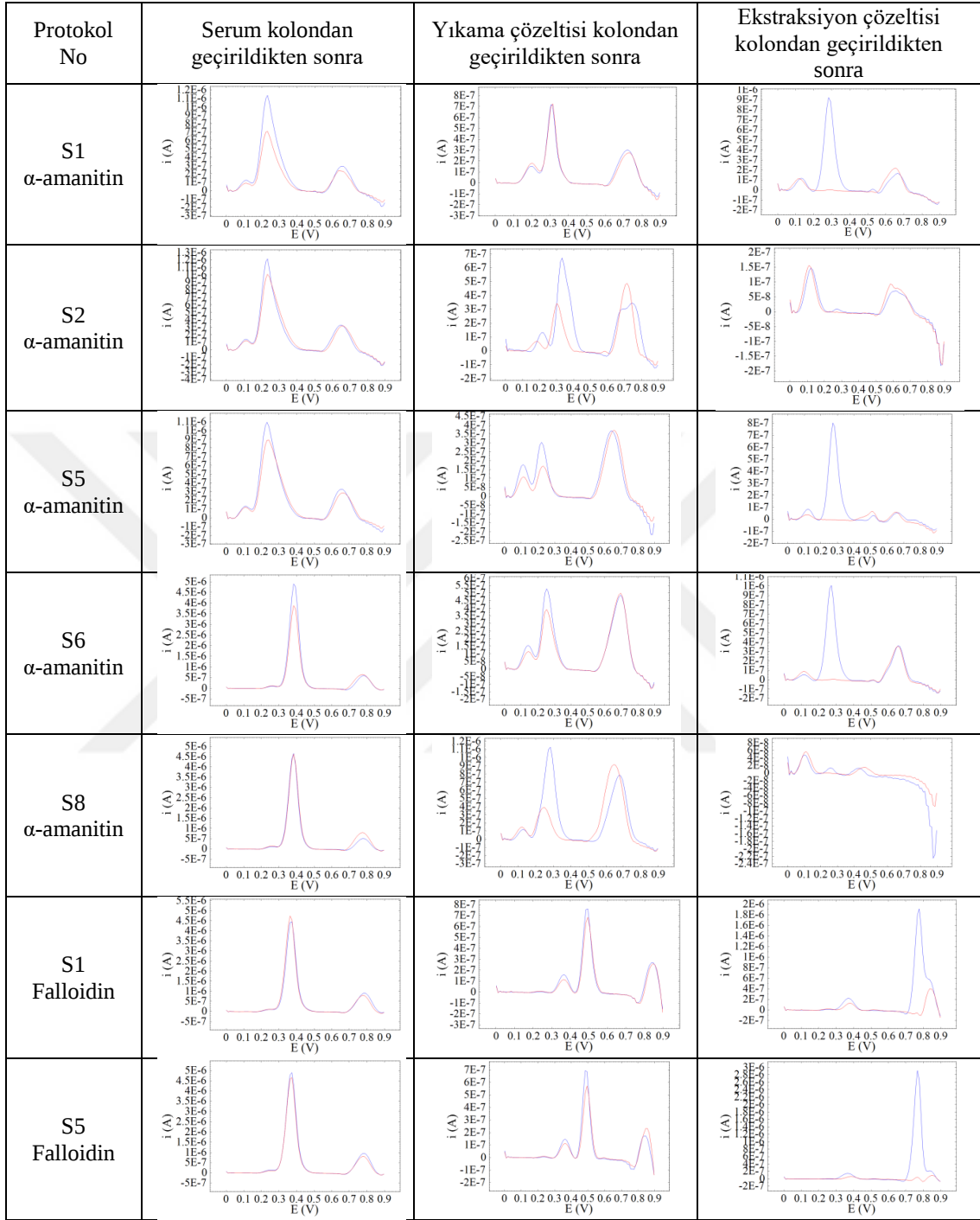


Şekil 4.61. Serum örneklerinin ekstraksiyon sıvılarına ait diferansiyel puls voltamogramları (Fosfat tamponu: Kırmızı, Kolondan geçirilmiş çözelti: Mavi)



Şekil 4.61 (devam). Serum örneklerinin ekstraksiyon sıvılarına ait diferansiyel puls voltamogramları (Fosfat tamponu: Kırmızı, Kolondan geçirilmiş çözelti: Mavi)

Elde edilen voltamogramlar incelendiğinde uygulanan protokollerden S1, S2, S5, S6, S8 numaralı olanlarda α -amanitinin yükseltme bölgesinde bulunan pikin kaybolduğu görülmektedir (Şekil 4.61). Falloidinin serumdan ekstraksiyonu için ise S1 ve S5 kodlu protokollerin uygun olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle diğerleri ile kıyaslandığında kullanılması daha uygun olan bu protokoller seruma α -amanitin ve falloidin eklenerek tekrarlanmıştır. Serum örneklerinden toksin ekstraksiyonu sırasında kolondan geçirilen çözeltiler kullanılarak elde edilen voltamogramlar Şekil 4.62’de ve bu voltamogramlardaki toksinlere ait ortalama akım cevapları ile standart sapma değerleri Çizelge 4.19’da sunulmuştur.



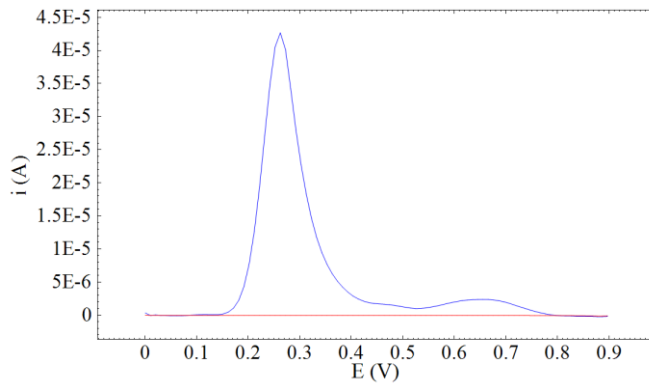
Şekil 4.62. α -amanitin ve falloidin ilave edilen serum örneklerinin ekstraksiyon sıvılarına ait diferansiyel puls voltamogramları (Serum: Kırmızı, Toksin içeren serum: Mavi)

Çizelge 4.19. Serum örneklerine ilave edilen α -amanitin ve falloidin toksinlerinin farklı protokoller ile katı faz ekstraksiyonu sonucunda elde edilen akım cevapları

Protokol No	Toksin	Akım (μ A)
S1	α -amanitin	$0,942 \pm 0,122$
S2	α -amanitin	$0,012 \pm 0,000$
S5	α -amanitin	$0,785 \pm 0,140$
S6	α -amanitin	$1,041 \pm 0,165$
S8	α -amanitin	$0,017 \pm 0,003$
S1	Falloidin	$1,521 \pm 0,109$
S5	Falloidin	$2,834 \pm 0,300$

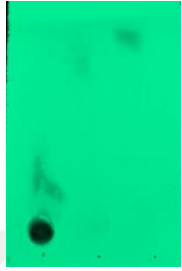
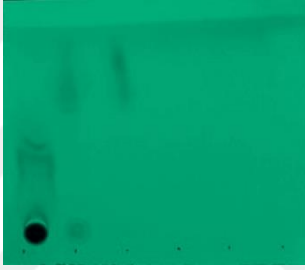
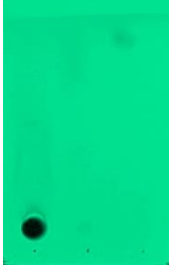
4.3.4.2. İdrardan toksin ekstraksiyonu için uygun yöntemin seçilmesi

Fosfat tamponu (pH 7,4) ile 5 kat seyreltilmiş idrara ait diferansiyel puls voltamogramı Şekil 4.63'te, katı faz ekstraksiyonu amacı ile uygulanan farklı protokoller ile elde edilen çözeltilerin diferansiyel puls voltametri sonuçları ise Şekil 4.65'te sunulmuştur.

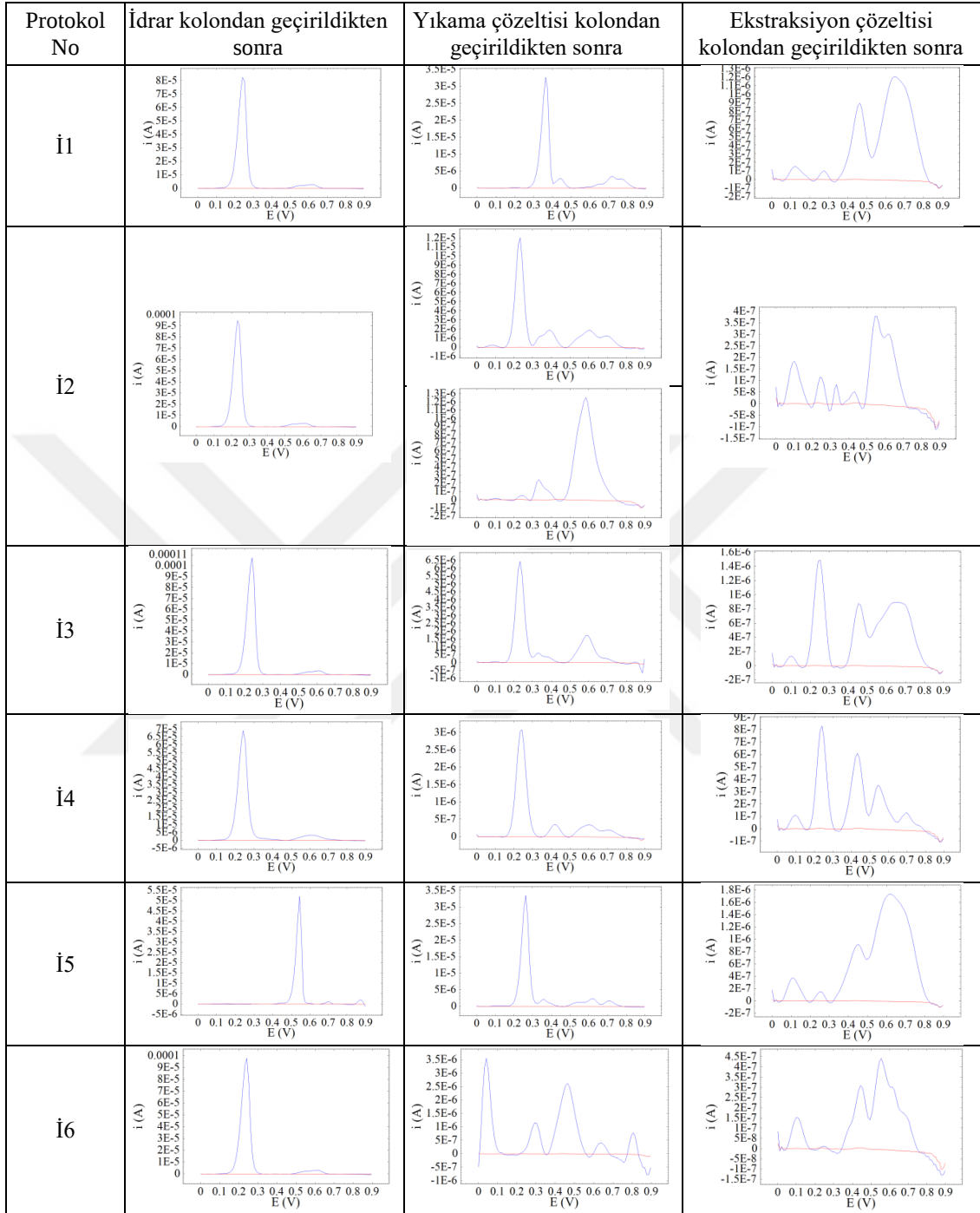


Şekil 4.63. İdrara ait diferansiyel puls voltamogramı (Fosfat tamponu: Kırmızı, İdrar: Mavi)

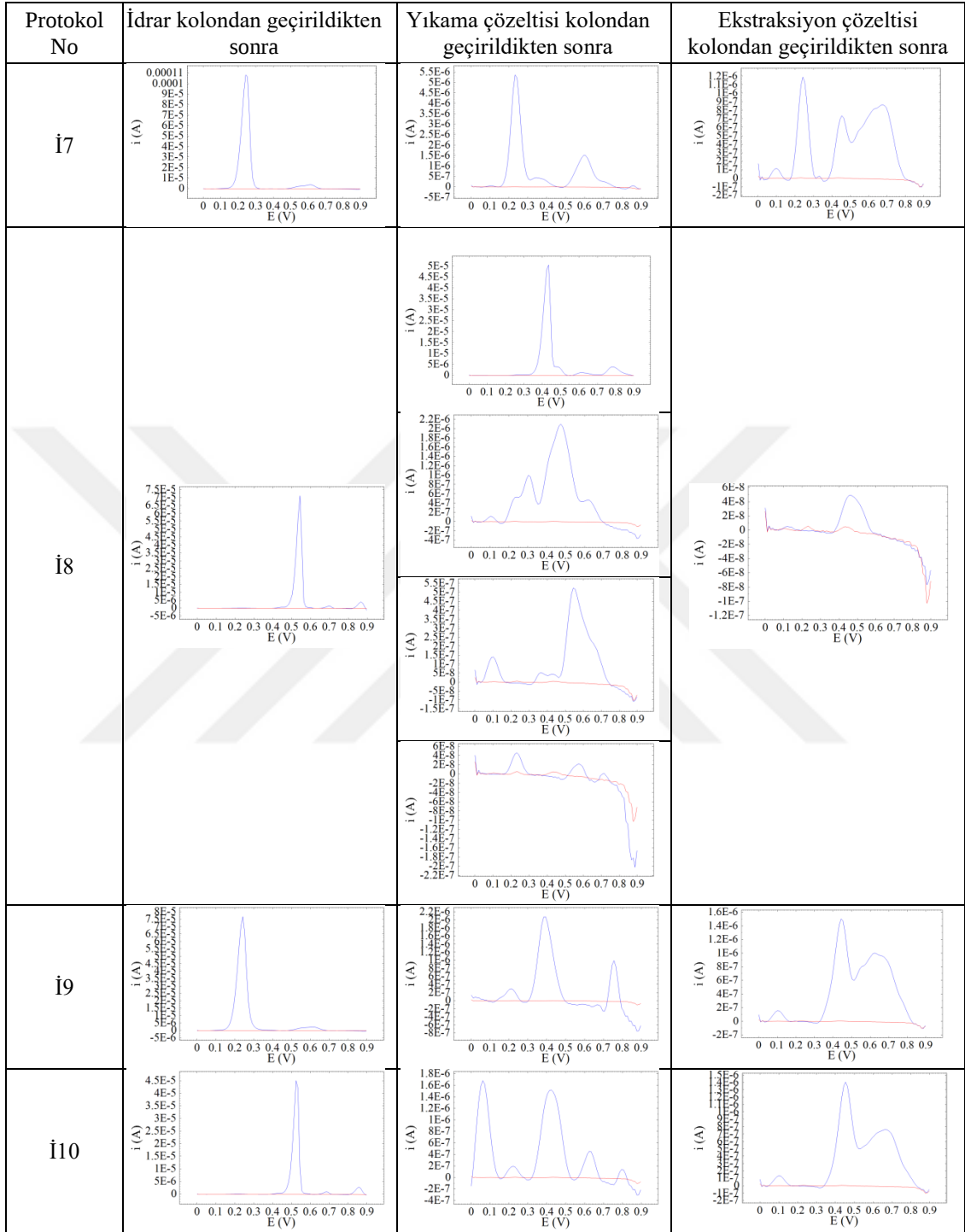
İdrarın katı faz ekstraksiyon kolonundan geçirilmesinde uygulanan protokollerden elde edilen çözeltilerin ince tabaka görüntüleri Şekil 4.64'te sunulmuştur.

Protokol no: İ1 	Protokol no: İ2 	Protokol no: İ3 	Protokol no: İ4 	Protokol no: İ5 
Protokol no: İ6 	Protokol no: İ7 	Protokol no: İ8 		Protokol no: İ9 
Protokol no: İ10 	Protokol no: İ11 			

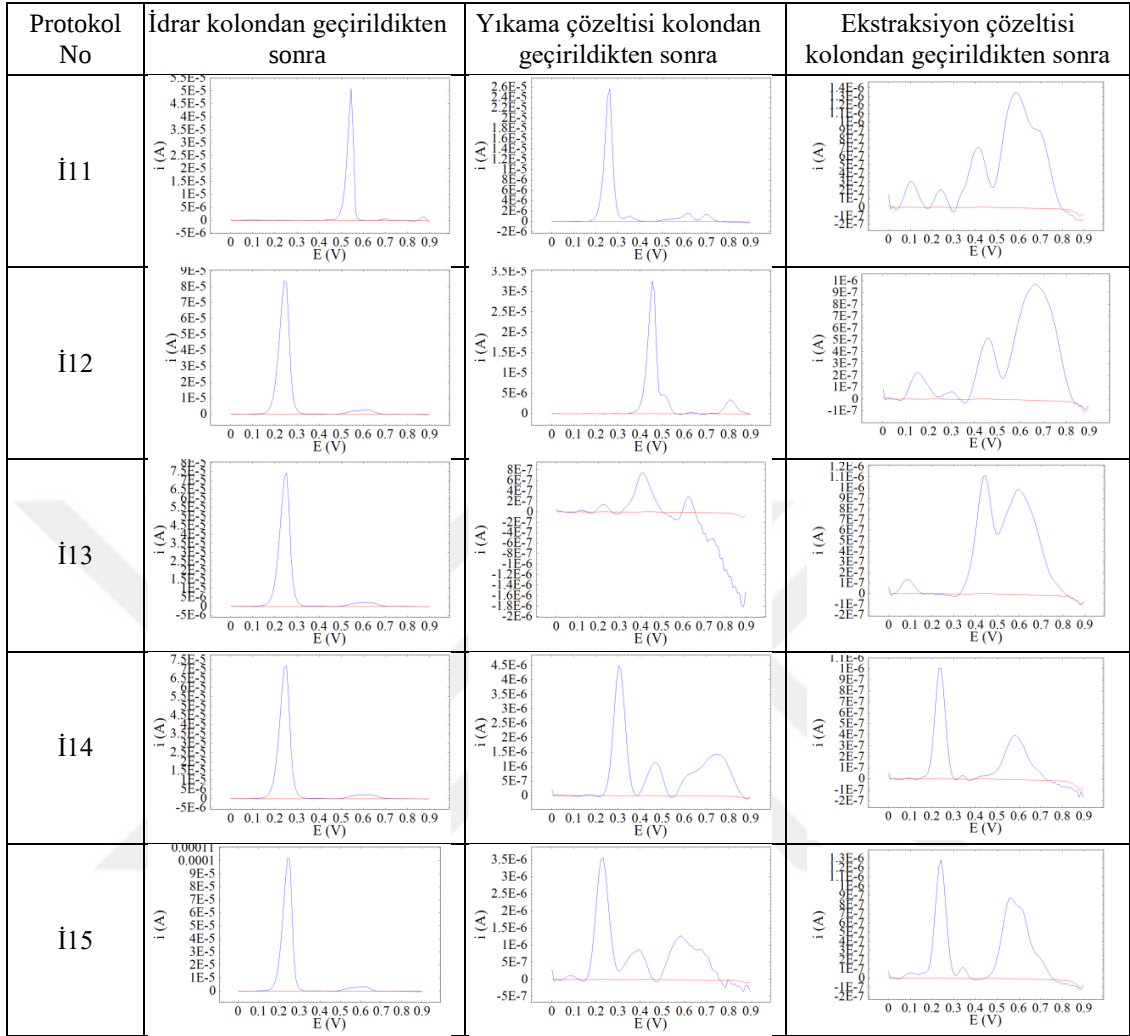
Şekil 4.64. İdrara ait katı faz ekstraksiyon kolonundan geçirilmiş çözeltilerin İTK görüntüleri (Tüm ince tabakalarda soldan sağa; örnek, yıkama çözeltisi/çözeltileri, ekstrakt)



Şekil 4.65. İdrar örneklerinin ekstraksiyon sıvılarına ait diferansiyel puls voltamogramları (Fosfat tamponu: Kırmızı, Kolondan geçirilmiş çözelti: Mavi)

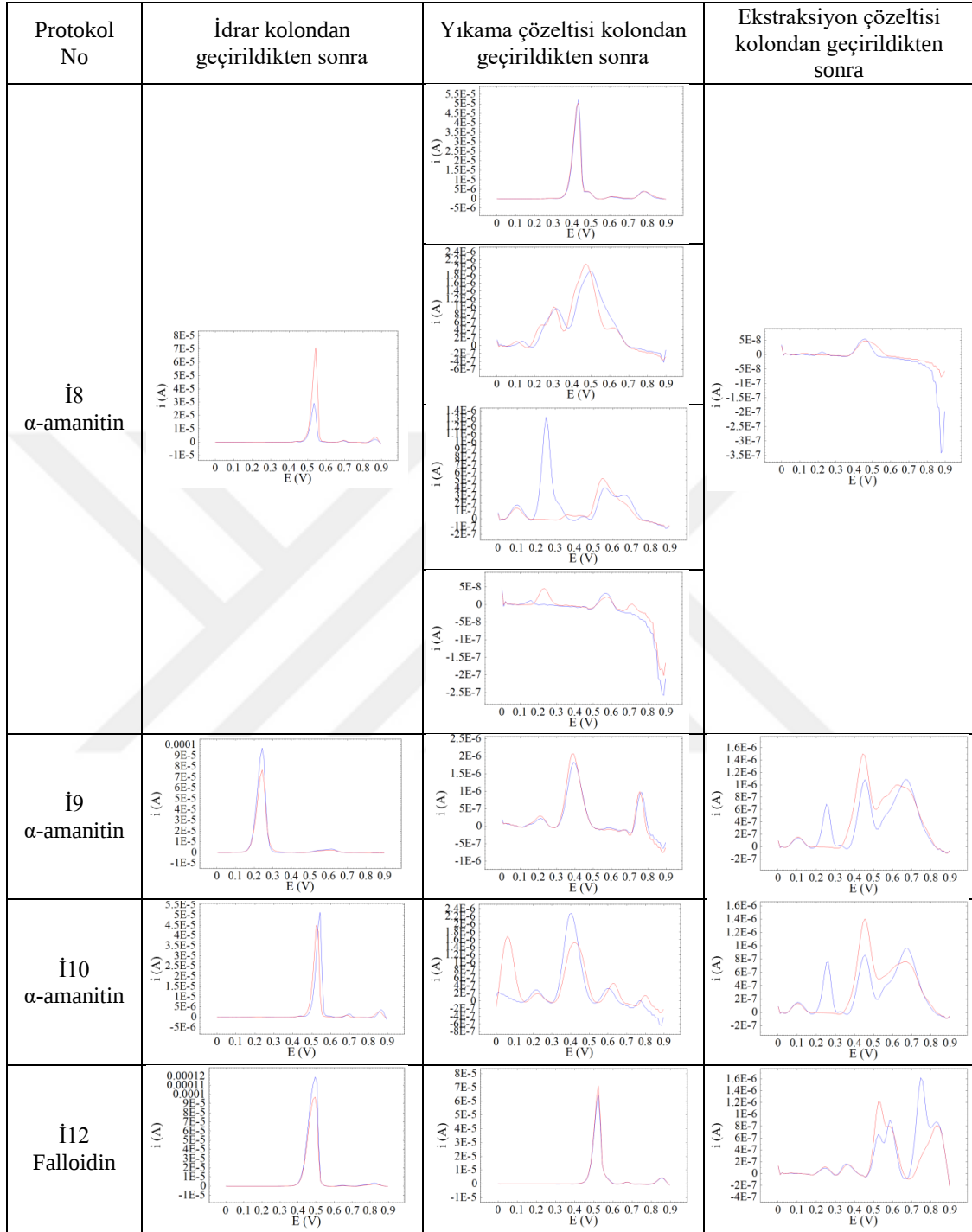


Şekil 4.65 (devam). İdrar örneklerinin ekstraksiyon sıvılarına ait diferansiyel puls voltamogramları (Fosfat tamponu: Kırmızı, Kolondan geçirilmiş çözelti: Mavi)



Şekil 4.65 (devam). İdrar örneklerinin ekstraksiyon sıvılarına ait diferansiyel puls voltamogramları (Fosfat tamponu: Kırmızı, Kolondan geçirilmiş çözelti: Mavi)

Şekil 4.65'te sunulan verilerin incelenmesi ile idrardan toksin ekstraksiyonu amacıyla uygulanan 15 farklı protokolden İ8, İ9 ve İ10 numaralı olanlarda α -amanitinin yükseltme bölgesinde bulunan pikin kaybolduğu görülmektedir. Falloidin ekstraksiyonu için ise İ12 kodlu protokol kullanılmıştır. Diğerlerine oranla daha uygun olduğu düşünülen protokoller idrara α -amanitin ve falloidin eklenerek tekrarlanmıştır. Elde edilen voltamogramlar Şekil 4.66'da ve bu voltamogramlarda toksinlere ait ortalma akım cevapları ile standart sapma değerleri Çizelge 4.20'de sunulmuştur.



Şekil 4.66. α -amanitin ve falloidin ilave edilen idrar örneklerinin ekstraksiyon protokollerinin diferansiyel puls voltamogramları (İdrar: Kırmızı, Toksin içeren idrar: Mavi)

Çizelge 4.20. İdrar örneklerine ilave edilen α -amanitin ve falloidin toksinlerinin farklı protokoller ile katı faz ekstraksiyonu sonucunda elde edilen akım cevapları

Protokol No	Toksin	Akım (μ A)
İ8	α -amanitin	-
İ9	α -amanitin	$0,721 \pm 0,026$
İ10	α -amanitin	$0,631 \pm 0,127$
İ12	Falloidin	$1,212 \pm 0,038$

Katı faz ekstraksiyon kolonları ile 1 ml biyolojik sıvı hacminde çalışılmış olup serum ve idrar örneklerine son derişimi 5×10^{-5} M (α -amanitin; 45,95 μ g/ml, falloidin; 39,45 μ g/ml) olacak şekilde ayrı ayrı toksin ilave edilmiştir. Elektrokimyasal hücrede çalışma hacminin 5 ml olması nedeniyle ekstraktlar DPV yöntemi kullanılarak incelenmeleri sırasında 5 kez toksine uygun pH değerindeki fosfat tamponu ile seyreltilmiştir. Toksinlerin biyolojik sıvılardan ayrıştırılarak tayinine ilişkin S1 ve S6 protokolüne ait akım cevapları incelendiğinde α -amanitin yaklaşık olarak %12 oranında tespit edildiği görülmüştür. Bu protokoller α -amanitin içermeyen serum örneklerine uygulandığında α -amanitin yükseltgendiği bölgede bir pik olmadığı görülmektedir.

İdrardan α -amanitin ekstraksiyonu sırasında İ8 protokolünden elde edilen veriler incelendiğinde toksinin 3. yıkama aşamasında kaybolduğu görülmüştür. Bu kolonlarda ekstraksiyon amaçlı kullanılan metanolün yıkama çözeltisinde de bulunmasının toksinin erken aşamada kolondan çıkmasına neden olduğu düşünülmüştür. İdrardan α -amanitin ekstraksiyon veriminin DPV yöntemi ile tayin edildiğinde yaklaşık %8 civarında olduğu görülmüştür. Falloidin biyolojik sıvılardan ekstraksiyon veriminin ise yaklaşık olarak serumda % 55, idrarda % 23 olduğu görülmüştür.

Oasis HLB tip kolonun çalışılan her iki toksinin biyolojik sıvılardan ekstraksiyonu amacıyla kullanımında, DPV yöntemi ile elde edilen veriler incelendiğinde akım cevaplarında düşüş olsa da elektroaktif bileşiklerin girişim etkisini

engellediği görülmüştür. Biyolojik sıvıların ekstraksiyon sonrasına kadar seyreltilmeden kullanılıp elektroaktif bileşenlerin ölçüm sonrasında görülmemesi büyük avantaj sağlamıştır. Biyolojik sıvılardan her iki toksinin ekstraksiyonu için seçilen protokollerin uygulanmasından elde edilen ekstraktlar aynı anda HPLC ile de analiz edilmiş ve ekstraksiyon protokolünün falloidin idrar ve serumdan ekstraksiyonu için tam verimli, α -amanitin serumdan ekstraksiyonu için %90, idrardan ekstraksiyonu için ise yaklaşık %38 verimle çalıştığı görülmüştür. Bu sonuçlar α -amanitin ve falloidin ekstraksiyonunun bahsedilen protokollerin uygulanması ile yüksek oranda gerçekleştiğini göstermiştir. DPV yöntemi kullanılarak toksin tayininde girişim etkisi kısmen giderilmiş ve bu bileşiklerin elektroaktif türler olduğu düşünülmüştür. Bu nedenle kullanılan protokollere gelecekte ilave bir ekstraksiyon aşaması eklenmesi düşünülmektedir. Bu aşamada seçilen katı faz ekstraksiyon kolonu kısa sürede kullanım, kullanım kolaylığı, kuruma ve mobil faz akış hızından etkilenmeme, oda koşullarında çalışılabilme, uzun süre stabil olarak saklanabilme ve manual olarak kullanılabilme gibi avantajlar sağlamıştır. Bu avantajların yanında maskeleyme etkisi oldukça yüksek olan ürik asit gibi serum ve idrar bileşeni olan bir bileşiğin herhangi bir seyreltme yapılmaksızın girişim etkisinden kurtulabilinmesi büyük önem taşımaktadır.

Bu iş paketindeki çalışmalar kapsamında serum ve idrar örneklerinden α -amanitin ve falloidin için protokoller geliştirilmiştir.

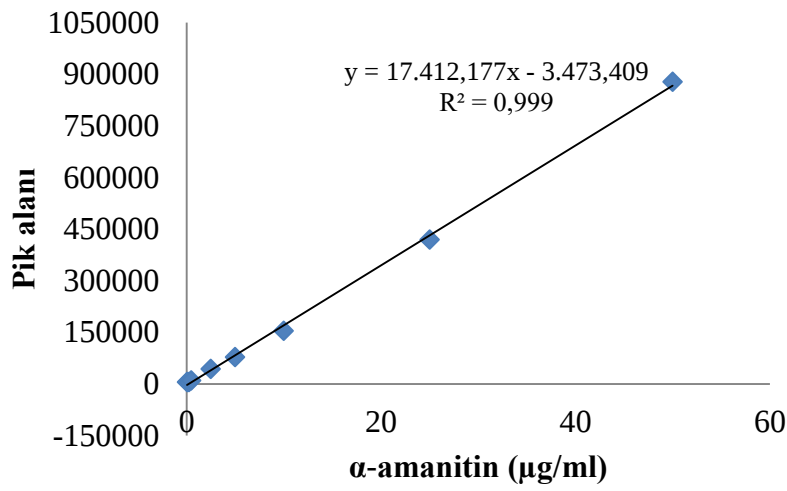
4.4. Elektrokimyasal Yöntemin HPLC ve ELISA Yöntemleri ile Karşılaştırılması

Elektrokimyasal yöntem ile elde edilen sonuçlar, genellikle bu toksinlerin tayini için tercih edilen HPLC ve ELISA yöntemleri kullanılarak elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılabilmesi amacı ile kullanılmıştır. Bu amaçla her iki yöntem ile standart çözeltiler ile serum ve idrar örneklerine ilave edilen α -amanitin ve falloidin toksinleri için elde edilen cevaplar değerlendirilmiştir.

Belirtilen HPLC koşullarında α -amanitin için elde edilen pik alanları ve bu değerler ile elde edilen kalibrasyon grafiği sırası ile Çizelge 4.21 ve Şekil 4.67'de sunulmuştur. Aynı bilgiler falloidin için Çizelge 4.22 ve Şekil 4.68'de ifade edilmiştir.

Çizelge 4.21. Farklı α -amanitin derişimleri için HPLC koşullarında elde edilen pik alan değerleri

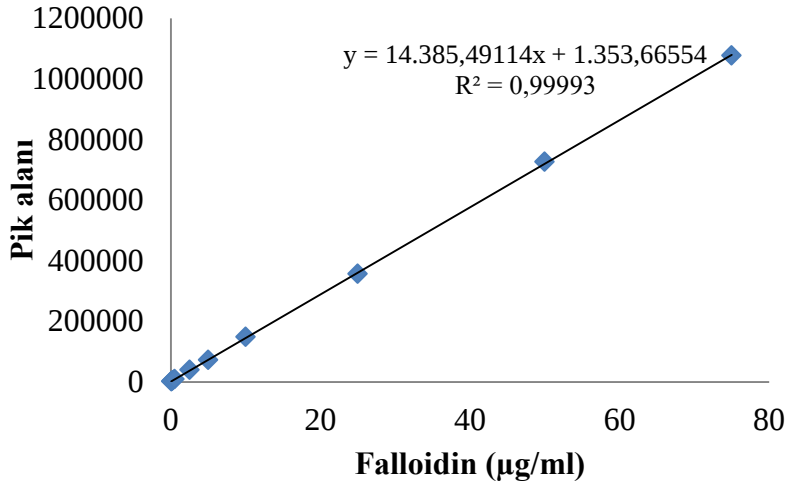
α -amanitin ($\mu\text{g/ml}$)	Pik alanı
0,05	5042
0,125	5233
0,25	4801
0,5	9820
2,5	42988
5	77164
10	154115
25	419090
50	877219



Şekil 4.67. Farklı α -amanitin derişimleri için HPLC koşullarında elde edilen kalibrasyon grafiği

Çizelge 4.22. Farklı falloidin derişimleri için HPLC koşullarında elde edilen pik alan değerleri

Falloidin (µg/ml)	Pik alanı
0,05	1412
0,125	2763
0,25	4166
0,5	8496
2,5	38860
5	72284
10	148154
25	356106
50	726699
75	1077473



Şekil 4.68. Farklı falloidin derişimleri için HPLC koşullarında elde edilen kalibrasyon grafiği

Kalibrasyon grafikleri elde edildikten sonra α -amanitin ve falloidin birbirene maskeleye/girişim etkisi olup olmadığı konusu araştırılmıştır. Bu toksinler zehirli mantarlarda birlikte bulunabildikleri için girişim etkisi özel öneme sahiptir. Bu amaçla 10 µg/ml derişimde α -amanitin ve falloidin yalnız başlarına ve 1:1 (v/v) oranında karıştırılarak HPLC koşullarında araştırılmıştır. α -amanitin miktarı 302 nm'de, falloidin miktarı ise 291 nm'de belirlenmiştir. Her ikisini içeren karışım hem 291 hem de

302 nm’de HPLC yöntemi ile incelenmiş ve bu yolla bir girişim/maskeleme olup olmadığı sorgulanmıştır. α -amanitin (10 $\mu\text{g/ml}$) ile 302 nm’de 157539 pik alan değeri elde edilirken, 10 $\mu\text{g/ml}$ falloidin ile 164629 pik alan değeri belirlenmiştir. Diğer taraftan 10 $\mu\text{g/ml}$ derişimde α -amanitin ve falloidinin 1:1 (v/v) oranında karıştırılması sonucunda elde edilen pik alan değerleri Çizelge 4.23’te ifade edilmiştir.

Çizelge 4.23. α -amanitin ve falloidinin (10 $\mu\text{g/ml}$) 1:1 (v/v) oranında karıştırılması sonucunda elde edilen pik alan değerleri

	291 nm	302 nm
α -amanitin	66860	76894
Falloidin	72662	56707

HPLC ile gerçekleştirilen üçüncü çalışma, 25 $\mu\text{g/ml}$ derişimde α -amanitin ve falloidinin serum ve idrar örneklerine ilave edildikten sonra farklı ekstraksiyon protokolleri uygulanarak HPLC ile miktar tayini yapılmasıdır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.24 ve 4.25’te ifade edilmiştir.

Çizelge 4.24. HPLC koşullarında α -amanitin katı faz ekstraksiyon verimi

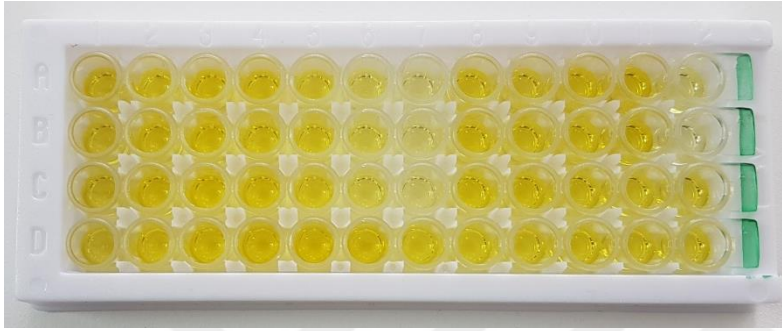
	Verim (%)
Serum + α -amanitin (25 $\mu\text{g/ml}$) (S1)	89,7
İdrar + α -amanitin (25 $\mu\text{g/ml}$) (İ9)	35,5
İdrar + α -amanitin (25 $\mu\text{g/ml}$) (İ10)	37,9

Çizelge 4.25. HPLC koşullarında falloidinin katı faz ekstraksiyon verimi

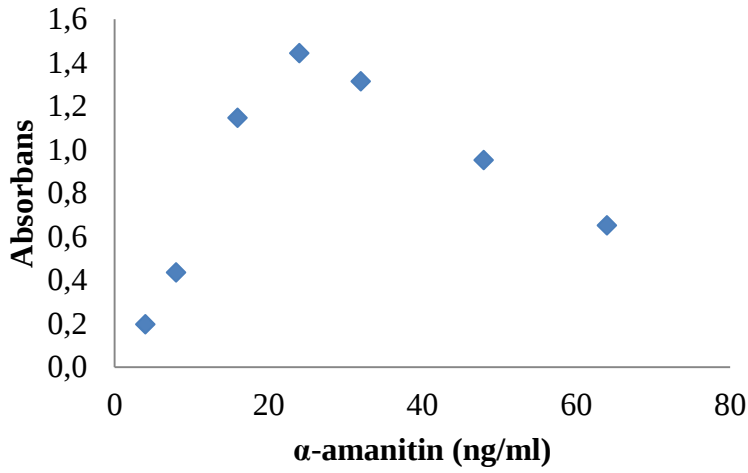
	Verim (%)
Serum+ Falloidin (25 $\mu\text{g/ml}$) (S1)	105,3
Serum + Falloidin (25 $\mu\text{g/ml}$) (S5)	102,5
İdrar + Falloidin (25 $\mu\text{g/ml}$) (İ12)	104,2

α -amanitin ticari ELISA kit ile belirlenmesi için üretici tarafından önerilen protokol izlenmesine karşın anlamlı ve tutarlı bir sonuç elde edilememiştir. Şekil 4.69’daki, görselden de anlaşılacağı üzere ELISA kitinde beklenen farklı

α -amanitin derişimine bağı renk değışimi gözlenememiştir. Kitin verimli çalışmamasının bir sonucu olarak ELISA kiti ile α -amanitin için tutarlı ve geçerli bir kalibrasyon grafiğı elde edilememiştir (Şekil 4.70). α -amanitin içeren ve içermeyen biyolojik sıvılar kullanılarak elde edilen absorbans değıerleri Çizelge 4.26'da sunulmuştur.



Şekil 4.69. Farklı α -amanitin derişimleri ve gerçek örnekler ile çalışılan ELISA kiti petrisi



Şekil 4.70. Farklı α -amanitin derişimleri için ELISA kiti ile elde edilen absorbans değıerleri

Çizelge 4.26. Amanitin ELISA kit kullanılarak biyolojik sıvılardan elde edilen absorbans değerleri

Deney grubu		Abs. 450 nm
Serum	-	1,422 ± 0,037
	8ng/ml α -amanitin	1,511 ± 0,684
	32ng/ml α -amanitin	1,907 ± 0,188
İdrar	-	0,616 ± 0,086
	8ng/ml α -amanitin	0,688 ± 0,042
	32ng/ml α -amanitin	0,683 ± 0,055

Duyarlı olması ve seçiciliği nedeniyle literatürde α -amanitin ve falloidin tayini amacıyla kullanılan yöntemler HPLC ve ELISA yöntemleridir. Çeşitli kaynaklardan edinilen bilgiler ışığında Çizelge 4.27’de bazı veriler sunulmuştur.

Çizelge 4.27. α -amanitin ve falloidin toksinlerinin tayini için HPLC ve ELISA yöntemleri kullanılan bazı çalışmalar

Analit	Örnek	Belirleme Limiti (ng/ml)	Doğrusal aralık (ng/ml)	Yöntem	Kaynak
α ve β -amanitin	İdrar, Serum, Mide içeriği	10	20-500	HPLC	Jehl vd., 1985
α -amanitin	Plazma	2	3 – 200	HPLC	Tagliaro vd., 1991
α -amanitin	Mantar	10	1-100	HPLC	Enjalbert vd., 1992
α ve β -amanitin	Plazma, İdrar, Mide sıvısı, feçes, doku	5	-	HPLC	Jaeger vd., 1993
α -amanitin	İdrar	10	10 – 200	HPLC	Defendenti vd., 1998
α -amanitin	Serum	6	20-500	HPLC	Zhou vd., 2011
α -amanitin	İdrar	0,22	-	ELISA	Anonymous, 2000
Amanitinler	Serum, idrar	2-10	-	ELISA	Gomolka vd., 2011
α , β ve γ amanitin	Mantar	1,9 2,1 2,8	-	ELISA	He vd., 2016

Biyolojik sıvılardan ekstraksiyon sonrası HPLC ile α -amanitin ve falloidin tayini yapılan çalışmalarda düşük tayin limitleri elde edilmesi ve bu çalışmada elde edilen kalibrasyon grafikleri gibi veriler bu yöntemin bahsedilen toksinlerin tayininde kullanımında oldukça güvenilir veriler sunduğunu kanıtlar niteliktedir. Ancak hastane acil servis polikliniklerinde kısa sürede toksin tayini yapılması ihtiyacı olduğunda biyolojik sıvılardan ön ekstraksiyon gereksinimi, cihaza ulaşım, tecrübeli personel gereksinimi, mobil faz çözelti hazırlığı süresi, kolonun şartlanma süresi, tayin süresi gibi dezavantajlar bulunmaktadır. Aynı zamanda *Amanita phalloides* ve benzer türlerin α -amanitin ve falloidin toksinlerinin her ikisini de bulundurması durumu düşünüldüğünde bu çalışmada da karşılaşılan toksinlerin birbirleri üzerine girişim etkisi yaratma sorunu bulunmaktadır. Elektrokimyasal yöntemler için de geçerli olan bu durum HPLC ile zehirli mantar örnekleri, idrar ve serumdan toksin ekstraksiyonu için aşılması gereken bir problemdir.

Ticari olarak edinilen ve seçiciliği açısından tercih edilen aynı zamanda da çok düşük derişimlerde tayin imkânı sağlayan ELISA temelli α -amanitin tayin kitlerinin kullanma kılavuzlarında sadece araştırma amaçlı kullanılması gerektiği söylenmektedir. Ayrıca fallotoksinlerle herhangi bir etkileşim görülmediği %100 oranında α -amanitin ile %90 oranında γ -amanitine ait miktar bilgisi verebildiği bu kılavuzlarda ifade edilmektedir. Bu kitlerin maliyetli oluşu, raf ömrünün kısa oluşu, uygulama süreleri, ekstra cihaz ihtiyacı, kit içerisindeki bazı çözücülerin ışık hassasiyeti, kullanıcı hatalarından ve çevresel koşullardan kolayca etkilenmeleri gibi dezavantajları vardır. Bu çalışma kapsamında α -amanitin tayini için bir ELISA kiti denenmiş olup, kitin seçicilik, hassasiyet, tekrarlanabilirlik problemi olduğu ve yanlış pozitif sonuçlar verdiği saptanmıştır. Çalışmada kullanılan α -amanitin ELISA tayin kiti ile elde edilen veriler sonucunda;

- Kit içerisinde bulunan α -amanitin standart çözeltisi kullanılarak kullanma kılavuzunda önerilen derişimler ile bir kalibrasyon grafiği hazırlanılmaya çalışılmış ancak derişime bağlı artan absorbans değerleri elde edilememiştir.

- Toksin ilave edilen ve edilmeyen biyolojik sıvılarda yakın absorbans değerleri elde edilmiştir. Bu veriler ışığında kitin yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlar verdiği görülmüştür.

- Farklı toksin derişimlerinde elde edilen benzer absorbans değeri ise örneklerde bulunan toksin miktarının yanlış tayinine ya da ortamda bulunan toksinin gözden kaçırılmasına sebep olabildiğı anlaşılmıştır.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada bazı makrofunguslarda bulunan letal etkiye sahip α -amanitin ve falloidin toksinlerinin biyolojik sıvılardan elektrokimyasal yöntemler kullanılarak tayini amaçlanmıştır. Çalışma 4 ana iş paketi kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Birinci iş paketinde α -amanitin ve falloidin toksinlerinin dönüşümlü voltametri (DV) yöntemi ile elektrokimyasal olarak doğrudan tayin edilebilirliği araştırılmış ve her iki toksinin de elektroaktif özellikte olduğu belirlenmiştir. Aynı iş paketi kapsamında, α -amanitin ve falloidin toksinlerinin tayininde etkin olarak kullanılabilecek elektrot sistemini seçebilmek için, toksinlerin 4 farklı elektrot sistemindeki akım cevabı karşılaştırılmıştır. Elde edilen voltamogramlar incelendiğinde her iki toksinin de çalışma elektrodu olarak kalem ucu elektrot (KUE) kullanılan elektrot sisteminde en iyi akım cevabı verdiği ve elektrot yüzeyinde gerçekleşen tepkimenin tersinmez özellikte olduğu görülmüştür. En yüksek akım cevabının KUE ile elde edilmesi; tek kullanımlık, ön hazırlık gerektirmeyen ve ucuz bir elektrot kullanabilme avantajlarını sağlamıştır. Bu verilerden yola çıkarak çalışmanın diğer aşamalarında çalışma elektrodu olarak KUE kullanılmıştır.

İkinci iş paketi kapsamında biyolojik sıvılarda girişim yapma ihtimali bulunan bazı elektroaktif bileşiklerin farklı pH değerlerindeki fosfat tamponu ortamında, diferansiyel puls voltametrisi (DPV) yöntemi kullanılarak davranışları araştırılmıştır. Serum, idrar ve mantar örneklerinde bulunan/bulunabilecek bazı elektroaktif bileşenlerin elektrokimyasal davranışlarının belirlenmesi, toksin tayinindeki etkileri açısından önemli ve gerekli bir uygulamadır. Bu amaçla; folik asit, ürik asit, dopamin, olası bir ağrı kesici alınması durumu için parasetamol, başta *A. phalloides* olmak üzere ölümcül zehirlenmelere neden olan makrofunguslarda bulunan β -amanitin, γ -amanitin ve fallasidin gibi diğer toksinlerin yükseltgenme potansiyelleri farklı pH değerlerinde incelenmiştir. Elde edilen veriler, dopamin dışında incelenen diğer bileşenlerin α -amanitin ve/veya falloidinin elektrokimyasal tayini üzerine girişim etkisinin olabileceğini göstermiştir.

Üçüncü iş paketinde biyolojik sıvılarda α -amanitin ve falloidin elektrokimyasal tayinine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, serum ve idrar örneklerinde bulunan diğer bileşenlerin de α -amanitin ve falloidin elektrokimyasal tayini üzerine etkilerini görebilmek amacıyla gerçek örnekler ile çalışılmıştır. Serum ve idrar ortamına eklenen toksinlerin varlıklarını görebilmek amacıyla bu biyolojik sıvılar seyreltilerek kullanılmışlardır. Uygun pH değerinde fosfat tamponu ile seyreltilerek kullanılan serum ve idrar örneklerine ayrı ayrı ve karışımlar halinde ilave edilen toksinlerin DPV yöntemi ile elde edilen akım cevaplarının incelenmesi sonucunda, α -amanitin ve falloidin her iki ortamda da akım cevaplarında anlamlı bir fark yaratmadığı gözlenmiştir. Bu durum, serum ve idrar örneklerinde bulunan diğer bileşenlerin α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal tayininde bir girişime neden olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Var olan girişim etkisinin aşılabilmesi amacı ile farklı alternatifler denenmiştir.

Girişim etkisi sorunu, KUE üzerinde gerçekleştirilen üç farklı alternatif uygulama ile aşılmaya çalışılmıştır. Bu alternatif uygulamalar ile geliştirilen elektrotlar, mantar zehirlenmelerinde letaliteden birinci derecede sorumlu olan α -amanitin elektrokimyasal tayini amacı ile denenmiştir. İlk alternatif olarak, fosfat tamponu ortamında α -amanitin DPV ile tayini, farklı asit ve baz çözeltileri içerisinde ön işlem uygulanmış KUE kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ön işlem çözeltisi olarak asetik asit, florosülfonik asit, fosforik asit ve sodyum hidroksit kullanılması durumunda, α -amanitin varlığı gözlenebilmiştir. Ancak, var olan akım cevabı sadece fosforik asit ön işlemi görmüş KUE ile yükseltilebilmiştir.

Girişim etkisini aşabilmek için ikinci alternatif olarak, α -amanitin ve farklı monomerler içeren ortamda KUE yüzeyinde moleküler baskılanmış polimer sentezi gerçekleştirilmiştir. Elektrot yüzeyinden α -amanitini uzaklaştırmak için bazı kimyasal ve elektrokimyasal işlemler uygulanmıştır. Bu yolla elde edilen elektrotlar fosfat tamponu ortamında α -amanitin DPV yöntemi ile tayin edilmesinde kullanılmıştır. Modifiye elektrotlar ile α -amanitin bazı gruplarda hiç belirlenemediği, bazılarında ise belirlendiği ancak modifiye edilmemiş KUE ile elde edilenden daha düşük akım

cevapları alındığı görülmüştür. Bu alternatif elektrot modifikasyon işlemi ile istenilen duyarlılıkta elektrot üretilmemesinin, α -amanitin yapıcı büyük bir molekül olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu nedenle, α -amanitin sentezlenen iletkin polimerler ile yapıya tam verimli katılamadığı veya elektrot yüzeyinde oluşan polimer yapısından verimli olarak uzaklaştırılamadığı öngörülmektedir. Ayrıca, modifikasyon işleminin başarısız oluşunda, α -amanitin maliyeti nedeniyle reaksiyon ortamına yüksek derişimlerde ilave edilememesinin diğer bir etken olabileceği tahmin edilmektedir.

Girişim etkisini aşabilmek için üçüncü alternatif olarak, yakın zamanda bir araştırma grubunun çalışmalarında sentezleyerek template olarak kullandığı, amatoksin ve fallotoksinler için spesifik olan triptatyonin yapısını da içeren bir template kimyasal yolla sentezlenerek modifikasyon işlemlerinde α -amanitin yerine kullanılmıştır. Bu template, yüksek derişimlerde kullanılabilecek ve α -amanitinden daha küçük bir molekül olması nedeni ile seçilmiştir. Elde edilen elektrotlar DPV yöntemi kullanılarak fosfat tamponu içerisinde α -amanitin tayini amacıyla kullanılmıştır. α -amanitin içermeyen serum ve idrar örnekleri ile α -amanitin içeren fosfat tamponu ortamlarında yapılan analizler, hazırlanan elektrotların istenilen duyarlılık ve seçicilikte olmadığını göstermiştir. Sonuç olarak çalışma kapsamında gerçekleştirilen üç farklı elektrot modifikasyon denemesi ile girişim etkisinin giderilemediği ortaya çıkmıştır.

Farklı elektrot modifikasyon işlemleri ile aşılamayan girişim etkisi elektrokimyasal tayin öncesi biyolojik sıvılardan toksin ekstraksiyonu ile aşılmaya çalışılmıştır. Bu amaçla kullanılan katı faz ekstraksiyon kolonu ile serum ve idrar örneklerinden α -amanitin ve falloidin ekstraksiyonu amacıyla farklı protokoller araştırılmıştır. Uygulanan bazı protokoller ile serum ve idrar örneklerinde bulunan ve girişim etkisine neden olan bazı elektroaktif bileşenlerin seyreltme yapılmaksızın ekstraktlardan ayrılabilirdiği görülmüştür. Katı faz ekstraksiyon işlemi ile elde edilen ekstraktların fosfat tamponu ortamında içerdiği α -amanitin ve falloidin toksin miktarları DPV yöntemi ile belirlenmiş olup, ortamda bulunan toksin miktarından daha düşük bir verimle tayin gerçekleştirilmiştir.

Dördüncü iş paketinde toksin tayini için yaygın olarak kullanılan HPLC ve ticari olarak edinilmiş ELISA kiti ile α -amanitin tayini gerçekleştirilmiştir. HPLC ile α -amanitin ve falloidin standartları ile kalibrasyon grafikleri hazırlanmış olup, kullanılan toksin derişimi ve elde edilen cevaplar arasında bir korelasyon olduğu görülmüştür. Daha sonra, α -amanitin ve falloidin ekstraksiyonu için seçilen katı faz ekstraksiyon protokolleri ile elde edilen ekstraktların HPLC yöntemi ile tayini gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler falloidinin serum ve idrardan tamamının ekstrakte edilebildiğini, α -amanitin serumdan neredeyse tamamen, idrardan ise daha düşük bir verimle ekstrakte edilebildiğini göstermiştir. α -amanitin ELISA kiti ile tayini sırasında hazırlanan kalibrasyon grafiğı verileri, standart çözeltiler ile kitin verimli biçimde çalışmadığını göstermiştir. Dahası, α -amanitin içeren ve içermeyen serum ve idrar örneklerine ait elde edilen absorbans verilerinin oldukça yakın değerler olduğu görülmüştür. Bu nedenlerle, çalışma kapsamında kullanılan ELISA kitinin α -amanitin tayini amacı ile verimli ve güvenilir biçimde kullanılamayacağı ortaya çıkmıştır.

Bu araştırma kapsamında elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesinin sonuçları olarak;

- a. α -amanitin ve falloidinin elektroaktif toksinler olduğu belirlenmiş,
- b. Biyolojik sıvılardan α -amanitin ve falloidinin elektrokimyasal tayini için birçok elektrot modifikasyon yöntemi sorgulanmış,
- c. Serum ve idrar örneklerinden α -amanitin ve falloidinin ekstraksiyonu amacıyla birçok protokol denenmiş ve bazı katı faz ekstraksiyon yöntemleri ile başarılı olunabileceğı gösterilmiş,
- d. Serum ve idrar örneklerinden α -amanitin ve falloidin ekstraksiyonu için seçilen ekstraksiyon protokollerinin HPLC yöntemi ile tayin amacıyla da kullanılabileceğı belirlenmiş,
- e. Ticari olarak edinilen α -amanitin ELISA tayin kitinin ise çeşitli nedenlerle güvenilir sonuçlar vermeyebileceğı anlaşılmıştır.

Bu çalışma ile α -amanitin ve falloidin toksinlerinin hızlı biçimde belirlenmesine yönelik semikantitatif bir yöntemin geliştirildiğı düşünülmektedir. Elde

edilen veriler serum ve idrar örneklerinden yapılan ekstraksiyon işlemleri ile toksinlerin geri kazanılabildiğini, ancak DPV yöntemi ile ortamda bulunan toksinlerin tamamının tayin edilemediğini göstermiştir. Aynı zamanda, geliştirilen elektrokimyasal yöntemle rakip ya da daha duyarlı yöntemler olarak görülen HPLC ve ELISA gibi yöntemlerin de maskeleye ve tutarsızlık gibi dezavantajları olduğu anlaşılmıştır.

Sonuç olarak, öldürücü makrofungus toksinleri olan α -amanitin ve falloidin toksinlerinin elektrokimyasal yöntemlerle ile tayini, hızlı ve duyarlı bir biçimde tayin yapılması için bir alternatif durumundadır. Bu araştırma ile semikantitatif olarak geliştirilen yöntemin seçicilik ve duyarlılık seviyesini arttırarak hızlı, ucuz, taşınabilir ve yaygınlaşabilir bir kantitatif yöntem geliştirmenin mümkün olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abuknesha, R.A., Maragkou, A., 2004, A highly sensitive and specific enzyme immunoassay for detection of beta-amanitin in biological fluids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379, 853–860.
- Ahıskalı, E., Boynuegri, B., Ozpolat, E., Surmeli, H., Dolapcioglu, C. vd., 2012, Approach to mushroom intoxication and treatment: Can we decrease mortality?, *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 36, 139-145.
- Aji, D.Y., 2001, Çocukluk çağında zehirlenmeler ve mantar zehirlenmesi, *Pediyatrik Aciller Sempozyumu*, 14-15 Haziran 2001, İstanbul, s. 69-78.
- Akköse, S., Bulut, M., Armagan, E., Cebicci, H., Fedakar, R., 2005, Acute poisoning in adults in the years 1996-2001 treated in the Uludag University Hospital, Marmara Region, Turkey, *Clinical Toxicology (Phila)*, 43, 105-9.
- Alagözlü, H., Sezer, H., Candan, F., 2002, A survey of patients with acute poisoning in the Sivas region. Turkey, between 1994 and 1998, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 32, 39-42.
- Andres, R.Y., Frei, W., Gautschi, K., Vorderschmitt, D.J., 1986, Radioimmunoassay for Amatoxins by Use of a Rapid, 125I-Tracer-Based System, *Clinical Chemistry*, 32, 1751–1755.
- Anonim, 2017a, <http://www.scopus.com/home.url>, erişim tarihi: 15.8.2017
- Anonim, 2017b, <http://apps.webofknowledge.com>, erişim tarihi: 15.8.2017
- Anonim, 2017c, http://www.mykonet.ch/images/Lamellenpilze/amanita_phalloides, erişim tarihi: 15.8.2017
- Anonim, 2017d, <https://www.emaze.com/@AOQZWRFC>, erişim tarihi: 15.8.2017
- Anonim, 2017e, <http://www.agraria.org/funghi/amanitaverna.htm>, erişim tarihi: 15.8.2017
- Anonymous, 2000, Bühlmann Laboratories, Amanitin-ELISA, Instruction manual, Bühlmann Laboratories, Allschwil (Switzerland).
- Arıcı, A., 2012, Siklopeptid içeren mantarlarla zehirlenmeler: *Amanita phalloides* zehirlenmeleri, *Türk Farmakoloji Derneği Klinik Toksikoloji Çalışma Grubu*, 2, 26-36.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ayoğlu, F.N., Ayoğlu, H., Kaptan, Y.M., Özkoçak Turan, I., 2009, A Retrospective Analysis of Cases with Acute Poisoning in Zonguldak, Turkey, Journal of the Turkish Anaesthesiology and Intensive Care, 37(4), 240-8.
- Berger, K.J., Guss, M.D., 2005, Mycotoxins revisited: Part 1, The Journal of Emergency Medicine, 28, 1, 53-62.
- Beug, M.W., Shaw, M., Cochran, K.W., 2006, Thirty-Plus Years of Mushroom Poisoning: Summary of the Approximately 2000 Reports in the NAMA Case Registry, McIlvainea, 16 (2), 47-68.
- Beuhler, M., Lee, D.C., Gerkin, R., 2004, The Meixner Test in the Detection of α -Amanitin and False-Positive Reactions Caused by Psilocin and 5-Substituted Tryptamines, Annals of Emergency Medicine, 44, 114-120.
- Bidnychenko, Y., 2001, Detecting Mushroom Peptide Toxins in Body Fluids by Capillary Electrophoresis, LC GC, 19 (9), 1000-1002.
- Bresinsky, A., Besl, H., 1985, *Amanita phalloides*, Grüner Knollenblätterpilz. In: Bresinsky, A., Besl H.,(eds.) Giftpilze, Stuttgart: Verlag mbH, 26-9.
- Çetin, H., 2007, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dahiliye ve Pediatri Kliniklerinde 2005 ve 2006 Yıllarında Mantar İntoksikasyonu Ön Tanısıyla Yatırılan Hastaların Retrospektif Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği Koordinatörlüğü, 108 s.
- Çevik, A.A., Ünlüoğlu, İ., Ergün, N., Şahin, A., 2007, Poisoning Severity Scores of Cases with Mushroom Poisoning Presenting to the Emergency Department, Turkish Journal of Emergency Medicine, 7(3), 102-108.
- Dai, Z., Shao, G., Hong, J., Bao, J., Shen, J., 2009, Immobilization and direct electrochemistry of glucose oxidase on a tetragonal pyramid-shaped porous ZnO nanostructure for a glucose biosensor, Biosensors and Bioelectronics, 24, 1286-1291.
- Defendenti, C., Bonacina, E., Mauroni, M., Gelosa L., 1998, Validation of a high performance liquid chromatographic method for alpha amanitin determination in urine, Forensic Science International, 92, 59-68.
- Dökmeci, İ., 1994, Toksikoloji akut zehirlenmelerde tanı ve tedavi, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dönmez, O., Çetinkaya, M., Emir, G., 2001, *Amanita phalloides* zehirlenmesinde hemoperfüzyon: İki olgu takdimi, Official Journal of the Turkish Society of Nephrology, 10(4), 254-6.
- Eggins, B.R., 2002, Chemical Sensors and Biosensors, John Wiley & Sons Ltd., p. 273.
- Enjalbert, F., Gallion, C., Jehl, F., Monteil, H., Faulstich, H., 1992, Simultaneous assay for amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* Fr. by high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography A, 598, 227–236.
- Eren, S.H., Demirel, Y., Ugurlu, S., Korkmaz, I., Aktas, C. vd., 2010, Mushroom poisoning: retrospective analysis of 294 cases, Clinics (Sao Paulo), 65, 491-6.
- Ergüven, M., Cakı S, Deveci, M., 2004, Mushroom poisoning: Evaluation of 28 cases. Journal of Pediatric Health and Diseases, 47(4), 249-53.
- Ergüven, M., Yilmaz, O., Deveci, M., Aksu, N., Dursun, F., vd., 2007, Mushroom poisoning, Indian Journal of Pediatrics, 74, 847–52.
- Escudié, L., Francoz, C., Vinel, J.P., Moucari, R., Cournot, M. vd., 2007, *Amanita phalloides* poisoning: Reassessment of prognostic factors and indications for emergency liver transplantation, Journal of Hepatology, 46, 466-473.
- Faulstich, H., Trischmann, H., Zobeley, S., 1975, A radioimmunoassay for amanitin, FEBS Letters, 56 (2), 312–315.
- Faulstich, H., 1980, Mushroom poisoning, Lancet, 2, 794.
- Gil, E.S., Melo G.R., 2010, Electrochemical biosensors in pharmaceutical analysis, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 46, 3, 375-91.
- Gill, R.Q., Sterling, R.K., 2001, Acute liver failure, Journal of Clinical Gastroenterology, 33, 191–8.
- Gomólka, E., Szpak, D., Morawska, A., 2011, Evaluation of the diagnostic usefulness of amanitin determination by enzyme-link immunosorbent assay (ELISA), Problems of Forensic Sciences, LXXXV, 64–74.
- Gonmori, K., Minakata, K., Suzuki, M., Yamagishi, I., Nozawa H. vd., 2012, MALDI-TOF mass spectrometric analysis of α -amanitin, β -amanitin, and phalloidin in urine, Forensic Toxicology, 30, 179–184.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- He, K., Zhang, X., Zhao, R., Wang, L., Feng, T. vd., 2016, An enzyme-linked immunosorbent assay and a gold-nanoparticle based immunochromatographic test for amatoxins using recombinant antibody, *Microchimica Acta*, 183, 2211–2219.
- Himmelman, A., Mang, G., Schnorf-Huber, S., 2001, Lethal ingestion of stored *Amanita phalloides* mushrooms, *Swiss Medical Weekly*, 20, 131(41-42), 616-7.
- Hocaoğlu, N., Kalkan, Ş., Tunçok, Y., 2010, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç ve Zehir Danışma Merkezine Bildirilen Mantar Zehirlenmeleri, *Türkiye Acil Tıp Dergisi - Turkish Journal of Emergency Medicine*, 10(3), 119-25.
- Huang, L., Jiao, S., Li, M., 2014, Determination of uric acid in human urine by eliminating ascorbic acid interference on copper(II)-polydopamine immobilized electrode surface, *Electrochimica Acta*, 121, 233– 239.
- Iliev, Y., Andonova, S., Akabaliev, V., 1999, Our experience in the treatment of acute *Amanita phalloides* poisoning, *Folia Medica*, 41(4), 30-36.
- Işıloğlu, M., Gücin, F., Mat, A., 1995, Kasım 1994'te İstanbul'da meydana gelen mantar zehirlenmeleri, *Ekoloji-Çevre Dergisi*, 4 (14), 22-8.
- Jaeger, A., Jehl, F., Flesch, F., Sauder, P., Kopferschmitt, J., 1993, Kinetics of amatoxins in human poisoning: therapeutic implications, *Clinical Toxicology*, 31, 63–80.
- Jander, S., Bischoff, J., Woodcock, B.G., 2000, Plasmapheresis in the treatment of *Amanita phalloides* poisoning: II. A review and recommendations, *Therapeutic Apheresis and Dialysis*, 4, 308-12.
- Jehl, F., Gallion, C., Birckel, P., Jaeger, A., Flesch, F. vd., 1985 , Determination of α -amanitin and β -amanitin in human biological fluids by high-performance liquid chromatography, *Analytical Biochemistry*, 149(1), 35–42.
- Kalkan, Ş., Tunçok, Y., Güven, H., 1998, İlaç ve Zehir Danışma Merkezine bildirilen olgular, *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 12, 275-83.
- Leite, M., Freitas, A., Azul, A.M., Barbosa, J., Costa, S. vd., 2013, Development, optimization and application of an analytical methodology by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for determination of amanitins in urine and liver samples, *Analytica Chimica Acta*, 799, 77– 87.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Li, J., Yang, Z., Tang, Y., Zhang, Y., Hu, X., 2013, Carbon nanotubes-nanoflake-like SnS₂ nanocomposite for direct electrochemistry of glucose oxidase and glucose sensing, *Biosensors and Bioelectronics*, 41, 698–703.
- Li, J., Tang, Y., Yang, J., Yang, Z., Zhang, Y. vd., 2014, Cage-like PbS nanostructure for the construction of novel glucose electrochemical biosensor, *Sensors and Actuators B*, 190, 549– 554.
- Li, Y., Tan, L., Li, H., Xu, Z., Zuo, X. vd., 2014, An artificial receptor fabricated by target recognition determinant imprinting for selective capture of α -amanitin, *Journal of Chromatography*, 1324, 190-197.
- Mat, A., 2000, Türkiye’de mantar zehirlenmeleri ve zehirli mantarlar, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, s 155.
- Maurer, H.H., Kraemer, T., Ledvinka, O., Schmitt, C.J., Weber, A.A., 1997, Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) in toxicological analysis Studies on the detection of clobenzorex and its metabolites within a systematic toxicological analysis procedure by GC-MS and by immunoassay and studies on the detection of oL- and [3-amanitin in urine by atmospheric pressure ionization electrospray LC-MS, *Journal of Chromatography B*, 689, 81-89.
- Maurer, H.H., Schmitt, C.J., Weber A.A., Kraemer. T., 2000, Validated electrospray LC-MS assay for determination of the mushroom toxins alpha- and beta-amanitin in urine after immunoaffinity extraction, *Journal of Chromatography B*, 748, 125-35.
- Mueller, G.M., Schmit, J.P., Leacock, P.R., Buyck, B., Cifuentes, J. vd., 2007, Global diversity and distribution of macrofungi, *Biodiversity and Conservation*, 16, 37–48.
- Mutlu, M., Cansu, A., Karakas, T., Kalyoncu, M., Erduran, E., 2010, Pattern of pediatric poisoning in the east Karadeniz region between 2002 and 2006: increased suicide poisoning, *Human & Experimental Toxicology*, 29, 131-6.
- Nomura, M., Suzuki, Y., Kaneko, R., Ogawa, T., Hattori, H. vd., 2012, Simple and rapid analysis of amatoxins using UPLC–MS–MS, *Forensic Toxicology*, 30:185–192.
- Nordt, S.P., Manoguerra, A., Clark, R.F., 2000, 5-Year analysis of mushroom exposures in California, *The Western Journal of Medicine*, 173, 314-7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Özayar, E., Değerli, S., Güleç, H., Şahin, Ş., Dereli, N., 2011, Yoğun Bakıma Kabul Edilen Zehirlenme Olgularının Retrospektif Analizi, Yoğun Bakım Dergisi, 3, 59-62.
- Özcan, N., İkinciogulları, D., 2009, Ulusal Zehir Danışma Merkezi 2008 Yılı Çalışma Raporu Özeti, Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi, 66, 29-58.
- Pajoumand, A., Shadnia, S., Efricheh, H., Mandegary, A., Hassanian-Moghadam, H. vd. 2005, A retrospective study of mushroom poisoning in Iran. Human & Experimental Toxicology, 24, 609-13.
- Parant, F., Peltier, L., Lardet, G., Pulce, C., Descotes, J. vd. 2006, Phalloidin syndrome: role of ELISA-based assay for the detection of alpha- and gamma-amanitins in urine. Preliminary results, Acta clinica Belgica. Supplementum Journal, 1, 11-7.
- Pozo, M., Mejías, J., Hernández, P., Quintana, C., 2014, Cucurbit[8]uril-based electrochemical sensors as detectors in flow injection analysis. Application to dopamine determination in serum samples, Sensors and Actuators B, 193, 62–69.
- Robinson-Fuentes, V.A., Jaime-Sanchez, J.L., Garcia-Aguilar, L., Gomez-Peralta, M., Vazquez-Garciduenas M.S. vd., 2008, Determination of alpha- and beta-amanitin in clinical urine samples by Capillary Zone Electrophoresis, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 47, 913–7.
- Satar, S., Seydaoglu, G., Akpınar, A., Sebe, A., Karakoc, E. vd., 2009, Trends in acute adult poisoning in a ten-year period in Turkey: factors affecting the hazardous outcome, Bratislavske Lekarske Listy, 110, 404-11.
- Staack, R.F., Maurer, H.H., 2000, New Bühlmann ELISA for determination of Amanitins in urine – Are there false positive results due to interferences with urine matrix, drugs or their metabolites, Toxichem Krimtech, 68, (2) 65-70.
- Tagliaro, F., Schiavon, G., Bontempelli, G., Carli, G., Marigo, M., 1991, Improved high-performance liquid chromatographic determination with amperometric detection of a-amanitin in human plasma based on its voltammetric study, Journal of Chromatography, 563, 299-311.
- Tomkova, J., Ondra, P., Válka, I., 2015, Simultaneous determination of mushroom toxins α -amanitin, β -amanitin and muscarine in human urine by solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with ultra-high-resolution TOF mass spectrometry, Forensic Science International, 251, 209–213.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tsai, T.C., Huang, F.H., Chen, J.J., 2013, Selective detection of dopamine in urine with electrodes modified by gold nanodendrite and anionic self-assembled monolayer, *Sensors and Actuators B*, 181, 179–186.
- Unluoglu, I., Tayfur, M., 2003, Mushroom poisoning: an analysis of the data between 1996 and 2000, *European Journal of Emergency Medicine*, 10, 23-6.
- Unluoglu, I., Cevik, A.A., Bor, O., Tayfur, M., Sahin, A., 2004, Mushroom poisonings in children in Central Anatolia, *Veterinary and Human Toxicology*, 46, 134-7.
- Vetter, J., 1998, Toxins of *Amanita phalloides*, *Toxicon*, 36, 1, 13-24.
- Webster, J., Weber, R., 2007, *Introduction to Fungi*, Cambridge University Press, p. 841.
- Wu, Y., Hu, S., 2007, Direct electrochemistry of glucose oxidase in a colloid Au–dihexadecylphosphate composite film and its application to develop a glucose biosensor, *Bioelectrochemistry*, 70, 335–341.
- Yardan, T., Eden, A.O., Baydin, A., Arslan, B., Vural, K., 2008, Mantar zehirlenmeleri, *O.M.Ü. Tıp Dergisi*, 25(2): 75–83.
- Yardan, T., Baydin, A., Eden, A.O., Akdemir, H.U., Aygun, D. vd., 2010, Wild mushroom poisonings in the Middle Black Sea region in Turkey: Analyses of 6 years, *Human and Experimental Toxicology*, 29(9), 767–71.
- Yoshioka, N., Akamatsu, S., Mitsuhashi, T., Todo, C., Asano, M. vd., 2014, A simple method for the simultaneous determination of mushroom toxins by liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry, *Forensic Toxicology*, 32, 89–96.
- Zhang, X., Ju, H., Wang, J., 2008, *Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications*, Elsevier Inc., p. 593.
- Zhou, Z., Cao, M., Zhou, L., Zuo, X., Tang, Y., 2011, Determination of a-Amanitin in Human Serum by Solid-Phase Extraction Coupled with HPLC-UV, *LCGC North America*, 29(8), 672-677.
- Zhu, L., Xu, L., Tan, L., Tan, H., Yang, S. vd., 2013, Direct electrochemistry of cholesterol oxidase immobilized on gold nanoparticles-decorated multiwalled carbon nanotubes and cholesterol sensing, *Talanta*, 106, 192–199.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşe Betül Karaduman 1984 yılı Eskişehir doğumludur. T.C. vatandaşıdır. Lisans öğrenimini Eskişehir Osmangazi Üniversitesinde, 2005 yılında tamamlamış olup aynı üniversitede yüksek lisans eğitimine başlamıştır. Yüksek lisans süresince “Metal tolerant aktinomiset izolatlarının eldesi, karakterizasyonu ve ağır metal giderimi” konulu bir tez hazırlamış ve 2008 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlamıştır. Doktora eğitimine 2010 yılında başlayarak bu süreç içerisinde çeşitli eğitim ve seminerlere katılmış ve farklı projelerin deneysel süreçlerinde araştırmacı olarak yer almıştır. Çalışma konuları arasında aktinomisetler ve makrofungusların biyoaktif metabolit üretim yeteneklerinin araştırılması, farklı tip fermentörlerin de içerisinde yer aldığı endüstriyel ve çevresel mikrobiyoloji uygulamaları ile bazı elektrokimyasal yöntemlerin çeşitli amaçlar ile kullanımı yer almaktadır.