

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ
ANABİLİM DALI**



**RATLARDA ATRAKTİLOZİDİN BAZI
TOKSİKOKİNETİK PARAMETRELERİNİN
BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Yasin ÖZTÜRK

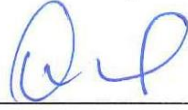
ELAZIĞ - 2020

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU

Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

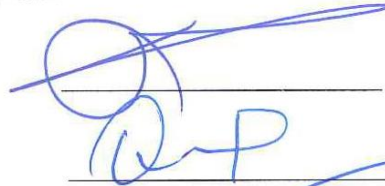


Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU

Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Sadettin TANYILDIZI



Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU



Prof. Dr. Osman ÇİFTÇİ



Doç Dr. Burcu GÜL BAYKALIR



Dr. Öğrt. Üyesi Neşe BAŞAK TÜRKMEN





ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Yasin ÖZTÜRK

04/08/2020

A handwritten signature in purple ink, reading 'Yasin Öztürk'.

Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU

Farmakoloji ve Toksikoloji
Anabilim Dalı
ELAZIĞ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sırasında üzerime emeği geçen öncelikle Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Gürdal DAĞOĞLU' na, Tez İzleme Komitesi Üyeleri Prof. Dr. Sadettin TANYILDIZ ve Dr. Öğr. Üyesi Elif ONAT'a; Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine, Araştırma Görevlileri Zeliha KESKİN ve Fatih Ahmet KORKAK'a şükranlarımı sunuyorum.

Yasin ÖZTÜRK

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLOLAR LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
KISALTMA LİSTESİ	ix
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Atraktilozid	7
3.1.1. Atraktilozidin Kimyasal Yapısı	13
3.1.2. Atraktilozidin Biyolojik Etkileri	14
3.1.3. Atraktilozidin Metabolizması	19
3.1.4. Atraktilozidin Mitokondriyal Fosforilasyonunu İnhibe Eden Etkileri	21
3.1.5. Atraktilozid Maruziyeti	22
3.1.6. Atraktilozid Toksisitesi	24
3.1.6.1. Nefrotoksik etkiler	25
3.1.6.2. Hepatotoksik Etkiler	27
3.1.6.3. Kardiyotoksik Etkiler	28
3.1.7. Toksik Etkilerin Modülasyonu	28
3.1.8. Deneysel Olarak İndüklenen Lezyonlar	31

3.1.9. Atraktilozid Toksisitesi ile İlgili Bazı Vakalar	32
4. GEREÇ ve YÖNTEM	35
4.1. Gereçler	35
4.1.1. Cihaz ve Malzemeler	35
4.1.2. Kimyasallar	36
4.2. Yöntem	36
4.2.1. Hayvan Materyali	36
4.2.2. Kan Atraktilozid Analizi.....	37
4.2.3. Standart Eğrisinin Hazırlanması	38
4.2.4. Yöntemin Geri Kazanımının Tespiti.....	38
4.2.5 Toksikokinetik ve İstatiksel Analiz Bilgileri	39
5. BULGULAR	40
5.1. Kan Atraktilozid Standart Eğrisi	40
5.2. Kan Atraktilozid Geri Kazanımı ve Saptama Limiti.....	41
5.3. Elde Edilen Bazı Toksikokinetik Değişkenler	42
6. TARTIŞMA	45
7. SONUÇ.....	49
8. KAYNAKLAR	50
9. ÖZGEÇMİŞ.....	64

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Atr İhtiva Eden Bitkiler	24
Tablo 2. Kan Alma Dönemleri ve Ortalama Kan Atr Düzeyleri ($\mu\text{g/ml}$)	42
Tablo 3. Atr'nin Bazı Toksikokinetik Parametreleri	43



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Pıtrak Bitkisi (<i>Xanthium strumarium</i> L.).....	8
Şekil 2. Pıtrak Bitkisi Tohumları.	8
Şekil 3. Atr'nin Kimyasal Yapısı.....	14
Şekil 4. Atr Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemi	40
Şekil 5. 8 mikrogram Atr Standartının Kromatogramı	41
Şekil 6. Kanda Saptanan Atr Kromatogramı.....	41
Şekil 7. Atr'nin Kan Yoğunluğu-Zaman Eğrisi	44

KISALTMA LİSTESİ

- ALP** : Alkalen Fosfataz
- ALT** : Alanin Aminotransferaz
- AST** : Aspartat Aminotransferaz
- Atr** : Atraktilozid
- CAT** : Katalaz
- GC-MS** : Gas kromatografi-kütle spektrofotometre
- GSH** : Glutasyon
- HPLC** : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
- LD50** : Letal Doz
- MDA** : Malondialdehit
- MDBK** : Madin-Darby Bovine Kidney
- MDCK** : Madin Darby Canine Kidney
- MRT** : İlacın vücutta ortalama kalış süresi (İlacın %63,2' sinin Vücuttan atılması için geçen süre)
- RPE** : Retina Pigment Epiteli
- SOD** : Süperoksit dismutaz
- TMSI** : Trimethylsilyl imidazole

1. ÖZET

Ratlarda Atraktilozidin Bazı Toksikokinetik Parametrelerinin Belirlenmesi

Dünya genelinde hem insan hem de hayvanlar tarafından oldukça fazla tüketilen geleneksel bitkilerden biri olan *Xanthium strumarium* L, ülkemizde de yaygın bir şekilde dere kenarlarında, boş arazilerde ve çöplük yakınlarında yetişmektedir. Özellikle ülkemizde pıtrak olarak da bilinen *Xanthium strumarium* L. bitkisinde bol miktarda bulunan atraktilozit, potansiyel risk oluşturduğu için deneysel olarak birçok çalışmaya konu olmuştur. Bu bağlamda mevcut tez çalışmamızda oral yolla ratlara verilen atr'nin bazı toksikokinetik parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda Bingöl ve yöresinden sonbahar aylarında toplanılan pıtrak bitkisi tohumları kullanıldı. Elde edilen dikenli tohumların kapsülleri ayrıştırıldıktan sonra tohum kısımları havanda öğütüldü ve suyla ekstrakte edildi. Ekstrakt içindeki Atr miktarı ise bu çözeltinin HCl ile hidrolize edilmesini takiben etil asetat ile karıştırılması işlemi ve piridin-TMSI solüsyonu ile türevlendirilme aşamasından sonra gas kromatografi-kütle spektrofotometre (GC-MS) cihazı ile tespit edildi. Deneme gruplarındaki ratlara ağız yoluyla 80 mg/kg Atr verildi.

Deneme ve kontrol gruplarında toplam 72 adet Wistar Albino ırkı erkek rat kullanıldı. Bu ratlardan 0, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96 ve 120. saatlerde dekapitasyon yöntemiyle ötenazi yapılarak kan örnekleri alındı. Kandaki Atr ölçümleri GC-MS cihazı ile yapıldı.

Atr ratlara oral yolla verildikten sonra elde edilen bazı toksikokinetik parametreler; birinci derece emilme hız sabitesi (k_a) 0,114 saat⁻¹; doruk ilaç yoğunluğu (C_{max}) 10,77 µg /ml, ilaç yoğunluğunun doruk değere ulaşma süresi (t_{max}) 48 saat; plazmada yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) 6,071 saat, 0.zamandan 120.saate kadar serum ilaç yoğunluğu zaman eğrisi altında kalan alan (EAA 0→120) 430,231 µg/saat/ml, , ortalama kalış süresi süre (MRT) 47,807 saat; dağılım hacmi (V_{dss}) 1,623 ml/kg; klirens (Cl) 0,185 ml/saat/kg olarak bulundu.

Sonuç olarak çalışmamızdan Atr'nin ratlardaki bazı toksikokinetik parametreleri elde edildi ve Atr'nin kandaki düzeyinin hızlı, güvenilir, sade bir analitik yöntemle ve hasas ölçülebilir olduğunu ortaya koyduk.

Anahtar kelimeler: Atraktilozit, pıtrak, toksikokinetik, rat, GC – MS

2. ABSTRACT

Determination of Some Toxicokinetic Parameters of Atractyloside in Rats

Xanthium strumarium L, which is a traditional plant consumed by both human beings and animals worldwide, is widely grown in our country, near the stream, in empty fields and near dumps. Especially in our country, atractyloside, which is abundant in Xanthium strumarium L. plant, also known as pıtrak, has been subject to many experimental studies since it poses a potential risk. In this context, in our current thesis, it was aimed to determine some toxicokinetic parameters of Atr given to rats orally for the first time.

In our study, the seeds of spring plants collected from Bingöl and its region in autumn were used. The seeds of the Xanthium strumarium L., obtained from Bingöl and around, were removed from the prickly capsules and extracted after grinding. The amount of Atr in the extract was determined with the GC-MS device following hydrolysis of this solution with HCl, and mixing with ethyl acetate and derivatization step by pyridine-TMSI solution. A total of 72 Wistar Albino male rats were used in the treatments and control groups. One by one, all treatments rats were given a single dose of Atr at 80 mg / kg live weight by gavage application.

Blood samples were taken from the rats in the control and experimental groups at 0., 4., 6., 8., 12., 24., 36., 48., 60., 72., 96. and 120. hours, via euthanasia using decapitation method. Atr measurements in the blood were calculated by the GC-MS device.

After oral administration of Atr to the rats, absorption rate constant (k_a) 0,114 h, the maximum blood concentration (C_{max}) 10,77 $\mu\text{g} / \text{ml}$, the time to reach the maximum blood concentration the (t_{max}) was 48 h, half-life of Atr is ($t_{1/2}$) 6,071

h, the area under the time curve of serum drug concentration (AUC 0 → 120) 430,231 $\mu\text{g} / \text{hr} / \text{ml}$, the time required to remove 63.2 % of Atr is (MRT) 47,807 hours, distribution volume (Vdss) 1,623 ml / kg ; clearance (Cl) was calculated as 0,185 $\text{ml} / \text{hr} / \text{kg}$,

As a result, some toxicokinetic parameters of Atr in rats were obtained from our study and we demonstrated that the level of Atr in the blood was fast, reliable, and accurately measurable with a simple analytical method.

Key words: Atractyloside, Xanthium strumarium L, toxicokinetics, rat, GC-MS

3. GİRİŞ

Bitkisel ilaçlar, “doğal” olmaları sebebiyle zararsız oldukları ve hiçbir yan etkilerinin olmadığı düşünülmektedir (1,2). Ancak, bitkisel ilaçların bilinçsizce kullanılmaları sonucu birçok karaciğer ve böbrek hasarına yol açtığı ve hatta ölüme neden olduğu bildirilmektedir (3,4). Reçeteli ilaçlarla geçimsiz etkileşimlerine ilişkin bildirimlerin yayınlanması nedeniyle, son zamanlarda ticari olarak temin edilebilen bazı bitkilerin güvenilirliği araştırılmaktadır (3,5,6). Bu nedenle tıbbi (şifalı) bitkilerin etkili ve güvenli kullanımları ile ilgili daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Gelişmiş ülkelerde, bitkisel ilaçların güvenilirliği ile ilgili düzenleme prosedürleri uygulanmakta ve araştırmalara devam edilmektedir. Ancak, az gelişmiş ülkelerde kullanılan bitkisel ilaçların güvenilirliği büyük bir endişe kaynağı oluşturmaktadır. Güney Afrika'da yerli nüfusun % 60 ile 85' inin genellikle geleneksel ilaçları (bitkisel ürünler) kullandığı ortaya konulmuştur (7,8). Morbiditesi ve mortalitesi yüksek akut zehirlenme vakalarının çoğunluğu geleneksel ilaçların tüketimiyle ilişkilendirilmektedir (9). Mortalite hızı yılda 10.000 ile 20.000'e kadar çıkabildiği bildirilmektedir (10). Joubert ve Sebata tarafından 1981-1982 yılları içerisinde 12 aylık süre zarfında, Pretoria'daki Ga-Rankuwa Hastanesine başvuran 277 akut zehirlenme vakası olduğunu ve % 18' inin geleneksel ilaçların kullanımından kaynaklandığını ve bu vakaların % 26' sının ölümle sonuçlandığını bildirmişlerdir (11). Venter ve Joubert tarafından yapılan bir çalışmada, aynı hastanede 5 yıllık bir süre boyunca (1981-1986), 1306 akut zehirlenme vakası incelenmiş, % 15.8'inin geleneksel ilaçlara bağlı olduğu ve bu vakaların % 15.3'ünün ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir (12). Genel olarak,

araştırmacılar geleneksel ilaçlarla zehirlenmenin yüksek mortaliteler ile sonuçlandığını ve akut zehirlenmeden kaynaklanan tüm vakaların % 51.7' sinin ölümle sonuçlandığı ortaya koyulmuştur. Her iki çalışmada da hastaların cinsiyetlerinin çoğunlukla erkek olduğu ve yaş aralıklarının çoğunlukla 1 - 5 yaş arasındaki çocuklardan oluştuğu bildirilmektedir. İlaçların ana kaynağını yerel aktarlar ve Afrika'daki eczaneler oluşturmaktadır (12).

Zehirlenmelerin çoğunluğu kazara şekillenmiş olup, sadece % 4'ünü kasıtlı zehirlenme olguları oluşturmaktadır. Stewart ve ark. Johannesburg adli veri tabanını 5 yıl boyunca analiz etmiş (1991-1995) ve meydana gelen bu zehirlenme olgularının %43' ünün bitkisel kaynaklı geleneksel ilaçların kullanımları sonucu şekillendiğini ortaya koymuştur (13). Bu çalışmalar sadece kayıtlı hastalar hakkında bilgi veriyor olmasına rağmen, kayıt altına alınmayan, hastaneye yetişmeden veya müracaat etmemiş kişilerin de zehirlenmeleri göz önüne alındığında, geleneksel ilaçlardan kaynaklanan gerçek zehirlenme vakaları sayısının çok daha fazla olabileceği beklenmektedir (14).

Yerli Güney Afrikalıların, ölüm oranının büyük bir bölümünü, ölüm teşhisinin çoğu kez yapılmadan tıbbi olarak onaylanmış kırsal kesim oluşturmaktadır (10). Bu durumun kırsal kesimde yaşayan hastaların hastaneye ulaşmadan öldüklerinden ve birçok zehirlenme vakasının da teşhis edilemediği düşünölmektedir (14). Ayrıca, otopsilerin rutin olarak yapılamadığı, ölüm nedenlerinin her zaman onaylı bir şekilde belirlenmediği veya belgelenmediği bildirilmektedir. Bu sebeplerden dolayı birçok zehirlenme vakasının tespit edilemediği düşünölmektedir (8).

Geleneksel ilaçlar ile ilgili gerekli analitik tekniklerin eksik olması, kesin tanıyı oluşturmayı zorlaştırmaktadır (13,15). Teşhis araç gereçler ve metod oluşturmada literatür kaynaklar yetersiz ya da sınırlı bilgi sağlamaktadır. Ayrıca, geleneksel ilaçların bitkisel bileşenlerinin nasıl toksisite oluşturduğuna dair patogenezi mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır.(8, 16, 17).

3.1. Atraktilozid

Atr, molekül ağırlığı 803 kD olan bir diterpen glikoziddir. Atr' nin, Lefranc tarafından kimyasal yapısı araştırılmış, Piozzi tarafından da sınıflandırılması yapılmıştır. 200 yıldan uzun süredir toksisitesi kanıtlanmış olan Atr, bir grup diterpenoid glikozitten biridir. Atr, ilk olarak *Atractylis gummifera*' dan izole edilmiştir (18). Daha sonrasında, Pıtrak (*Xanthium strumarium* L.) bitkisi başta olmak üzere yeni farklı bitki kaynakları da tanımlanmıştır (Tablo 1). Yeşil ve kavrulmuş kahve çekirdeklerinde bulunan karboksiAtr ve iki türev de dahil olmak üzere yeni Atr analogları izole edilip identifikasyonları yapılmıştır. Atr'nin biyokimyasal yapısını Santi ve Luciani, 1978 yılında incelemiştir (19).

Pıtrak, Asteraceae familyasına ait dünyanın birçok bölgesinde görülen çok yaygın zehirli tek yıllık bir bitkidir (Şekil 1). 1.0-3.5 cm uzunluğunda kahverengi, sert, odunumsu, çengel şeklinde dikenli meyvelere sahip olan bitkinin her bir meyvesinde iki tohum (Şekil 2) bulunmaktadır (20).



Şekil 1. Pıtrak Bitkisi (*Xanthium strumarium* L.)



Şekil 2. Pıtrak Bitkisi Tohumları.

Bitkinin tüm kısımları toksik olduğu bildirilmesine rağmen, henüz net olarak tanımlanamayan alkaloid karışımı içermekte ve bu karışımda alkaloidlerin

yanısıra seskiterpen laktonlar, ksantinin; onun stereoizomeri olan ksantumin ile ksantatin (deasetilksantinin) de bulunmaktadır (21). Toksik madde olarak sülfatlanmış bir glikozid olan ksantostromarin, Atr ve karboksiAtr; fitosteroller, ksantanol, izoksantanol, ksantinosin, 4-oxo-bedfordia asit, hidrokuinon; ksantanolides; kafeokuinik asitler; α ve γ tokoferol; tiazindion, 4-oxo-1 (5), 2,11, (13)-ksantatrien-12,8-olide ve deasetil ksantumin olarak bilinen, antifungal bir bileşik olan linoleik asit de bitkinin içeriğinde bulunan biyolojik aktif maddelerdir (21-23).

Pıtrak ile ilgili yapılan araştırmaların sonucunda bitkinin biyolojik etkilerinden dolayı antibakteriyel, antifungal, antitripanozomal, antimalaryal, antiinflamatuvar, antitussif, antimitotik, hipoglisemik, diüretik, antioksidant, analjezik, insektisit olarak kullanıldığı bildirilmiştir (24, 25). Ancak bazı hastalıkların tedavisinde kullanıldığı belirtilmesine rağmen Pıtrak canlılar için toksik olup; sđıřlarda, koyunlarda ve insanlarda ölüme yol açabilmektedir (26-28).

Bitkinin meyveleri ile yapılan ekstraksiyonda karaciğer hücreleri üzerinde önemli toksik etkiye sahip üç temel toksik bileşen olan Atr, karboksiAtr ve 4'-desülfate-Atr tespit edilmiştir (29). Bir diterpen glikozid olan Atr, perhidrofenantren yapısına sahip bir aglikon ve glikoz, sülfat ve bir glikozid olan isovalerattan oluşan iki biyolojik kısımdan oluşur ve glukoz β -bağı ile bağlanmış tek bir hidroksil grubuna sahiptir (30).

Pıtrak bitkisi toksisitesine özellikle sđıř ve domuzlar çok duyarlı iken, at ve köpekler nadiren etkilenmektedir. Hayvanlarda zehirlenmeye bağlı klinik bulgular bitkinin yenmesinden sonraki 48 saat içinde ortaya çıkmaktadır. Bazı hayvanlar zehirlenmeyi tolare edebilmesine rağmen hastalığın süreci birkaç hafta

sürebilmektedir (31). Atr zehirlenmelerinde ortaya çıkan klinik bulgular; bitki ile temasa bağlı döküntü, gastrointestinal irritasyon (iştahsızlık, bulantı, kusma, karın ağrısı), ataksi, kas güçsüzlüğü, şiddetli depresyon ve konvülziyonlar, saldırganlık, spazmodik kasılmalar, bacak ve boyun kaslarının fasikülasyonları, yürümede koordinasyon bozukluğu, körlük, miyokardiyal disfonksiyon (hipotansiyon, hızlı ve zayıf nabız), zor nefes alma, halsizlik, hipotermi, bunu takiben ölüm şekillendiği belirtilmektedir (30). Ölüm, klinik bulguların başlamasından birkaç saat sonrası ile 3 gün içinde ortaya çıkabilmektedir (30, 32).

Laboratuvar bulgularında, başlangıçta hiperglisemi şekillenmektedir. Karaciğer enzimlerinde belirgin bir derecede yükselme ve ilerleyen süreçte hipoglisemi şekillenmektedir (33, 34). Ölüm sebebi olarak, kan şekeri seviyesinin 0.9 mmol/L'ye kadar düşen şiddetli hipoglisemik şoktan kaynaklandığı bildirilmektedir (22).

Rat ve farelerde farklı dozlarda, oral veya periton içi uygulanan Xanthium strumarium meyve ekstraktının verilmesini takiben, bazı biyokimyasal parametrelerinin incelendiğinde; karaciğer ağırlığının artmış olduğu, serum Alanin Aminotransferaz (ALT), Aspartat Aminotransferaz (AST), Alkalen Fosfataz (ALP) aktivitesi ve Total bilirubin (TBIL) seviyesinin yükseldiği ve uygulanan doz miktarı arttıkça doku hasarının şiddetlendiği belirtilmiştir (30). İn vivo çalışmada, karaciğer hücrelerinde ve in vitro çalışmalarda RPE hücrelerinde, oksidatif stresi belirlemede kabul görmüş protein olan malondialdehit (MDA) düzeyinin arttığı bildirilmiştir. Ayrıca karaciğer hücrelerinde CAT, GSH, SOD enzimi gibi diğer oksidatif stres parametrelerinde azalma olmaktadır (35).

İnsanlarda meydana gelen şiddetli Atr zehirlenmesinde, karaciğer enzimlerindeki artışın yanı sıra kan üre nitrojen ve kreatinin düzeylerinin de artmış olduğu, ölen çocuklarda hipogliseminin yanısıra metabolik asidoz ve özellikle ölümlle sonuçlanan tüm hastalarda miyokard hasarının göstergesi olan kreatinin fosfokinaz değerinin arttığı bildirilmiştir (28). Yapılan diğer bir in vitro çalışmada, karaciğer ve böbrek hücrelerinde doza bağlı olarak ATP miktarında önemli bir azalma olduğu, doza ve zamana bağlı olarak pürivat uyarımlı glikoneogenezis inhibisyonu gözlenmiştir (36).

Histopatolojik olarak; karaciğer ve böbrek dokusunda nekroz, serebrum ve serebellumda geçirgenlik artışı ve mikrovasküler hemoraji; pankreas, akciğer ve miyokartta lökosit infiltrasyonu, lobüler hepatomegali, safra kesesi duvarında ödem, proximal tubüllerde tıkanma, vücut boşluklarında sıvı toplanması şekillenmektedir. Ayrıca, en belirgin mikroskopik bulgu olarak sentrilobüler hepatositlerin akut diffüz nekrozu oluşmaktadır (28). Diğer histolojik lezyonlar miyokard ve böbreklerdeki dejeneratif değişiklikler, beyindeki nöronal dejenerasyon ve serebral ödemler gösterilmektedir. Artmış damar geçirgenliği, miyokard, safra kesesi ve periton boşluğunda ciddi hemorajik lezyonlara neden olmaktadır; zehirlenen hayvanlardan alınan örneklerin histopatolojik incelenmesi sonucunda sıklıkla pıhtılaşma bozukluğu ve hemorajik hepatik nekroz görülmektedir (32). Xanthium strumarium ile zehirlenmelerde görülen pıhtılaşma bozuklukları, hiponatremi, hipoglisemi, karaciğer ve böbrek yetmezliği gibi bulgular prognozun kötü olduğunu göstermektedir. Ancak, tedavi amacıyla Atr' nin özel bir antidotu olmadığı için destekleyici yöntemler uygulanmaktadır (37). Hipoglisemiyi düzeltmek için dekstroz, nöbetler için anti-konvülzan ilaçlar tercih edilmektedir. Şiddetli karaciğer

ve böbrek yetmezliği tedavisinde kullanılan yöntemler uygulanmasına rağmen bu uygulamalardan başarılı sonuçlar elde edilememiştir. Yapılan in vitro çalışmalar ve deneysel araştırmalar doğrultusunda muhtemel tedavi yaklaşımları oluşturulmaya çalışılsa da uygulanabilirliği yönüyle kesinlik kazanan bir yöntem bulunmamaktadır.

Atr zehirlenmelerinde koruyucu amaçla; glutamin ve glutasyonda sekonder bir artış in vitro olarak koruyucu etki yapar (38). Alfa tokoferol, mitokondriyal membran potansiyel kaybını ve apoptoz gelişimini önlemektedir. Ursodeoksikolik asit, mitokondride sitokrom salınımına yol açan ajanlarla birlikte uygulandığında bu etkiyi in vitro olarak %80 düzeyinde azaltmaktadır. Siklosporin A da in vitro olarak apoptoz gelişimini önlemektedir. Meyan kökünün aktif bir bileşeni olan glisirizik asit in vitro karaciğer hücrelerine uygulandığı zaman lipid peroksidasyonunu önlediği bildirilmiştir (39-42). Diğer proapoptotik düzenleyiciler tamoksifen, mastoparan ve cucurmin gibi bitki kökenli ilaçlardır (43).

Atr ihtiva eden ve yaygın bir şekilde yetişen *Atractylis gummifera* L. özellikle de bitkinin kendiliğinden yetiştiği ülkelerde, insanlarda nadiren de olsa zehirlenmelere yol açan bitkiler arasında yer almaktadır (44). *Atractylis gummifera* L.'nin yabani bir enginar türü ile kolayca karışabilmesi nedeniyle, çoğu zehirlenme vakası istemsiz olarak meydana gelmektedir. *Atractylis gummifera* içeriğinde tatlı bir su barındırdığından ve çocuklar da sakıza benzer yapıdaki kök kısmını çiğnemekten hoşlandığından, zehirlenme olgularında zehirlenenlerin çoğunluğunu çocuklar oluşturmaktadır (45).

3.1.1. Atraktilozidin Kimyasal Yapısı

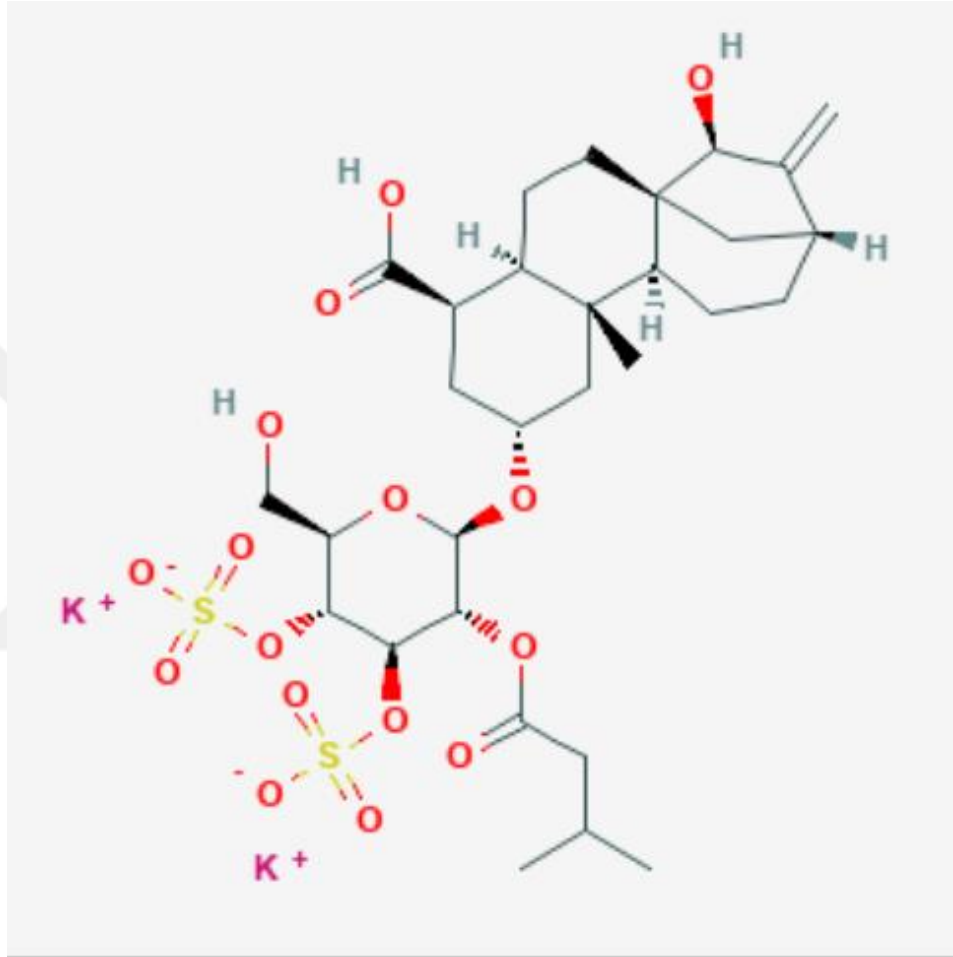
Hidrofilik bir glikozit olan potasyum atr, aglikonu (atraktilijenin) atr'ye göre 150 kat daha az toksik, perhidrofenantrenik yapıya sahip, asidik, hidrofobik, uçucu olmayan bir diterpendir (46).

Bir D(+) glukoz, bir diterpen çekirdeği, iki sülfat grubu, bir izovalerik asit ve aglikondan oluşan atr, aglikonu atraktilijenin olarak adlandırılmaktadır. Kauren ailesinin norditerpenoid bir asitidir. Glukoz molekülü 1. pozisyonda B-glikozidik bir bağla atraktilijeninin C2-hidroksil grubuna bağlanmaktadır. Atr'nin etkisi için en önemli gruplardan biri C-4 üzerinde bulunan karboksil grubudur ki, bu grup maddenin inhibitör etkisi için mutlaka gereklidir ve alkole indirgenmesi molekülü zehirsiz hale getirmektedir.

Vignais ve arkadaşları atr molekülünün tüm kısımlarının oksidatif fosforilasyonu önlemedeki etkisini ortaya koymuşlardır (47). ADP ve Atr'nin molekül büyüklükleri ve geometrileri birbirine benzer bir yapı oluşturmaktadır. Atr'in polar yapıdaki sülfat grubuna karşılık ADP' de fosfat grubu, glikozidik gruba karşılık riboz grubu vardır ve Atr'nin steroid kısmı adenin pürin halka sisteminde geometrik ve hidrofobik benzerliğe sahiptir (48).

Atr, biyolojik olarak aktif; perhidrofenantren yapıya sahip bir aglikon ve glikoz; sülfat ve izovalerattan oluşan bir glikozit olarak iki parçadan oluşmaktadır. Glikoz, beta-bağının bulunduğu, tekli, serbest bir hidroksil grubuna sahiptir (49). Hem taze hem de kavrulmuş kahve çekirdeklerinden izole edilen Atr analoglarından bir tanesi, birinci glikozit molekülünün 2' pozisyonunda izovalerik ester bağına sahip bir diglikozittir (alt yapı, Şekil 1). Atr'nin etkilerinin kendi yapısı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (50). Buna göre, Atr'nin yapısındaki C-4 karboksil

ve C-15 serbest hidroksil gruplarına sahip olan aglikon kısım (moiety), C-16 metilen gruplar, glikoz kısım üzerindeki C-6 serbest hidroksil grubu, sülfat gruplar ve isovaleratın tamamının mitokondriyal ve toksik etkiler için gerekli olduğu bildirilmiştir (49).



Şekil 3. Atr'nin Kimyasal Yapısı

3.1.2. Atraktilozidin Biyolojik Etkileri

Atr'nin yapısal bütünlüğünün korunmasına bağlı biyolojik etkileri vardır. Çünkü aglikon, 150 kat daha az bir mitokondriyal oksidatif fosforilasyon inhibitörüdür, bu da glikozit kısmının önemini kanıtlamaktadır (51).

İn vivo olarak görülebilen Atr'nin etkileri, çeşitli laboratuvar hayvanlarından izole edilen mitokondrilerde, tavşan ve rat karaciğer homojenatında güçlü bir oksidatif fosforilasyon inhibitörü olduğunu gösteren bulgularla açıklanabilmektedir. Daha önceki çalışmalarda, 20 mM kadar düşük konsantrasyondaki Atr'nin, spesifik olarak oksidatif fosforilasyonu bloke ederek, mitokondriyal adenin nükleotid translokasyonunu inhibe ettiği kanıtlanmıştır. Atr'nin, selektif olarak, rat veya tavşan karaciğeri, böbreği, kalbi alınarak yapılan çalışma sonucunda, Atr'nin dış mitokondriyal zarlardaki fosforil transferaza (nükleosid monofosfokinaz) bağlandığı bildirilmiştir (52-57). Sığır karaciğeri, böbreği ve kalbi kullanılarak da benzer gözlemler yapılmıştır (58).

Atr'nin enerji transfer reaksiyonları ile etkileşimi, oligomisin ve guanidin türevlerinin etkileşimlerine benzemektedir (59, 60). 20 mM kadar düşük konsantrasyonlardaki Atr, fosforile bir ara ürünün adenosin difosfat (ADP) ile etkileşimini yarışmalı (kompetitif) bir şekilde inhibe ederek eksternal (dışardan gelen) ADP'nin rat mitokondrisine bağlanmasını engellemektedir (61). ADP, geometrik olarak ve yük dağılımı açısından Atr'ye çok benzemektedir. Oksidatif fosforilasyonun inhibisyonu, yüksek konsantrasyonlardaki (200 mM ve üzeri) ADP ile tamamen tersine çevrilebilmektedir (56). Bu da Atr'nin, adenosin trifosfatın (ATP) oluştuğu solunum zincirinin enerji koruyucu reaksiyonlarının terminal fazında etki gösterdiği sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Böylece, fosforil transferazın inhibisyonu, hücrel fosforilasyon ve defosforilasyonun önemli bir bölümünü bloke eder ve daha fazla miktarda mitokondriyal fosforilasyon potansiyelini azaltmaktadır (58). 20-50 mM'lik bir Atr konsantrasyonu kullanılarak yapılan bir çalışmada, Atr'nin mitokondriyal şişmeyi teşvik ettiği bulunmuştur (62).

Bu da ADP/ATP antiportörünün mitokondri boyutundaki değişikliklere aracılık edebileceğini düşündürmektedir. Mitokondri ampütüdünün (genliği) sıcaklığa göre değiştiği bulunmuştur. Mitokondrinin boyutu, bu zarların lipid akışkanlığından etkilenmektedir. Bu da mitokondrinin sıcaklığa bağımlılığına açıklama getirmektedir (63).

Atr, biyokimyasal bir araç olarak büyük bir önem kazanmıştır ve ADP/ATP taşıyıcısının yüksek spesifik inhibisyonu nedeniyle dış mitokondriyal bütünlüğü ölçmede kullanılmaktadır (57, 64-66). Safleştirilmiş Atr (20-100 mM), transmembran potansiyelinin çökmesine neden olur ve kalsiyum yüklü rat karaciğeri (55, 67, 68) ve tavşan kalbi (50) mitokondrilerinden Ca^{+2} 'nin dışa akışına (efflux) neden olmaktadır. Sitoplazmik Ca^{+2} birikimine ve hücre büyümesinde durmaya neden olur ve nihayetinde hücre lizisi şekillenmektedir (69). Atr ile indüklenen mitokondriyal Ca^{+2} salımının sıcaklığa bağlı olduğu bilinmektedir (63) ve bu nedenle normal hücresel sıcaklıkta önemli bir etkiye sahiptir. Ca^{+2} , iç mitokondriyal membran özelliklerinin pratikte geri döndürülemez olan modifikasyonunu indükler ve Atr ile inkübasyonu takiben sızıntılı membranların (zar) oluşmasına neden olur (66). Bununla birlikte, mitokondriyal iç zarın diğer katyonlara ve küçük solütlere (çözünen madde) karşı geçirgenliği Atr tarafından bloke edilmektedir (70). Mitokondriyal ATPaz'ın insan korneasında, Atr (50 mM) tarafından inhibe edildiği bilinmektedir (71) proksimal tübüler fragmanlardaki renal Na^{+} - K^{+} -ATPaz için de aynı durum olduğu bildirilmektedir (72). Oysaki Atr'nin insan tümörü (hepatom ve atositoma) mitokondrisindeki ADP / ATP transportuna karşı duyarlılığı, insan karaciğer mitokondrilerindekilerden daha düşük seviyededir (73). Bu da normal hücrelere karşı daha yüksek bir toksisiteye

sahip olduğunu göstermektedir. Atr (40-100 m M) ayrıca rat karaciğeri golgi veziküllerindeki protein sülfatlanmasını inhibe etmektedir, fakat aynı konsantrasyondaki veya daha yüksek Atr konsantrasyonlarında izole rat böbrek hücrelerinde tek başına protein sentezini inhibe edememektedir (65, 74-76).

Atr uygulamasını takiben meydana gelen metabolik değişiklikler, bu ajanın bilinen hücresel etkilerine dayanarak yorumlanmaktadır. Mitokondriyal fosforil transferaz inhibisyonunun toksikokinetik özellikleri, Atr'nin in vivo uygulanmasını ve izole mitokondrilerin veya doku homojenatlarının in vitro olarak Atr'ye maruz kalmasını takiben ortaya çıkan toksikokinetik özelliklerle benzer bulunmuştur. Örneğin, köpeklerde 15 mg/kg veya ratlarda 50 mg / kg'lık in vivo Atr dozlarının, oksidatif fosforilasyon ve hücresel enerjinin bozulmasına, oksijen alımının azalmasına (hipokside olduğu gibi), anaerobik glikoliz ve glikojenolizinin hızlanmasına ve hem glukoneogenez hem de yağ asidi oksidasyonunun inhibisyonuna sebep olduğu gösterilmiştir. Ancak, fosforil transferazın sitosolik tarafındaki adenilat kinaz, fosforilaz ve fosfofruktokinazı aktive edebilen AMP'nin üretimini hızlandırmaktadır (77). Bu da, iskelet kası ve diğer organlarda glikojenoliz ve anaerobik glikolizin hızlanması lehine toksikokinetik dengeyi belirlemektedir (65).

Zehirlenme vakalarının başlangıcında, glikoz-6-fosfataz, depolanmış glikojeni tüketerek kan glikoz seviyesini arttırmaktadır. Bu, genellikle, Atr ile zehirlenen hayvanlarda veya insanlarda görülen başlangıç hiperglisemi fazını oluşturmaktadır. Kan şekeri seviyesi yükseldikçe, hücreler tarafından oksijen kullanımının azalması ile beraber, enerji üretiminin tek kaynağı olarak anaerobik glikolitik yolak devreye girmektedir. Bu da nihayetinde glikoz düzeylerinde hızlı

bir düşüşe yol açmaktadır (Atr ile tedaviden sonraki birkaç saat içinde gözlenen hipoglisemik faz). Hipoglisemik faz sırasında, glikolitik ara ürünlerde bir azalma ve laktat birikimi meydana gelmektedir (78). Biriken laktatlar daha sonra hücreleri terk ederek kan dolaşımına katılmaktadır. Yüksek plazma laktat seviyeleri de H⁺ konsantrasyonunu yükselterek asidoza yol açabilmektedir (pH'ı azaltabilir). Bu da renal homeostazı etkileyebilmektedir. Mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun engellenmesi aynı zamanda, indirgen eşdeğerin oksidatif zincire aktarıldığı respiratuvar elektron akışının da engellenmesine yol açmaktadır (77). Elektron taşıma sistemi boyunca elektron akışında bir dengesizlik olması ve indirgen eşdeğerin glikolitik yol üzerindeki üretiminde hızlı bir artış olması, sitozolde güçlü bir elektronegatif potansiyele yol açabilmektedir. Bu durum, hücre kompartmanında ATP / ADP + Pi seviyelerinin düşüşünü kolaylaştırabileceğini düşündürmektedir. Rat karaciğeri homojenatı kullanılarak yapılan deneyler bu hipotezi açıkça desteklemektedir (77). Atr, 40 mM veya daha yüksek bir konsantrasyonda, ketogenezi önemli ölçüde inhibe etmektedir. Kontrol durumunda (78) ve karaciğer ve böbreğin kortikal kesitlerinde (65) Atr'nin palmitat ile uyarılmış solunum üzerindeki etkileri bu durumu kanıtlar niteliktedir. Atr, ATP ve asetil-CoA oluşumunu bloke ederek karbonhidratların, yağ asidinin ve amino asidin aerobik yıkımına engel olmaktadır. Asetil-CoA, hem karaciğer hem de böbrekte glukoneogenez ve yağ asidi oksidasyonunun entegrasyonunda merkezi bir rol oynadığından, hücrenin, glikolizin tam karşıtı mekanizmalar ile kontrol edilen glukoneojenik yolağı aktifleştirerek yanıt vermektedir. Hem düşük asetil-CoA seviyesi hem de yüksek AMP (fruktoz-1,6-bisfosfataz etkisini inhibe eder)

seviyeleri, glikoneojenik yolak aracılığıyla tükenen glikozun yenilenmesini önleyerek hipoglisemik durumu şiddetlendirmektedir.

Atr'nin metabolizmanın hormonal düzenlenmesindeki rolü tam olarak bulunamamıştır. Kimura ve arkadaşlarına (79) göre, Atr, glukagon ile uyarılan fosfoenol karboksil kinaz ve artmış glukoneogenezin etkilerini ortadan kaldırmaktadır. Warnette-Hammond ve Lardy çalışmalarında ise bu etki tespit edilememiştir (78). Ancak bunun yerine norepinefrin ve vazopressin hormonlarının Atr'ın glukoneogenezi inhibe edici etkisini tersine çevirdiğini kanıtlamıştır. Atr ile indüklenen hipoglisemi şiddetinin, yüksek doz insülin uygulanmasıyla indüklenen ve muhtemelen yüksek plazma katekolamin, kortizol ve glukagon düzeylerine neden olan olaylarla benzer olduğu bulunmuştur (80). Bu, Atr'nin aracı metabolizma üzerinde değişikliklere neden olduğu mekanizmanın daha önceden öngörülenden daha karmaşık olabileceğini düşündürmektedir.

3.1.3. Atraktilozidin Metabolizması

Atr'nin metabolizması daha fazla literatür ile desteklenmesi gerekmektedir. Kahve içen bireylerin idrarından izole edilen kahve çekirdeklerinden elde edilen Atr analoglarında (gaz kromatografisi ile tespit edilir) ana moleküle göre yalnızca hafif düzeyli değişikliklerin olduğu tespit edilmiştir (81). Benzer şekilde, vücut sıvılarındaki Atr'ye spesifik HPLC analizi ve immünoanalizler (82, 83), Atr'nin ratlarda idrarla atıldığını ve enjekte edilen Atr'nin tamamının biyotransforme edilmediğini göstermiştir. Örneğin, intraperitoneal olarak 5, 10 veya 25 mg / kg'lık dozlar uygulanan ve 4 gün boyunca izlenen ratların idrarındaki Atr seviyeleri, Atr

atılımının, özellikle hayvanlarda, en yüksek iki dozda, günlük olarak gerçekleştiğini göstermiştir. Dışarıya atılan değişmemiş Atr seviyelerinin, uygulanan toksin seviyeleri ile ters ilişkili olduğu görülmüştür. 25 mg / kg'lık dozun uygulandığı ratlarda, uygulamadan sonraki 24 saat içinde yaklaşık 200 pg Atr/ml'lik bir idrar atılımının meydana geldiği bulunmuştur. Bununla birlikte, Atr metabolizmasının insan ve laboratuvar hayvanlarında aynı olup olmadığı netlik kazanmasa da her iki türün de in vivo ortamda yaygın hedef organ toksisitesi sergilediği bildirilmiştir (84).

Atr'nin dokulardaki dağılımı konusunda bir veri bulunmamaktadır. Ayrıca, dışarıya atılım (ekskresyon) yollarına ilişkin de bilgi eksikliği mevcuttur. Ancak böbreğin önemli bir eliminasyon bölgesi olduğu belirtilmektedir. Aynı şekilde metabolizmanın rolü net olmamakla birlikte Atr'ın hepatik biyotransformasyon sistemleri ile etkileşime girdiğini gösteren kanıtlar vardır. Oral Atr'nin, rat karaciğer sitozolik glutatyon ve toplam (indirgenmiş ve oksitlenmiş) glutatyon seviyelerini ve glutatyon redüktaz aktivitesini artırdığı bulunmuştur. Sitokrom P450 (CYP-450) ve sitokrom b5 (CY-b5) içeriğindeki azalma, hepatik morfolojik değişikliklere ve endoplazmik retikulumdaki değişikliklere bağlanmıştır (85). Ayrıca, alkol grupları, reaktif a, b-doymamış aldehitler veya ketonlara oksitlenme potansiyeline sahiptir (80). Glukuronidinin (2b-hidroksil-15-oksoatraktinlan-4a-karboksilik asit) kahve içen bireylerin idrarından izole edilmiştir (81) C. arabica'da bulunan Atr'de mevcut olan alkol grubunun muhtemelen reaktif bir ara madde yoluyla biyotransforme edildiğini göstermektedir. Akut Atr toksisitesinin şiddetinin ana bileşiğin veya metabolitlerinin plazma veya idrar konsantrasyonları ile ilişkilendirmek için herhangi bir girişim yapılmamıştır, ancak hepatik Atr metabolizması ile etkileşimin

böbrek hasarının boyutu üzerinde etkili olduğunu gösteren deneysel ve klinik kanıtlar bulunmaktadır. (84). Bununla birlikte, Atr toksisitesinin reaktif bir metabolitin oluşumuyla bağlantılı olup olmadığı henüz belirlenmemiştir.

3.1.4. Atraktilozidin Mitokondriyal Fosforilasyonunu İnhibe Eden Etkileri

Atr tarafından oluşturulan mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun inhibisyonunun, tüm organizma için önemli sonuçları olmakla beraber, diterpenoidin in vivo ve in vitro toksisitesine katkıda bulunması muhtemeldir. Atr, glukoneogenezi ve yağ asidi oksidasyonunu inhibe eder, ancak anaerobik glikoliz ve glikojenolizi hızlandırır. İnsanlarda ve hayvanlarda meydana gelen metabolik değişiklikler, iskelet kasındaki ve hepatik glikojenin hızlı tükenmesi (65), glikojen sentezinin inhibisyonu (86) ve müteakip belirgin bir hipoglisemik faz nedeniyle ortaya çıkan akut hiperglisemik bir fazı içermektedir. Başlangıçta, kan laktat düzeyleri glikoz düzeylerindeki değişiklikleri yakından takip etmiş olsa da, hipoglisemik fazda laktat seviyelerinde sürekli bir yükselme görülmektedir. Bu dönemde kandaki esterleştirilmemiş yağ asitlerinin konsantrasyonu yükselmektedir (84). Hızla azalan plazma glikoz düzeyi, normal fonksiyonların sürdürülmesi için beyne giden glikoz düzeylerinde de bir yetersizliğin oluştuğu bildirilmektedir (80). Şiddetli hipoglisemi devam ettikçe, solunum depresyonu, hipoksemi, doku hipoksisi (oksijen tüketiminde azalma), asidoz, konvülsiyon, koma ve bazı durumlarda ölüm meydana gelmektedir. Bu olaylar dizisi, hayvanlara yüksek dozda insülin uygulandıktan sonra gözlenen etkilere benzemektedir (50). Aslında, Atr'ın pankreatik insülin üretimini uyararak hareket edebileceği düşünülmektedir, ancak hiperglisemiye takiben oluşan hipoglisemi, değiştirilmiş insülin metabolizması ile

ilişkili olmayan kompensatuvar (telafi edici) bir fizyolojik yanıt olabilmektedir. Glikojen sentezinin inhibisyonu ve kan laktat düzeyindeki artış, Atr tarafından oksidatif süreçlerin rölatif doku inhibisyonu ile ilişkili olabilen hücresel oksidatif reaksiyonlardaki belirgin bir azalmanın sonucu olarak meydana gelmektedir (52).

3.1.5. Atraktilozid Maruziyeti

İnsanlardaki Atr maruziyetinin ana kaynağı, *Weidelia glauca*'daki gibi bitkinin toprak üstünde kalan gövde kısmından, *Atractylis gummifera*'nın rizomlarından, *Callilepis laureola*'nın toprak altındaki kök ve gövde kısmından ve *Xanthium strumarium* bitkisinin tohumlarından üretilen bitkisel ilaçlar olarak ortaya çıkmıştır (84). Bu bitki dekoksasyonlarına (kaynatılarak hazırlanan özler) maruz kalınması ölümcül karaciğer ve böbrek nekrozlarına neden olmaktadır (82, 84, 85). Bitkilerdeki toksin seviyelerinde mevsimsel ve bölgesel farklılıklar bulunduğu bildirilmektedir (77).

Yapılan bir çalışmada (83), ortalama bir *C. laureola* yumrusu yaklaşık 6,7 mg/g Atr içerdiği bildirilmiştir. Bu nedenle, bitkisel ilaçların her bir dozunun yaklaşık 10 g bitki materyalinden hazırlandığı varsayıldığında, bu miktar, doz başına 70 mg Atr'ye karşılık gelir. Bu da 70 kg'lık bir yetişkin için 1 mg/kg vücut ağırlığı dozuna eşdeğer kabul edilmektedir. Belirli bir süre boyunca oral yoldan alınan bu tür bitkisel ilaçların çoklu dozları, şiddetli böbrek hasarına neden olabilecek toksin miktarını içermektedir (84). Benzer şekilde, yanlışlıkla *A. gummifera* kökünü infüzyon yoluyla alan (yaygın kullanılan başka bir tedavi olduğu düşünülerek) kişiler 2-10 gün sonra şiddetli karın ağrısı, bulantı, kusma ve

oligüri ile hastaneye başvurduğu ve bildirilen beş hastadan birinde mortalite gözlemlendiği bildirilmiştir (87).

Bye tarafından yapılan bir araştırmada, Atr seviyelerinin mevsimsel veya bölgesel farklılıklardan dolayı bitkilerdeki miktarlarının düşük olabileceğini; insanların aşırı hassas olması, önceden var olan hastalık veya malnütrisyon durumlarının insanları bu diterpenoidin toksisitesine karşı daha duyarlı hale getirebilecek olmasının söz konusu olduğu bildirilmiştir (83).

Coffea arabica, Atr türevlerini içerdiği bildirilen ve insanlar tarafından tüketilen tek Atr içerikli gıda maddesidir. Yeşil ve kavrulmuş *C. arabica* çekirdeklerinin 34.5-624 mg/kg dozunda Atr analoglarını içerdiği bildirilmiştir (88). Atr analog miktarının kavrulma sırasında 17.5-32 mg/kg'a düştüğü bildirilmiştir. Ancak, bu analogun kahve bağımlısı kişilerin idrar yollarıyla 0.003 mg/ml veya 5.6-6.4 mg/gün dozunda dışarıya atılıyor olması, önemli bir biyolojik yük miktarının oluşmasına neden olmaktadır (89, 90). Ayrıca, çiftlik hayvanlarının yenilebilir dokularında kalan Atr kalıntıları sebebiyle ilave bir insan maruziyeti kaynağının oluşma olasılığı da bulunmaktadır, ancak bununla ilgili yayınlanmış bir veri bulunmamaktadır. Bununla birlikte, insanlar tarafından Atr içeren bitkilerin gıda veya ilaç amaçlı tüketilmesi veya Atr içeren bitkilerde otlayan çiftlik hayvanları aracılığıyla, bu toksinin düşük dozlu maruziyetinin belirgin düzeyde zararlı etkilere yol açmak için yeterli olduğu düşünülmektedir.

Birçok bitkide bulunan Atr analoglarının, bitkilerdeki miktarları hakkında çok az literatür bulunmaktadır. Ancak, küresel dağılımlarına (Tablo 1) bakıldığında; insan ve hayvanlardaki maruziyetin geniş kapsamlı olduğu görülmektedir.

Tablo 1. Atr İhtiva Eden Bitkiler (65).

Jenerik İsmi	Bitki Kısmı	Bölgesel Dağılımı
<i>Xanthium strumarium</i>	Tohum	Doğu, Güney ve Orta Avrupa, Asya, Güney Afrika
<i>Callilepis laureola</i>	Kök	Güney ve Orta Africa
<i>Atractylis gummifera</i>	Toprakaltı gövde	Akdeniz Bölgesi, Kuzey Afrika
<i>Coffea arabica</i>	Çekirdek	Ekvatoryal Afrika, Kuzey Etiyopya, Güney Amerika, Hindistan, Sri Lanka ve Yemen
<i>Weidelia glauca</i>	Toprak üstünde kalan gövde	Arjantin, Uruguay ve Güney Brazilya
<i>Wedelia asperima</i>	Toprak üstünde kalan bitki bölümleri	Avustralya
<i>Atractylis carduus</i>	Toprak üstünde kalan bitki bölümleri	Asya, Çin
<i>Atractylodes lancea</i>	Toprak üstünde kalan bitki bölümleri	Asya, Çin, Japon
<i>Iphiona aucheri</i>	Toprak üstünde kalan bitki bölümleri	Birleşik Arap Emirliği

3.1.6. Atraktilozid Toksisitesi

Atr zehirlenmesi, dünya çapında, özellikle Afrika ve Akdeniz bölgelerinde ortaya çıkan, nadir olmasına rağmen ölümcül olan bir bitkisel zehirlenme şeklidir. Atr zehirlenmesinin birincil mekanizmasının, mitokondriyal ADP taşıyıcısının inhibisyonu olduğu bilinmektedir. Büyük miktarlarda Atr, masif nekroza neden olur, ancak in vitro çalışmalar, düşük dozlarda, hücrelerin apoptoza ilerlediğini göstermiştir. Zehirlenme belirtileri birkaç saat içinde ortaya çıkmaktadır. Yürüme

problemleri, sıkıntılı bir ruh hali, kas kasılmaları, spazm, yere uzanma isteği, solunum sayısı ve kalp atış hızında artış meydana gelir. Kritik vakalarda 12-24 saat içerisinde ölüm meydana gelmektedir (91).

Ölümlerin genellikle daha kolay açıklanan diğer ölüm nedenlerinin zemininde meydana gelmesi sebebiyle, Atr ile ilişkili ölümlere ilişkin istatistiksel veriler iyi belgelenememiştir. Güney Afrika' nın KwaZulu-Natal vilayetinde yılda 1500'den ve Tunus'ta da yılda 1200'den fazla ölüm bildirilmiş olup, bu sonuçlar bu konuda yayınlanmış olan tek veri olarak bilinmektedir (92, 93).

3.1.6.1. Nefrotoksik etkiler

Atr toksisitesi in vivo olarak belgelenmiş, çoğu hayvan türü için de nefrotoksik bir maddedir. Atr, (40-60 mg/kg) intraperitoneal olarak rat ve köpeklerde 3 saat içinde, tüm proksimal tübülün (S1, S2 ve S3 segmentleri) akut nekrozuna ve Henle kulbunun kalın, çıkan kolunun nekrozuna neden olmaktadır (80). Bazı araştırmacılar, böbrek proksimal tübüllerinin saf Atr veya Atr içeren bitkilere maruz kaldıktan sonra aynı histolojik değişikliklere uğradığını özellikle bildirmişlerdir (82, 94). Bu bulgular, ratlarda ve Atr zehirlenmesinden şüphelenilen hastalarda yapılan organ fonksiyon analizleri ile kısmen desteklenmektedir (82, 84).

Işık ve elektron mikroskobunda, korteksin iç bölgesinde nekroze alanlar tespit edilmiştir. Bu nekroze alanlarda hücreler ince bir görünüme sahip, homojen olarak eozinofilik piknotik çekirdeklerin bulunduğu gösterilmiştir. Fırçamsı kenarlarda kayıplar ve mitokondrilerde yoğunlaşma, küçük veziküllerde proliferasyon, hücresel şişme ve lümen ve bazal membranlardaki organellerde yer değişikliği görülmüştür. Ayrıca Henle'nin kalın çıkan kulbunda tübüler lamina

oklüzyonlarının da varlığı gösterilmiştir (95). Proksimal kıvrık tübülün distal kısmının nekrozu, uranil nitrat ve merkürük klorürün neden olduğu nekroz ile benzerlik göstermektedir (87).

Rejenerasyon süreci maruziyetten 2 gün sonra başladığı için, Atr ile indüklenen böbrek hasarı genellikle ilk lezyondan kurtulan hayvanlarda geri dönüşümlü olabilmektedir. Atr böbrek fonksiyonunu ve hemo-dinamiğini olumsuz yönde etkilemektedir. Sebep olduğu patofizyolojik değişiklikler arasında idrar hacminde artma, keton cisimcikleri ve potasyumun atılımında artma ve sodyum atılımında hafif bir azalma şekillenmektedir. Serum ve idrar kreatinin düzeylerinde hafif bir artış olurken, üre düzeyinde üç kat artışın olduğu bildirilmektedir. Benzer nefrotoksik etkilerin farelerde, domuzlarda ve köpeklerde de şekillendiği gözlenmiştir, fakat benzer koşullar altında aynı dozda kobay ve tavşanlarda görülmediği bildirilmiştir (80, 95, 96). Ayrıca, tedavi edilen bu hayvanların glomerulleri etkilenmemiştir (84, 95). Atr'ın bu bölgedeki majör transport süreci ve yüksek mitokondri bileşenleri nedeniyle proksimal tübülü hedeflediği düşünülmektedir, bu da Atr'ın böbrekteki en aktif transport süreci yoluyla toksik etkisini gösterebileceğini düşündürmektedir.

İmmünohistokimyasal araştırmalarda, Atr'ın böbreğin proksimal tübülünde, özellikle fırçası sınırların mikrovillüslerinde mevcut olduğu konusunda tartışılmaz kanıtlar sağlanmıştır (83). Proksimal tübülü hedef alan selektivitesi in vitro ortamda da korunmaktadır. Son zamanlarda, Atr'nin toksik etkilerini incelemek üzere in vitro sistemlerin kullanımına ilgi duyulmaktadır (72, 76). Yeni izole edilmiş rat renal proksimal tübül fragmanlarının ve sürekli NRK hücre çizgilerinin (proksimal tübülden türetilmiş), sırasıyla 20 m M ve 120 m M Atr'ye

kadar duyarlı olduğu kanıtlanmıştır. Aksine, 500 mM 'ye kadar Atr düzeylerinin MDBK veya MDCK veya glomeruler fragmanlar üzerinde hiçbir etkisi bulunmamıştır (76). İn vitro ortamda Atr'ye maruz bırakılan saflaştırılmış renal mitokondriler ve proksimal tübülün yeni izole edilmiş fragmanları, solunum parametrelerinde benzer değişiklikler göstermiştir. Bu da state-3 mitokondriyal inhibisyonun varlığını teyit etmektedir. Bununla birlikte, glomeruller, 500 mM'ye kadar konsantrasyonlardaki Atr'den etkilenmemiştir, bu da Atr'ın bu hücreler içine selektif taşınmasının proksimal tübül toksisitesinin önemli bir belirleyicisi olabileceğini düşündürmektedir (72).

3.1.6.2. Hepatotoksik Etkiler

İnsanda görülen tüm klinik değişikliklerin çoğaltılmasının zor olması sebebiyle, Atr'ın hayvanlardaki hepatotoksik etkileri hakkındaki veriler hala yetersiz düzeydedir. C. laureola zehirlenmelerinde serum ALT ve AST enzim düzeylerinde artış olmuştur. Ayrıca vakaların % 91'inde hastalık her zaman kısa süreli, ancak ölümcül sonlanmıştır (84).

A. gummifera zehirlenmesinin prognozu, C. laureola ile aynı etkiyi yaptığı için kötü seyretmektedir ve olguların hayatta kaldığı vaka sayısı oldukça az bulunmaktadır (82). Ayrıca, saf Atr'ın karaciğerdeki etkisine yönelik çalışmaların çoğu, hepatositler ve karaciğer homojenatlarında gerçekleştirilmiştir.

Oral yoldan Atr verilen ratların karaciğerindeki majör patolojik ve biyokimyasal analizler incelenmiştir, ancak intraperitoneal olarak 10-100 mg / kg Atr kullanılan önceki çalışmalarda karaciğerde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (84, 85, 87). Bu da toksinin intraperitoneal yoldan uygulanması

durumunda hepatotoksisitenin önemsiz düzeyde olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, Atr'nin oral uygulamasının, ratlarda, intraperitoneal yolla hepatotoksisite üretemeyen doz aralığına kıyasla daha fazla hepatotoksisiteye neden olabileceğini gösteren hiçbir veri bulunmamaktadır. Bugüne kadar, intraperitoneal yolla saf toksin maruziyetinin santrilobüler nekrozun indüksiyonuna yol açtığını gösteren sadece bir çalışma bulunmakla beraber, bu örnekte domuzlara Atr yerine karboksi Atr verilmiştir (97).

3.1.6.3. Kardiyotoksik Etkiler

Atr, farelerde solunum arresti ve kalp yetmezliği sebebiyle ölüme neden olmaktadır (98). *In vitro* olarak Atr, kardiyak mitokondrinin oksidatif fosforilasyonunu inhibe etmektedir (99-101). Ancak ratlarda kardiyotoksik etkilere yol açmadığı görülmektedir (77, 95). Bununla birlikte, Shug ve arkadaşları, koroner ligasyonu olmayan köpeklerde Atr'nin intrakoroner infüzyonunun, miyokard iskemisi ile ilişkili olan değişikliklere benzer elektriksel ve metabolik değişikliklere neden olduğunu bildirmiştir (102). Nitekim, Atr'nin intrakoroner infüzyonu elektrofizyolojik çalışmalar için deneysel bir model olarak kullanılmıştır (103).

3.1.7. Toksik Etkilerin Modülasyonu

Atr'nin toksik etkilerine ilişkin moleküler mekanizmanın tam olarak anlaşılabilmesi sebebiyle, Atr maruziyetinden sonra böbrek veya karaciğer hasarını önleyebilecek veya sınırlandırabilecek rasyonel terapötik önlemler geliştirmek zor olmuştur. Atr'nin mitokondriye bağlanması, Atr'nin reaktif metilenine (çift bağ) karşı reaksiyonuna veya bu bağın azaltılmasına bağlı olarak merkaptotanol gibi

sülfidril reaktiflerle tedavi yoluyla azaltılabilmektedir (54). Atr'nin mitokondriyal solunumları inhibe edici etkisinin, Atr'nin yapısal bir analogu olan steviosid ve ADP tarafından ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir (61). ADP, Atr ile yakın bir geometrik yapı ve yük dağılımı benzerliğine sahip yapıdadır. Atr'nin sülfat gruplarının polar karakteri, ADP'nin fosfat gruplarınınkine karşılık gelen yapıdır. Atr'nin glikozit grubu ise ADP'nin riboz grubuna karşılık gelmektedir. Atr'nin steroid kısmı adeninin pürin halka sistemi ile geometrik ve hidrofobik bir benzerliğe sahiptir. Atr'nin aglikonu (atractyligenin) oksidatif fosforilasyonun çok daha az aktif bir inhibitörüdür (54).

Atr ile zehirlenen insanlar ve köpeklerde mekanik ventilasyon nefrotoksisitenin başlangıcını belirgin olarak geciktirmektedir (80, 82). Ayrıca, probenesid ile tedavi edilen köpeklerde normal asit baz dengesi ve plazma glikoz seviyeleri korunmakta ve nihayetinde Atr zehirlenmesinin şiddeti azalmaktadır (80).

Anyon taşıma mekanizmasının önemi, rat ve domuz böbrek kesitlerindeki p-aminohippurat ve Atr arasındaki etkileşim tarafından desteklenmektedir (104). ADP, steviosid ve merkaptotanolün Atr'nin mitokondriyal toksisitesini ortadan kaldırdığı bilinmesine rağmen, bu bileşiklerin terapötik değere sahip olup olmadıkları araştırılmaya devam etmektedir (51, 54).

Atr içeren bitkilerin işlenmesi toksisitesini sınırlayabilmektedir. Örneğin, C. arabica çekirdeklerinin kavrulmasının, glikozit içeriğini azalttığı ve böylece potansiyel toksisitesini azalttığı görülmüştür (88).

Atr önemli bir biyokimyasal araçtır, çünkü izole edilen mitokondrinin dış zarlarındaki oksidatif fosforilasyonu spesifik olarak inhibe etmektedir. Bununla

birlikte, bu mekanizma, toksisiteye yol açtığı tek mekanizma olmayabilir. İnsanlarda oral yoldan alınan bitki materyallerinin miktarları ve Atr'nin plazma ve organ konsantrasyonu hakkındaki verilerin yetersiz olması sebebiyle insanlarda ve deney hayvanlarında Atr toksisitesinin doğrudan karşılaştırılması karmaşık hale gelmektedir. Ayrıca Atr'nin metabolizması ve atılımı ve toksisiteye katkıda bulunan veya buna neden olan diğer bitki bileşenlerinin varlığı bilinmemektedir.

Şiddetli hipoglisemi, solunum depresyonu, koma ve böbrek ve karaciğer fonksiyon bozukluğu açısından benzerliklerin olması, saf Atr'ın deney hayvanlarına uygulanmasının ilgili ve faydalı bir model olduğunu düşündürmektedir.

İnsanların Atr'ye duyarlılığı konusunda (karaciğer ve böbrek hasarının görüldüğü mg/kg doz aralığı açısından) belirsizlik vardır. Çocukların daha fazla risk altında olup olmadığını ve Atr toksisitesinde tropikal hastalıkların veya yetersiz beslenmenin varlığının hangi rolü oynayabileceğini belirlemeye de ihtiyaç vardır.

Atr ile indüklenen proksimal tübüler nekroz ve santrilobüler nekrozun moleküler temeli tam olarak anlaşılamamıştır. Nekrozun sadece solunumun inhibisyonuna veya diğer faktörlerin kombinasyonuna atfedilebileceği açık değildir. Bu belirsizlik, mekanik bilgilerdeki eksikliklerden, farmakokinetik, metabolizma, mutajenite ve kanserojenlik ile birlikte üreme ve kronik toksisite hakkındaki rutin verilerin eksikliğinden kaynaklanmaktadır.

Ana Atr bileşiğinin ve metabolitlerinin toksisitedeki rolleri ile ilgili karşılaştırmalı bir tanımlama yapılmamıştır. Atr' nin in vitro etkileri hakkında daha fazla bilgiye ihtiyaç bulunmaktadır. Burada bu hususların bazıları, etki mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olmak amacıyla daha iyi değerlendirilebilecektir. Ek olarak, yenilebilir bitkilerde, özellikle insan gıda

zincirinde bulunanlarda, Atr varlığı hakkında daha fazla veri olmalıdır. Tablo l'de belirtilen bitkilerin veya Atr içerdığı bilinen bitkilerin hiçbiri drog hazırlamak için kullanılmamalı ve evcil hayvanların bu tür bitkiler üzerinde otlaması engellenmelidir. Bununla birlikte, Atr'nin akut zehirlenmesi için hiçbir antidot bulunmamaktadır.

Gelecekteki araştırmaların odak noktaları arasında; Atr'ye yönelik insan gıdası araştırmaları eğitim girişimleri yoluyla, Atr içeren bitkilere maruziyetten kaçınılması, bitkilerde (özellikle insan gıdalarında) doğal olarak bulunan Atr ve Atr analoglarının karşılaştırılmalı toksisite çalışmaları ve bilinen Atr içeriğine sahip bitkilerin toksisitesinin sadece Atr'ye özgü olup olmadığını veya diğer bitki bileşenlerinin Atr toksisitesini bariz bir şekilde etkileyip etkilemediğini belirlemeye yönelik çalışmalar bulunmalıdır. Ek olarak, insanlardaki toksisitesini sınırlamak veya ortadan kaldırmak için uygun terapötik müdahale stratejilerinin sağlanmasına ihtiyaç vardır.

3.1.8. Deneysel Olarak İndüklenen Lezyonlar

Atr'nin medyan letal dozu (LD50) türler arasında değişiklik göstermektedir (36). Ancak, farklı uygulama yolları arasındaki bu farklılıklar minimal düzeyde olmakla beraber, muhtemelen farklı laboratuvarlardaki deneyimler, belgelenmemiş farklı doz koşulları veya kullanılan hayvanlar arasındaki yaşa bağlı farklılıklardan kaynaklandığı düşünölmektedir.

İtalya'da üretilen erkek albino ratlar intraperitoneal olarak verilen 200 mg / kg Atr'yi tolere edebilmiştir, ancak Güney Afrika'da üretilen erkek Wistar ratlar intraperitoneal yoldan 60 mg/kg uygulandıktan sonra 8 saat içinde ölmüştür (36, 95).

Hedef organ toksisitesi türler arasında değişmektedir. Ayrıca, bu toksinin benzer dozlarının aynı yoldan ve benzer koşullar altında verilmiş olması durumunda bile, tavşanların ve kobay domuzlarda; diğer hayvanlarla benzer bir hiperglisemi başlangıcı ve müteakip bir hipoglisemi durumu şekillenmesine rağmen, neden böbrek yetmezliğinin gelişmediği net olarak ortaya konulamamıştır (41, 42, 43). Bu, dirençli türlerdeki proksimal tübüler fonksiyon ve morfolojideki kantitatif farklılıklar ile açıklanabilir, ancak Atr farmakokinetiğindeki farklılıklar daha önemli olabilir.

Hayvanlardaki tüm LD50 verileri, parenteral yola ilişkin veriler olmakla beraber, oral yol için herhangi bir veriye rastlanmamıştır (105). Atr'nin, deney hayvanlarında karaciğer ve böbrek nekrozuna neden olduğu ve birkaç çalışma da kardiyotoksik bir etkiye sahip olabileceğini öne sürmektedir (77). Bununla birlikte, Atr'nin subkronik ve kronik toksisitesi, üreme toksisitesi, mutajenitesi veya kanserojenitesi hakkında yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır.

3.1.9. Atraktilozid Toksisitesi ile İlgili Bazı Vakalar

A.gummifera zehirlenmesinin klinikopatolojisi ile ilgili belgelenmiş olan raporların sayısı, benzer semptomlar gösterse de C.laureola ile ilgili raporların sayısına göre daha düşüktür. Cinsiyet yatkınlığı açısından anlamlı bir fark bildirilmese de, ölümlerin çoğunun 14 yaşın altındaki çocuklarda meydana geldiği bildirilmiştir (84). Atr içeren bitkisel ilaçların yutulmasını takiben, özellikle de çocuklarda ölümcül böbrek ve karaciğer nekrozu meydana gelmektedir (84, 92).

C. laureola, A. gummifera veya X. strumarium (cocklebur) ile zehirlenen hastalarda 800 kata kadar yüksek bir serum ALT ve AST düzeyleri görülmektedir.

Bu da protrombin indeksindeki %50'lik azalma ve keskin sınırlı ve şiddetli santrilobüler hepatoselüler nekroz ile ilişkili karaciğer hasarının varlığını göstermektedir (82, 84, 85, 87). Genellikle, Atr içeren bitkisel ilaçların alımından sonraki 24 saat içinde ölümcül nefrotoksisite olgusunda klinik olarak; serum kreatinininde yavaş bir artış, idrar çıkışında artış ve hiperkalemik akut böbrek yetmezliğinin varlığı ile kendisini göstermiştir (84).

Türkiyede' de yaşanan bir olguda farklı yaşlarda 9 kişi pıtrak bitkisinin tohumlarını yediği için zehirlenmiş ve bunlardan 3 kişinin yapılan semptomatik tedaviye rağmen öldüğü kaydedilmiştir (35).

Düşük seviyeli kronik maruziyet ile ilgili herhangi bir veri bulunmamaktadır. Ayrıca, Atr seviyeleri bilinmeyen bitki materyaline maruz kalınması sebebiyle, tekrarlı dozların insanlardaki etkisi net olarak belirlenememiştir.

İlk yapılan istatistiksel ve epidemiyolojik çalışmalarda, günde 1-3 fincan kadar az kahve tüketiminin olduğu bireylerde dahi, pankreas kanseri riskindeki artışla kahveden elde edilen Atr analogları arasında (C. arabica, fakat C. robusta değil) bir bağlantı kurmaya çalışılmıştır (90). Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı yakın tarihli araştırmalardan elde edilen sonuçları baz alarak, kahve içilmesi ile pankreas kanseri riskinin artması arasındaki ilişkiyi destekleyecek kanıtların “yetersiz” olduğu sonucuna varmıştır (106, 107).

X. strumarium (cocklebur-sırça otu) üzerinde otlayarak kazara zehirlenen buzağılarda, bulantı ve konvülsiyon veya hipereksitabilite belirtileri ve körlük meydana gelmiş, ancak daha sonra iyileşme göstermiştir (108). Domuzlarda da kusma ve koma gelişiminin olduğu bulunmuştur (94). Histolojik olarak belirgin

santrilobüler dejenerasyon ve nekroz ve bununla ilişkili hemoraji, kojensyon ve beyin lezyonları tespit edilmiştir (109).

Bu tez çalışmasında Güney Afrika başta olmak üzere, az gelişmiş ülkelerde hem insan hem de hayvanlarca oldukça fazla kullanılan geleneksel bitki bileşeni olan atr, ülkemizde de yaygın bir şekilde dere kenarlarında, boş arazilerde, çöplük yakınlarında yetişen *X. strumarium* bitkisinde bulunduğu ve potansiyel risk oluşturduğu için deneysel olarak oral yolla ratlara verilmesini takiben bazı Toksikokinetik parametrelerinin belirlenmesi ve Atr toksisitesi ile ilgili antidot çalışmalarına ışık tutması, özellikle atr'nin bazı toksikokinetik parametrelerine ilişkin literatürdeki eksikliğin giderilmesi amaçlanmıştır.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Gereçler

4.1.1. Cihaz ve Malzemeler

1. Gaz kromatografi-kütle spektrofotometre (Shimadzu)
2. Otomatik enjektör (Shimadzu)
3. Derin dondurucu (Arçelik -20 °C)
4. Su banyosu (Nüve BM402)
5. Deiyonize su cihazı (Millipore)
6. Vorteks (Velp)
7. Santrifüj (Hettich)
8. Hassas terazi (Denver)
9. Manyetik karıştırıcı (Colora)
10. pH metre (Thermo)
11. Otomatik pipet (Brand 10-100 µl, 100-1000 µl)
12. Balon joje (25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 1000 ml)
13. Mezür (25 ml, 50 ml, 100 ml, 1000 ml)
14. Erlenmayer (250 ml, 500 ml)
15. Cam pipet (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)
16. Beher (25 ml, 50 ml)
17. Pipet ucu (100 µl, 1000 µl)
18. Cam Tüp (5 ml, 10 ml)
19. Ependorf tüp (1,5 ml)
20. Vial

4.1.2. Kimyasallar

1. Potasyum Atraktilozid (Cayman)
2. Pyridin (Sigma)
3. 1-(Trimethylsilyl)imidazole (Sigma)
4. Aseton (Merck)
5. Hidroklorik asit (Merck)
6. Helyum gazı (% 99,9999 saflıkta)
7. Azot gazı (% 99,9999 saflıkta)
8. Etil asetat (Merck)

4.2. Yöntem

4.2.1. Hayvan Materyali

Çalışmada 200-250 gr ağırlığında 6-7 haftalık 72 adet Wistar Albino cinsi erkek rat kullanıldı. Kullanılan deney hayvanları, Bingöl Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezinden temin edildi. Çalışmaya alınan ratlar standart şartlar altında (sabit ısı ve havalandırılmalı odalarda; 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık olmak üzere) özel kafeslerde muhafaza edildi. Ratlara taze su ve yem ad libitum olarak verildi.

Bingöl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan alınan 21.02.2018 tarih ve 02/01 karar sayılı etik onayı ile standart deneysel hayvan çalışmaları yapıldı.

Ratların gruplandırılması aşağıdaki gibi yapıldı:

- ✓ Grup 1: Kontrol grubu (6 adet)
- ✓ Grup 2: Deneme grubu (66 adet)

Pıtrak (*Xanthium strumarium* L.) bitkisinin tohumları dikenli kapsüllerden çıkartılıp öğütüldükten sonra ekstrakte edildi. Ekstrakt içindeki Atr miktarı ise bu çözeltinin HCl ile hidrolize edilmesini takiben etil asetat ile karıştırılması işlemi ve piridin-TMSI solüsyonu ile türevlendirilme aşamasından sonra GC-MS cihazı ile tespit edildi (110). Deneme grubundaki her bir hayvana ağız yolu ile 80 mg/kg dozunda Atr verildi. Kontrol grubu ve deneme gruplarından 0, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96 ve 120. saatlerde ratlar ötenazi yapılarak kan alındı.

Stok Standart Solusyonu: Standart Atr (potasyum tuzu) metanol içerisinde 12.5 mmol/l düzeyinde hazırlandı ve 4 °C de saklandı.

4.2.2. Kan Atraktilozid Analizi

Cam tüplere ratlardan 1 ml kan alınarak üzerine 1 ml aseton kondu ve vortekslendi. Homojenat +4 °C de 5 dakika 3500 rpm'de santrifüj edildi ve süpernetant alındı. Alınan süpernatant azot gazı altında 45 °C de kurutuldu. Kurutulan ekstrakt üzerine 1 ml distile su ve hidroliz oluşturmak amacıyla 2 ml hidroklorik asit (2 mol/l) kondu, vortekslendi ve oda ısısında 12 saat bekletildi. Hidrolizat 5 defa 2'şer ml etil asetat ile her seferinde 2 dakika vortekslenerek ekstrakte edildi ve bir tüpte toplandı. Toplanan organik ekstrakt azot gazı altında 40 °C de kurutuldu. Kuruyan ekstrakt üzerine derivatizasyon için piridin (200 mikrolitre) ve TMSI (200 mikrolitre) eklenerek 100 °C de 2 saat bekletildi ve

sonra 2 mikrolitre derivat aşağıdaki koşullarda GC-MS cihazına enjekte edildi (110, 111).

GC-MS Őartları: Kanlardaki Atr miktarı Shimadzu marka gas kromatografi-kütle spektrometre (GCMS-QP2010) ile geręekleřtirildi.

Kromatografik Kolon: DB-1 kapillar kolon (30m x 0.25 mm iç ęaplı)

Taşıyıcı gaz: Helyum

Tarama modu: Splitless

Dedektör sıcaklığı: 200 °C

Enjeksiyon ısısı: 250 °C

Kolon ısısı: 2.3 dakika arayla 215 °C den 310 °C ye ęıkacak Şekilde programlandı.

Kolon gaz akış hızı: 1,9 ml/dk

MS kütle aralığı: 40-800 u.

İnterface Sıcaklığı: 250 °C

İon Surce Sıcaklığı: 200 °C

4.2.3. Standart Eğrisinin Hazırlanması

4, 8, 12 µg/ µl Atr ihtiva eden ęözeltiler GC-MS cihazına enjekte edilerek standart eğrisi elde edildi.

4.2.4. Yöntemin Geri Kazanımının Tespiti

Bu amaçla üç farklı düzeyde (4 µg, 8 µg, 12 µg) Atr ilave edilen kan örnekleri kullanılmış ve analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Her bir yoğunluk için geri kazanım oranları belirlenmiş ve ardından ortalamaları alındı.

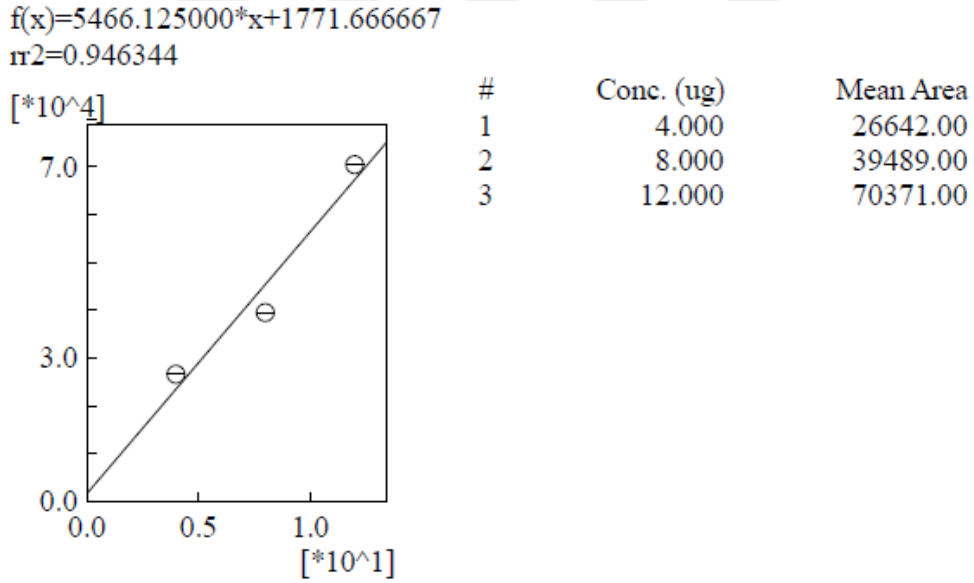
4.2.5 Toksikokinetik ve İstatiksel Analiz Bilgileri

Analiz işlemi tamamlandıktan sonra farmakokinetik yazılım programı PKSolver Non-Compartmental Analysis yardımı ile bazı toksikokinetik parametreler hesaplandı. Verilerin istatistiksel analizlerinde ‘‘SPSS 13,0 for Windows’’ paket programı kullanılmıştır. Veriler, aritmetik ortalama ve standart sapma şeklinde verilmiştir.

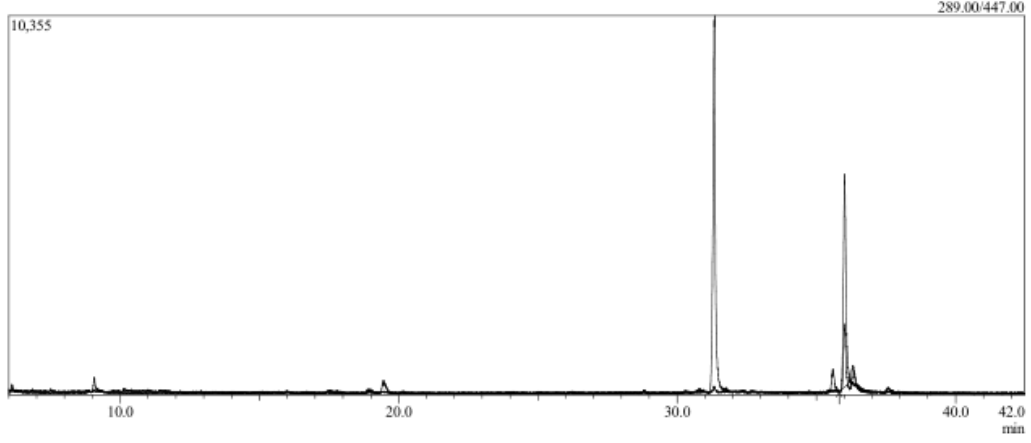
5. BULGULAR

5.1. Kan Atraktilozid Standart Eğrisi

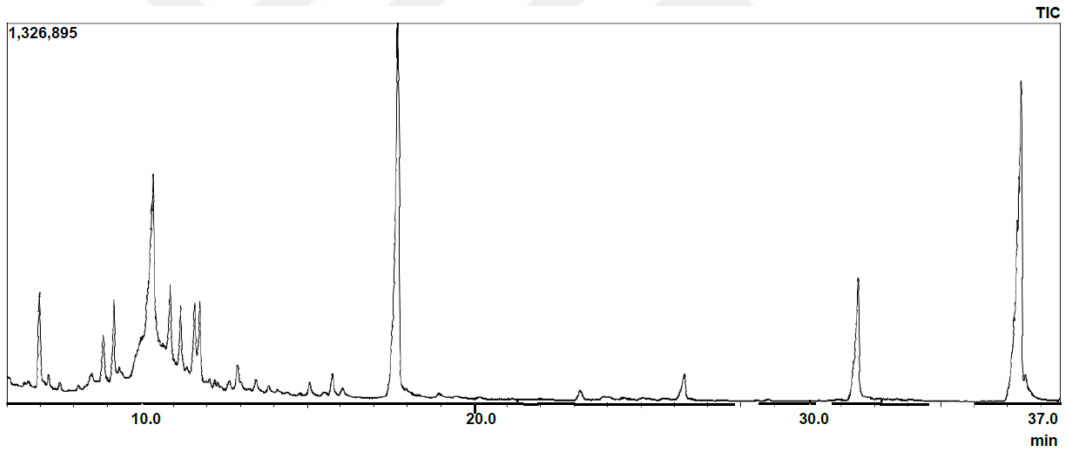
Stok çözümden 4, 8 ve 12 µg/µl' lik standart çözümler hazırlandı, bu yoğunluktaki standartlar ile çizdirilen alan ile konsantrasyon arasındaki ilişki (kalibrasyon eğrisi), eğrinin korelasyon katsayısı (r²) ve plazma örneklerinden Atr yoğunluklarının hesaplanmasında kullanılan kalibrasyon eğrisi ve denklemini Şekil 4' te ve 8 mikrogram Atr standartının kromatogramı Şekil 5'te, kandaki Atr kromatogramı ise Şekil 6'da verildi.



Şekil 4. Atr Kalibrasyon Eğrisi ve Denklemini



Şekil 5. 8 mikrogram Atr Standartının Kromatogramı



Şekil 6. Kanda Saptanan Atr Kromatogramı

5.2. Kan Atraktilozid Geri Kazanımı ve Saptama Limiti

Üç farklı düzeyde (4 $\mu\text{g/ml}$, 8 $\mu\text{g/ml}$, 12 $\mu\text{g/ml}$) Atr ilavesi ile geri kazanım oranı ortalama % 89.50 ve saptama limiti 17 ng/ml olarak bulundu.

5.3. Elde Edilen Bazı Toksikokinetik Değişkenler

80 mg/kg dozunda Atr ağız yolu ile verildikten sonra belirtilen dönemlerde Atr ortalama kan yoğunluğu ve standart hataları Tablo 2’de, elde edilen bazı toksikokinetik parametreler Tablo 3’ te verildi.

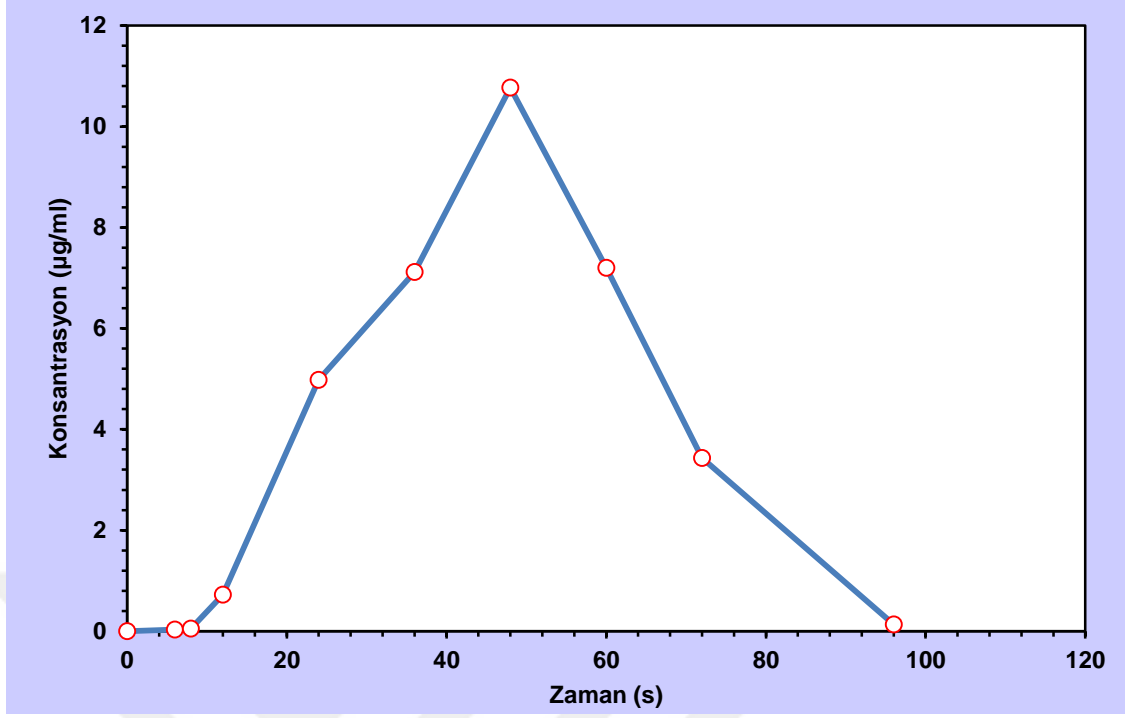
Tablo 2. Kan Alma Dönemleri ve Ortalama Kan Atr Düzeyleri (µg/ml)

Gruplar	Zaman	Ort ± sem
Kontrol Grubu	0. saat	0
1. Grup	4. saat	0
2. Grup	6. saat	0,031 ± 0,004
3. Grup	8. saat	0,053 ± 0,011
4. Grup	12. saat	0,072± 0,192
5. Grup	24. saat	4,983 ± 1,258
6. Grup	36. saat	7,126 ± 1,599
7. Grup	48. saat	10,776 ± 2,601
8. Grup	60. saat	7,200 ± 1,333
9. Grup	72. saat	3,433 ± 0,944
10. Grup	96. saat	0,134 ± 0,034
11. Grup	120. saat	0

Tablo 3. Atr'nin Bazı Toksikokinetik Parametreleri

Toksikokinetik Parametreler	Oral Yol
k_a (saat ⁻¹)	0,114
$t_{1/2}$ (saat)	6,071
T_{max} (saat)	48
C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	10,77
EAA 0→120 ($\mu\text{g}/\text{saat}/\text{ml}$)	430,231
MRT(saat)	47,807
V_{dss} (ml/kg)	1,623
Cl (Klirens) (ml/saat/kg)	0,185

Atr'nin ratlara oral yolla 80 mg/kg dozunda uygulanmasını takiben kan yoğunluk-zaman eğrisi Şekil 7' de gösterildi.



Şekil 7. Atr'nin Kan Yoğunluğu-Zaman Eğrisi

Atr'nin ratlara oral yolla verildikten sonra elde edilen bazı toksikokinetik parametreler; birinci derece emilme hız sabitesi (k_a) $0,114 \text{ saat}^{-1}$; plazmada yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) $6,071 \text{ saat}$, 0.zamandan 120.saate kadar serum ilaç yoğunluğu zaman eğrisi altında kalan alan (EAA $0 \rightarrow 120$) $430,231 \mu\text{g/saat/ml}$, doruk ilaç yoğunluğu (C_{max}) $10,77 \mu\text{g /ml}$ ve ilaç yoğunluğunun doruk değere ulaşma süresi (T_{max}) 48 saat , ortalama kalış süresi (MRT) $47,807 \text{ saat}$; dağılım hacmi (V_{dss}) $1,623 \text{ ml/kg}$; klirens (Cl) ise $0,185 \text{ ml/saat/kg}$ olarak bulundu.

6. TARTIŞMA

Atr içeren bitkiler geleneksel tedavide halk tarafından sıklıkla ve bilinçsiz bir şekilde tüketilmektedir. İnsanların çoğunlukla bu bitki kaynaklı tedaviye başvurma sebepleri arasında doğal olmaları, kolay temin edilebilir ve aşırı bir maliyet gerektirmediğinden ekonomik olmaları başlıca nedenler arasındadır. Bu tür bitkilerin doz ayarlaması yapılmaksızın bilinçsizce aşırı tüketilmesi zehirlenmeleri de beraberinde getirmektedir. Pıtrak gibi Atr ihtiva eden bitkilerin çocuklarda merak uyandırması da diğer bir zehirlenme nedenleri arasında sayılabilmektedir.

Kırsal kesimlerde bu bitkinin dikenli kısımlarının içinde bulunan tohumlarının ayçiçeği çekirdeğine görüntü ve tad olarak benzemesi de çocuklarda ilgi uyandırmakta ve bu bitkinin çocuklar tarafından aşırı miktarda tüketilmesi sonucu Atr zehirlenmesine yol açmaktadır. Bunun örneği Turgut ve arkadaşlarının bildirdiği bir vakada, Atr içeren *Xanthium strumarium* bitkisinin tohumları meraklı 8 çocuk (yaşları 5, 9, 9, 10, 14, 14, 16, 17) ve 1 yetişkin (yaş 44) tarafından kazara tüketilmesi sonucu en küçük 3 çocukta şiddetli semptomlar görülmüş ve hastanede müdahale edilmiştir. Çocukların ebeveynlerinin vermiş olduğu anamnez sonucunda zehirlenme sebebinin pıtrak bitkisinden kaynaklandığı bildirilmiştir. Zehirlenen bu çocuklara zehirlenmeden 8-10 saat sonra semptomatik tedavi uygulanmıştır. Ancak, yapılan tüm müdahalelere rağmen şiddetli semptom gösteren 3 çocuk kurtarılamamıştır. Diğer çocuklarda 12 gün süresince semptomatik tedavi sonucu sağlıklarına kavuşturulmuştur (35). Bu süre ele alındığında Atr'in antidotunun eksikliğinin ne kadar önemli olduğu bir kez daha görülmektedir. Ayrıca, yapılan destekleyici tedavininde yetersiz olduğuda söylenebilir. Çünkü, şiddetli

semptomların görüldüğü vakaların hastaneye getirilmesine rağmen, yaklaşık 10 – 12 saat sonra ölen 3 çocuğun yedikleri pıtrak tohumundaki toksik madde kararlı konsantrasyona ulaşmadan semptomatik tedavi protokolüne rağmen kurtarılamamıştır.

Mitokondriyel membran geçirgenliğinde rol alan porların geçirgenliğini bozarak bu porların açılmasına neden olması Atr' nin temel etkisidir ve mitokondriyel membran hasarı oluşumu sonucu oksidatif fosforilasyonu spesifik olarak engellemesi Atr' nin direkt olarak toksik etkisinin bir sonucudur. Bunlara ek olarak, glukoneogenez, ketogenez ve yağ asitlerinin oksidasyonu, Atr tarafından inhibe edilerek anaerobik solunum uyarılmaktadır.

Atr toksisitesi olgularında 2 türlü ölümler şekillenmektedir: birincisi ve çoğunlukla şekillenen vakalar, Atr içeren bitkilerin tüketiminden sonra saatler içinde hipoglisemik bir koma fazından sonra hızlı bir şekilde ölüm gerçekleşir; ikincisi ise bir kaç gün içerisinde şekillenen karaciğer ve şiddetli böbrek yetmezliği sonucu meydana gelen ölümlerdir. Atr toksisitesinde sarılık nadir görülen bir semptomdur.

Uzun yıllar, Atr zehirlenmesi, özellikle hayvan deneylerinde, postmortem histopatolojik doku analizlerinde hepatik santrilobüler nekroz ve renal tübüler nekroz bulguları elde edilerek postmortem değişikliklere göre ortaya konmuştur.

Carlier ve arkadaşlarının 2014 yılında yayınladıkları çalışmaya göre Atr kaynaklı bitkilerden bir tanesi olan *Atractylis gummifera* L. bitkisinin 3 gün suda bekletilmiş dikenlerini yanlışlıkla tüketen bir bayanın kanında Atr miktarını hesaplamak için HPLC-HRMS/MS cihazını kullanarak metod geliştirmişlerdir

(112). Bu metod sayesinde ilk kez insanlarda tam kanda Atr tayini yapılmış ve kandaki Atr seviyesini ölçmek mümkün olmuştur. Yine bu metodla insanlardaki Atr kaynaklı zehirlenmelerin teşhisinin analitik yönde tespit edilebilmesi mümkün olmuştur.

Atr kaynaklı bitkilerden olan *Xanthium strumarium* L. bitkisi geleneksel tıpta yaygın bir şekilde antibakteriyel, antitissuf gibi farmakolojik etkilerinden dolayı yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu bitki de insanlar başta olmak üzere hayvanlarda da toksik etkilere ve zehirlenmelere sebep olmaktadır. Bu bitki yol kenarlarında, dere kanarlarında, boş arazilerde ve sulak alanlarda kendiliğinden yaygın bir şekilde büyümekte ve hayvanlar tarafından tüketilmesi sonucu zehirlenmelere ve ölümlere yol açmaktadır. Bu bitkiden kaynaklı gerek insanların ve gerekse de hayvanların zehirlenmelerinin teşhisinde kandaki Atr miktarını analitik yöntemlerle ortaya koymak için bu zamana kadar herhangi bir kolay uygulanabilir ve kabul görmüş bir analitik metod geliştirilememiştir. Bu çalışmamızda, bu zamana kadar hayvanlardaki Atr zehirlenmesinin teşhisinde analitik olarak ölçüm yapmak için ülkemizde ilk kez metod geliştirildi ve ratlarla deneysel olarak oluşturulan Atr toksisitesi sonucu ratların kanındaki Atr miktarı ülkemizde ve dünyada ilk kez GC-MS ile tespit edildi. Yöntemin geri kazanım oranı ortalama % 89.50 ve saptama limiti 17 ng/ml olarak bulundu.

Bu çalışma öncesine kadar atr'nin ağız yolu veya diğer yollarla uygulanması sonucu ratlarla ve diğer canlılarda herhangi bir toksikokinetik veri/verilere rastlanmamıştır. Bu çalışma sayesinde Atr ratlara 80 mg/kg dozunda uygulanması sonucu bazı toksikokinetik değerler ortaya konmuş oldu.

Yapılan bu tez çalışmasında Atr'nin, birinci derece emilme hız sabitesi (k_a) 0.114 saat^{-1} ; doruk ilaç yoğunluğu (C_{max}) $10.77 \mu\text{g /ml}$, ilaç yoğunluğunun doruk değere ulaşma süresi (t_{max}) 48 saat; plazmada yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) 6.071 saat, 0.zamandan 120.saate kadar serum ilaç yoğunluğu zaman eğrisi altında kalan alan (EAA 0→120) $430.231 \mu\text{g/saat/ml}$, , ortalama kalış süresi süre (MRT) 47.807 saat; dağılım hacmi (V_{dss}) 1.623 ml/kg ; klirens (Cl) 0.185 ml/saat/kg olarak bulundu.



7. SONUÇ

Bugüne kadar pıtrak kaynaklı zehirlenmelerde, spesifik bulguların olmaması ve analitik yöntemlerin yetersiz olması nedeniyle teşhis genellikle anamnez bulgularına göre yapılıyordu. Çalışmamızda Atr'in kandaki düzeyinin hızlı, güvenilir, sade bir analitik yöntemle ve hasas ölçülebilir olduğunu ortaya koyduk.

Atr kaynaklı zehirlenmelerin engellenebilmesi için çobanlar başta olmak üzere tüm insanlar zehirli bitkiler konusunda bilinçlendirilmeli ve bu hususta kreşten üniversite eğitimi süresince çocuklara ve gençlere eğitim verilmelidir. Ayrıca, Atr ihtiva eden bitkilerde ülkemizde zehirli bitkiler listesine dahil edilmelidir.

Çalışmamızda Atr ile ilgili bazı toksikokinetik parametreler ortaya konularak bu parametrelerin ileride yapılacak olan, farmakokinetik parametrelerin tespitine ve özellikle de antidot çalışmalarına ışık tutması beklenmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Bateman J, Chapman D, Simpson D. Possible toxicity of herbal remedies. Scot Med Journ. 1998;43: 7–15.
2. Stickel F, Egerer G, Seitz HK. Hepatotoxicity of botanicals. Pubc Health Nut. 2000; 3: 113–24.
3. De Smet PAGM, Keller K, Hansel R, Chandler RF. Adverse effects of herbal drugs. New York: Springer, 1992: 1-13.
4. Kaplowitz, N. Hepatotoxicity of herbal remedies: insights into the intricacies of plant-animal warfare and cell death. Gastroenterology. 1997; 113(4): 1408-1412.
5. Fugh-Berman, A. Herb-drug interactions. The Lancet. 2000; 355(9198): 134-138.
6. O'Hara M, Kiefer D, Farrell K, Kemper K. A review of 12 commonly used medicinal herbs. Archives of family medicine 1998; 7(6): 523–536.
7. Van Wyk, BE, Oudtshoorn BV, Gericke N. Medicinal Plants of South Africa. Briza, 1997.
8. Wainwright J, Schonland MM. Toxic hepatitis in black patients in Natal. South African medical journal= Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde 1977;51(17): 571–573.
9. Stewart MJ, Steenkamp V, Zuckerman M. The toxicology of African herbal remedies. Therapeutic drug monitoring 1998; 20: 510–516.
10. Thomson S. Traditional African medicine: genocide, and ethnopiracy against the African people. Report to the South African Medicines Control Council. Gaia Research Institute, 2000.

11. Joubert P, Sebata BAB. S. The role of prospective epidemiology in the establishment of a toxicology service for a developing community. South African medical journal= Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde 1982; 62(23): 853-854.
12. Venter CP, Joubert PH. Aspects of poisoning with traditional medicines in southern Africa. Biomedical and environmental sciences: BES 1988; 1: 388–391.
13. Stewart MJ, Moar JJ, Steenkamp P, Kokot M. Findings in fatal cases of poisoning attributed to traditional remedies in South Africa. Forensic science international, 1999; 101: 177–183.
14. Steenkamp V, Stewart MJ, Zuckerman M. Detection of poisoning by Impila (*Callilepis laureola*) in a mother and child. Human & experimental toxicology 1999; 18: 594–597.
15. Foukaridis GN, Muntingh GL, Osuch E. Application of diode array detection for the identification of poisoning by traditional medicines. Journal of ethnopharmacology 1994; 41: 135–146.
16. Seedat YK, Hitchcock PJ. Acute renal failure from *Callilepis laureola*. South African Medical Journal 1971; 45: 832–833.
17. Wainwright J, Schonland MM, Candy HA. Toxicity of *Callilepis laureola*. South African Medical Journal 1977; 52: 313–315.
18. Obatomı DK, Bach PH. Biochemistry and toxicology of the diterpenoid glycoside atractyloside. Food and chemical toxicology 1998; 36 (4): 335-346.

19. Santi R. and Luciani S. *Atractyloside: Chemistry, Biochemistry and Toxicology*. Padova: Piccin, 1978.
20. Obatomi DK, Bach PH. Inhibition of mitochondrial respiration and oxygen uptake in isolated rat renal tubular fragments by atractyloside. *Toxicology Letters* 1996; 89: 155-161.
21. Chen JJ, Bertrand H, Yu BP. Inhibition of adenine nucleotide translocator by lipid peroxidation products. *Free Radical Biology and Medicine* 1995; 19: 583-590.
22. Obatomi DK, Brant S, Anthonypillai V, et al. Toxicity of atractyloside in precision-cut rat and porcine renal and hepatic tissue slices. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 148: 35 – 45.
23. Golovach NG, Cheshchevic VT, Lapshina EA, Tillich TV, Zavodnick IB. Calcium-induced mitochondrial permeability transitions: Parameters of Ca²⁺ ions interactions with mitochondria and oxidative agents. *The Journal of Membrane Biology* 2017; 250: 225-236.
24. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, et al. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 1998b; 281: 2027-2031.
25. Brenner C, Cadiou H, Vieira HLA, et al. Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 2000; 19: 329-336.
26. Zamzami N, El Hamel C, Munoz C, et al. Bid acts on the permeability transition pore complex to induce apoptosis. *Oncogene* 2000; 19: 6342-6350.

- 27.** Costantini P, Belzacq AS, Vieira HLA, et al. Oxidation of a critical thiol residue of the adenine nucleotide translocator enforces Bcl-2-independent permeability transition pore opening and apoptosis. *Oncogene* 2000; 19: 307-314.
- 28.** Vieira HLA, Belzacq AS, Haouzi, D., et al. The adenine nucleotide translocator: A target of nitric oxide, peroxynitrite and 4-hydroxynonenal. *Oncogene* 2001; 20: 4305-4316.
- 29.** Morris Kupchan S, Eakin MA, Thomas AM. Tumor inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relations among the sesquiterpene lactones. *J. Med. Chem* 1971; 14:1147 – 1152.
- 30.** Scherer R, Godoy HT. Effects of extraction methods of phenolic compounds from *Xanthium strumarium* L. and their antioxidant activity. *Rev. bras. plantas med* 2014; 16:41 – 46.
- 31.** Malekova L, Kominkova V, Ferko M, et al. Bongkrekitic acid and atractyloside inhibits chloride channels from mitochondrial membranes of rat heart. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1767: 31-44.
- 32.** Colodel M, Driemeier E, et al. Experimental poisoning by the burs of *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) in cattle. *Pesq. Vet. Bras* 2000; 20: 31 – 38.
- 33.** Scherer R, Godoy HT. Effects of extraction methods of phenolic compounds from *Xanthium strumarium* L. and their antioxidant activity. *Rev. bras. plantas med* 2014; 16:41 – 46.

34. Loretto AP, Bezera PS, Ilha MRS, et al. Experimental poisoning by the burs of *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) in sheep. *Pesq. Vet. Bras* 1999; 19: 71 – 78.
35. Turgut M, Alhan CC, Gürgöze M, et al. Carboxyatractyloside poisoning in humans. *Ann Trop Paediatr* 2005; 25: 125 – 134.
36. Hsu FL, Chen YC, Cheng JT. Caffeic acid as active principle from the fruit of *Xanthium strumarium* to lower plasma glucose in diabetic rats. *Planta Med* 2000; 66: 228 – 230.
37. Xue LM, Zhang QY, Han P, et al. Hepatotoxic constituents and toxicological mechanism of *Xanthium strumarium* L. Fruits. *J Ethnopharmacol* 2014; 152: 272 – 282.
38. Wang Y, Han T, Xue LM, et al. Hepatotoxicity of kaurene glycosides from *Xanthium strumarium* L. fruits in mice. *Pharmazie* 2011; 66: 445 – 449.
39. Schutt F, Aretz S, Auffarth GU, et al. Moderately Reduced ATP Levels Promote Oxidative Stress and Debilitate Autophagic and Phagocytic Capacities in Human RPE Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53: 5354 – 5361.
40. Botha CJ, Lessing D, Rösemann M, et al. Analytical confirmation of *Xanthium strumarium* poisoning in cattle. *J Vet Diagn Invest* 2014; 26: 640–645.
41. Witte ST1, Osweiler GD, Stahr HM, et al. Cocklebur toxicosis in cattle associated with the consumption of mature *Xanthium strumarium*. *J Vet Diagn Invest* 1990; 2:263 – 267.

42. Saidi H, Mofidi M. Toxic Effect of *Xanthium Strumarium* as an Herbal Medicine Preparation. *Excli Journal* 2009; 8: 115-117.
43. Shidoji Y, Nakamura N, Moriwaki H, et al. Rapid loss in the mitochondrial membrane potential during geranylgeranoic acid-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 230: 58 – 63.
44. Hamouda C, Amamou M, Thabet H, et al. Plant poisonings from herbal medication admitted to a Tunisian toxicologic intensive care unit, 1983–1998. *Veterinary and Human Toxicology* 2000; 42: 137–141.
45. Stickel F, Egerer G, Seitz HK. Hepatotoxicity of botanicals. *Public Health Nutrition* 2000; 3 (2): 113–124.
46. Haouzi D, Cohen I, Vieira HLA, et al. Mitochondrial permeability transition as a novel principle of hepatorenal toxicity in vivo. *Apoptosis* 2002; 7: 395-405.
47. Stewart MJ, Steenkamp V. The biochemistry and toxicity of atractyloside: a review. *Ther Drug Monit* 2000; 22: 6141 – 649.
48. Stuart BP, Cole RJ, Gosser HS. Cocklebur (*Xanthium strumarium*, L. var. *strumarium*) intoxication in swine: review and redefinition of the toxic principle. *Vet Pathol* 1981; 18: 368-383.
49. Dahamna S. Biochemical And Histological Indicators Of *Atractylis Gummifera* L. Toxicity. PhD Thesis, Cezayir, 2018.
50. Santi R. Pharmacological properties and mechanism of action of atractyloside. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1964; 16: 437–438.
51. Vignais P, Vignais PV, Defaye G. Structure-activity relationship of atractyloside and diterpenoid derivatives on oxidative phosphorylation and

- adenine nucleotide translocation in mitochondria. *Atractyloside: chemistry, biochemistry and toxicology*. Padova: Piccin Medical Books 1978: 39-68.
- 52.** Santi R. Potassium atractylate, a new inhibitor of the tricarboxylic acid. *Nature* 1958; 182: 257–258.
- 53.** Vignais PV, Vignais P M, Stanislas E. Action of potassium atractylate on oxidative phosphorylation in mitochondria and submitochondrial particles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1962; 60: 284–300.
- 54.** Allman D. W., Harris R. A. and Green D. Site of action of atractyloside in mitochondria. II. Inhibition of oxidative phosphorylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1967; 122: 766–782.
- 55.** Bernardi P. and Azzone G. F. The regulation of Ca²⁺ efflux in rat liver mitochondria. Role of membrane potential. *European Journal of Biochemistry* 1983; 134: 377–383.
- 56.** Bruni A, Contessa AR, Luciani S. Atractyloside as inhibitor of energy transfer reactions in liver mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1962; 60: 301–311.
- 57.** Quintanilla AP, Levin ML, Lastre CC, Yokoo H, Levin NW. Effects of diuretics on ADP incorporation in kidney mitochondria. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1979; 211: 456–459.
- 58.** Klingenberg, M. The ADP, ATP translocator in mitochondria with particular attention to the effects of the atractylates. *Atractyloside: Chemistry, Biochemistry and Toxicology*. Piccin, Padova, 1978: 69-107.

- 59.** Bruni A, Azzone GF. The sites of action of atractyloside and oligomycin in the mitochondrial energy transfer system. *Biochimica et Biophysica Acta* 1964; 93: 462–474.
- 60.** Pressman BC. The effects of guanidine and alkylguanidines on the energy transfer reactions of mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 1963; 238(1): 401-409.
- 61.** Bruni A, Luciani S, Bortignon C. Competitive reversal by adenine nucleotide of atractyloside effect on mitochondrial energy transfer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1965; 97: 434–441.
- 62.** Davidson AM, Halestrap AP. Liver mitochondrial phosphorylation concentration is increased by Ca^{2+} and regulates the intramitochondrial volume and adenine nucleotide content. *Biochemical Journal* 1987; 246: 715–723.
- 63.** Chavez E, Osorino A. Temperature dependence of the atractyloside-induced mitochondrial Ca^{2+} release. *International Journal of Biochemistry* 1988; 20: 731–736.
- 64.** Anderson BS, Aw TY, Jones DP. Mitochondrial transmembrane potential and pH gradient during anoxia. *American Journal of Physiology* 1987; 252: 349–355.
- 65.** Obatomi DK, Bach PH. Biochemistry and Toxicology of the Diterpenoid Glycoside Atractyloside. *Food and Chemical Toxicology* 1997; 36: 335–346.

66. Hamman HC, Haynes Jr RC, Elevated intramitochondrial adenine nucleotide and intramitochondrial function. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1983; 223: 85–94.
67. Carbonera D, Azzone GF. Permeability of inner mitochondrial membrane and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 1988; 943: 245–255.
68. Le Quoc K, Le Quoc D. Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1988; 265: 249–257.
69. Lynn WS, Mathews D, Cloyd M, et al. Intracellular Ca²⁺ and cytotoxicity. *Archives of Environmental Health* 1989; 44: 323–330.
70. Sokolov PM, Westphal PA, Kester MB, Wierwille R, Sikora-Vanmeter K. Duramycin effects on the structure and function of heart mitochondria. I. Structural alterations and changes in membrane permeability. *Biochimica et Biophysica Acta* 1989; 983: 15–22.
71. Ebel H, Ruf W. Anion sensitive ATPase in human cornea. *Current Eye Research* 1985; 4: 393–397.
72. Obatomi DK, Bach PH. Inhibition of mitochondrial respiration and oxygen uptake in isolated rat renal tubular fragments by atractyloside. *Toxicology Letters* 1996a; 89: 155–161.
73. Knowles AF. Characters of adenine nucleoside fluxes and transport in human tumour mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1984; 764: 202–212.

- 74.** Capasso JM, Hirschberg CB. Effect of atractyloside, palmitoyl-CoA and anion transports inhibitors on translocation of nucleotide sugars and nucleotide sulfate into Golgi apparatus. *Journal of Biological Chemistry* 1984; 259: 4363–4266.
- 75.** Hirschberg CD, Snider MD. Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annual Review of Biochemistry* 1987; 56: 63–87.
- 76.** Obatomi DK, Bach PH. Selective cytotoxicity associated with in vitro exposure of fresh rat renal fragments and continuous cell lines to atractyloside. *Archives of Toxicology* 1996b; 71: 93–98.
- 77.** Luciani S, Carpenedo F, Tarjan EM. Effects of atractyloside and carboxyatractyloside in the whole animal. *Atractyloside: chemistry, biochemistry and toxicology*. Padova: Piccin Medical Books 1978: 109–24.
- 78.** Andreyev AY, Bandereva TO, Dedukhova VI et al. The ATP/ADP antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acid on mitochondria. *European Journal of Biochemistry* 1989; 182: 585–592.
- 79.** Kimura S, Suzuki T, Kobayashi S. Effects of glucagon on the redox states of cytochrome in mitochondria in situ in perfused rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1984; 119: 212–219.
- 80.** Koechel DA, Krejci ME. Extrarenal and direct renal actions of atractyloside contributes to its acute nephrotoxicity in pentobarbital anaesthetized dogs. *Toxicology* 1993; 79: 45–66.
- 81.** Richter H, Spiteller G. Uber ein neues Atractyligenin Glycosid grünen Kaffe-bohnen. *Chemische Berichte* 1978; 111: 3506–3509.

- 82.** Georgiou M, Sianidon L, Hatzis T, Papadatos J, Kouselini SA. Hepatotoxicity due to *Atractylis gummifera* L. *Clinical Toxicology* 1988; 26: 487–493.
- 83.** Bye SN. The development of assays for atractyloside and its localization in rat tissue PhD Thesis: South Africa, University of Natal, 1991.
- 84.** Bhoola KDN. A clino-pathological and biochemical study of the toxicity of *Callilepis laureola* (impila). PhD Thesis, Durban (South Africa): University of Natal, 1983.
- 85.** Hedili A, Warnet JM, Thevenin M et al. Biochemical investigation of *Atractylis gummifera* L. hepatotoxicity in the rat. *Archives of Toxicology* 1989; 63 (13); 312–315.
- 86.** Santi R. and Luciani S. (Editors) (1978) *Atractyloside: Chemistry, Biochemistry and Toxicology*. Piccin, Padova, Italy.
- 87.** Caravaca-Magarinos F, Cubero-Gomez JJ, Arrobasvaca M et al. Renal and hepatic injuries in human intoxication with *Atractylis gummifera*. *Nefrologia* 1985; 5: 205–210.
- 88.** Maier HG, Wewetzer H. Determination of diterpene glycosides in coffee (author's transl). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung*, 1978; 167: 105–107.
- 89.** Ludwig H, Obermann H, Spitteller G. Atractyligenin ein wesentlicher bestandteil gerosteter kaffee bohnen. *Chemische Berichte* 1974; 107: 2409–2424.
- 90.** Obermann H, Spitteller G. Die strukturen der “Kaffe—Atractyloside”. *Chemische Berichte* 1976; 109: 3450–3461.

91. Aranya T, Pimmongkol, Camper ND. Photosynthetic activity of MSMA-resistant and susceptible common cocklebur. *Pesticide biochemistry and physiology* 2003; 76: 46-54.
92. Hutchings A, Terblanche S. E. Observation on the use of some known and suspected toxic Lilliflorae in Zulu and Xhosa medicine. *South African Medical Journal* 1989; 75: 62–69.
93. Kechrid C, Elovakdi M, Benabdullah T, et al. The first thirty months of kidney transplantation in Tunisia. *Nephrologie* 1990; 11: 157–160.
94. Stuart B. P., Cole R. J. and Gosser H. S. (1981) Cocklebur (*Xanthium strumarium*, L. var. *strumarium*) intoxication in swine. Review and redefinition of the toxic principle. *Veterinary Pathology* 18, 368–383.
95. Carpenedo F, Luciani S, Scaravilli F, Palatine P, Santi R. Nephrotoxic effect of atractyloside in rats. *Archives of Toxicology* 1974; 32: 169–180.
96. Guercio V., Ramdazzo V. and Balbo S. M. (1971) Osservazioni su episodi di avvelenamento da *Atractylis gummifera*. *Veterinaria Italiana* 20, 311–318.
97. Hatch R. C., Jain A. V., Weirs R. and Clark J. D. (1982) Toxicologic study of carboxyatractyloside (active principle in Cocklebur-*Xanthium strumarium*) in rats treated with enzyme inducers and inhibitors and glutathione precursor and depletor. *American Journal of Veterinary Research* 43, 111–116.
98. Schteingart CD, Pomilio AB. Atractyloside, toxic compound from *Wedelia glauca*. *Journal of Natural Products* 1984; 47: 1046–1047.

- 99.** Asimakis GK, Sordahl LA. Intramitochondrial adenine nucleotides and energy-linked functions of heart mitochondria. *American Journal of Physiology* 1981; 10: 672–678.
- 100.** Duan J, Karmazyn M. Effect of verapanil on phosphate-induced changes in oxidative phosphorylation and atractyloside-sensitive adenine nucleotide translocase activity in two populations of rat heart mitochondria. *Biochemical Pharmacology* 1989; 38: 3873–3878.
- 101.** Kholedenko BN, Zilinskieve VJ, Borutaite VJ et al. The role of adenine nucleotide translocase in the regulations of oxidative phosphorylation in heart mitochondria. *Biokhimiya* 1988; 53: 1009–1012.
- 102.** Shug A. L., Koke J. R., Bittar N. and Folts J. D. (1977) Atractyloside-induced myocardial cell injury. *Journal of Molecular Cell Cardiology* 9, 498–503.
- 103.** Gilmour R. F., Williams E. S., Farmer B. B. and Zipes D. P. (1981) Effects of carnitine and atractyloside on canine cardiac electrical activity. *American Journal of Physiology* 241, H505–H512.
- 104.** Obatomi D. K., Brant S., Anthonypillai V. and Bach P. H. (1997) Toxicity of atractyloside in precision-cut rat and porcine renal and hepatic tissue slices. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 148, 35–45.
- 105.** Berndt W. O. (1982) Renal tubular function. In *Nephrotoxicity, Assessment and Pathogenesis*. Edited by P. H. Bach, F. W. Bonner, J. W. Bridges and E. A. Lock, pp. 54–64. John Wiley & Sons, Chichester.
- 106.** Bueno-de-Mesquita H. B., Maisonneuve P., Moerman C. J., Runia S. and Boyle P. (1992) Lifetime consumption of alcoholic beverages, tea and

coffee and exocrine carcinoma of the pancreas: a population-based case-control study in The Netherlands. *International Journal of Cancer* 50, 514–522.

- 107.** Gullo L., Pezzilli R. and Morselli-Labate A. M. (1995) Coffee and cancer of the pancreas: an Italian multicenter study. The Italian Pancreatic Cancer Study Group. *Pancreas* 11, 223–229.
- 108.** Martin M. L., Moran A. and San-Roman L. (1985) Pharmacology and toxicology of *Atractylis gummifera* L. *Anales Real Academia de Farmacia* 51, 751–756.
- 109.** Witte S. T., Osweiler G. D., Staahr H. M. and Mobley G. (1990) Cocklebur toxicosis in cattle associated with the consumption of mature *Xanthium strumarium* *Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation* 2, 263– 267.
- 110.** Laurens, J.B., Bekker, L.C., Steenkamp, V., Stewart, M.J. (2001) Gas chromatographic–mass spectrometric confirmation of atractyloside in a patient poisoned with *Callilepis laureola*. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 765, 127–133.
- 111.** Gaillard Y, Pepin G. Poisoning by plant material : review of human cases and analytical determination of main toxics by high-performance liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry. *J. Of. Chromatography B* 1999; 733: 181-229.
- 112.** Carlier, Jeremy, et al. A validated method for quantifying atractyloside and carboxyatractyloside in blood by HPLC-HRMS/MS, a non-fatal case of intoxication with *Atractylis gummifera* L. *Journal of analytical toxicology*, 2014, 38.9: 619-627.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Yasin ÖZTÜRK

Doğum Yeri ve Yılı: Konya, 1989

Medeni Hali: Evli

E-posta: yasinozturk@bingol.edu.tr

Eğitim Bilgileri

Üniversite/Fakülte/Okul	Öğrenim Alanı	Derece	Yıl
Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı	Doktora	2015-2020
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi	Veteriner Hekimliği	Lisans	2006-2012

Akademik Bilgileri

Kurum/Kuruluş	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Yıl
Bingöl Üniversitesi	Bingöl	Veteriner Fakültesi	Arş. Gör.	2014-Devam ediyor