

Alfa Amanitinin Su ve Metanoldeki Termostabilitesi

Ertuğrul Kaya¹, Mustafa Hancı¹, Selim Karahan², Sait Bayram¹, Kürşat Oğuz Yaykaşlı³, Mustafa Gani Sürmen¹

¹Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Düzce

²Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır

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

Eur J Basic Med Sci 2012;2(4):106-111

Received: 11-02-2013

Accepted: 18-02-2013

21. Ulusal Farmakoloji Kongresi'nde (Eskişehir, 19-22/10/2011) poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Correspondence (Yazışma Adresi):

Dr. Ertuğrul KAYA

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

Tel: 0 380 5421100 (4171) Fax: 0 380 5421302

E-posta: drekaya@yahoo.com

Thermostability of Alpha Amanitin in Water and Methanol

ABSTRACT

Alpha amanitin mostly found toxin in *Amanita phalloides* mushroom is responsible for toxicity. In this study, the chemical stability of the alpha amanitin in water and methanol at different temperatures was investigated. Alpha amanitin was purified by the method mentioned earlier from *Amanita phalloides* extract, and compared to the standard. Obtained toxin was dissolved in distilled water and methanol, and separated into 42 vials. Vials divided into 7 groups randomly. The stability of the toxin was measured at room temperature (25 °C), in the freezer (-20 °C), refrigerated (4 °C) and boiling (only water) (98 °C) using analytical HPLC system. In this method, 4.6 x50mm reverse phase C18 column, UV detector at a wavelength of 303nm, 1 mL/min flow rate of mobile phase (acetonitrile ammonium acetate + methanol + 80 +10 +10) were used. The initial amount of toxin was taken as 100%, and toxin ratio was calculated according to the time, reduction in the amount of toxin. The remaining toxin level was only 5% after 6 hours in boiled water. The remaining toxin level was 86%, and 96% after 6 mounts in water, and methanol respectively at room temperature. The remaining toxin level was 91%, and 97% after 6 mounts in water, and methanol respectively at 4 °C. The remaining toxin level was 76%, and 97% after 6 mounts in water, and methanol respectively at -20 °C. Almost all of the toxin with boiling 6 hours changed to another chemical structure, but this does not imply toxicity completely disappeared. The most stability in the water was measured at 4 °C. However, the most stability in the methanol was measured at all temperatures. The chemical degradation does not mean loss of toxicity. To clarify it needs further investigation.

Key words: *Amanita phalloides*, alpha amanitin, thermostability, HPLC

ÖZET

Amanita phalloides mantarında en fazla bulunan ve toksisiteden esas sorumlu olan toksin alfa amanitindir. Bu çalışmada, su ve metanol içindeki alfa amanitinin farklı sıcaklıklardaki kimyasal stabilitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Daha önce belirtilen yöntemle alfa amanitin *Amanita phalloides* ekstresinden saflaştırıldı ve standartla karşılaştırıldı. Elde edilen toksin saf suda ve metanolde çözülerek 42 ayrı viyale alındı. Viyaller rastgele olarak 7 gruba ayrıldı. Oda sıcaklığında (25 °C), dondurucuda (-20 °C), buzdolabında (4 °C) ve kaynatılarak (sadece suda) (98 °C) toksinin stabilitesi ölçüldü. Ölçümler analitik HPLC sisteminde yapıldı. Bu yöntemde 4,6x50mm ters faz C18 kolon, 303nm dalga boyunda UV dedektör, 1 mL/dakika akış hızında mobil faz (amonyum asetat+metanol+asetonitril 80+10+10) kullanıldı. Başlangıçtaki tok-

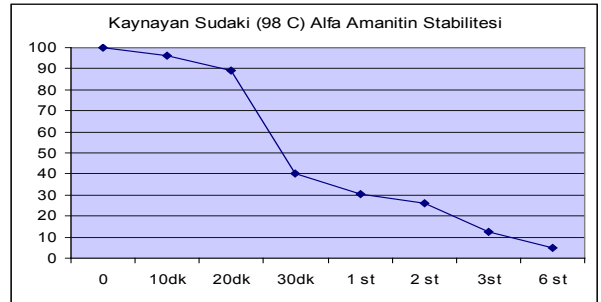
sin miktarı %100 olarak alınıp zamana göre toksin miktarındaki azalma oranı hesaplandı. Su kaynatıldığında toplam 6 saat içinde toksin düzeyi başlangıçtaki sadece %5'i kadar kaldı. Oda ısısında bekletilen solüsyonlardaki toksin düzeyi 6 ay sonunda su içinde başlangıçtaki %86'sına, metanol içinde %96'sına indi. Buzdolabında bekletilen su içindeki toksin düzeyleri başlangıçtaki %91'ine, metanolde ise %97'sine indi. Dondurucuda saklanan solüsyonlardaki toksin yüzdesi su içinde başlangıçtaki %76'sına, metanol içinde ise %97'sine indi. Kaynatma ile toksinin tamamına yakını 6. saatte başka bir kimyasal yapıya dönmüştür, ancak bu durum toksisitenin tamamen kaybolduğu anlamını taşımamaktadır. 6 aylık izlemede en iyi stabilite su içinde buzdolabında saklama ile alınmıştır. Metanol içinde ise tüm yöntemlerde birbirine yakın ve yüksek olarak bulunmuştur. Tüm ısılarda, kimyasal yapıdaki bozulma toksisitenin kaybolduğu anlamına gelmez, bu başka bir araştırma konusudur.

Anahtar kelimeler: *Amanita phalloides*, alfa amanitin, termostabilite, HPLC

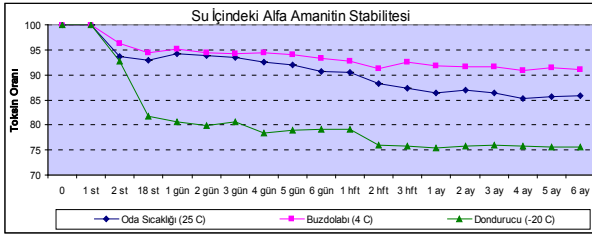
GİRİŞ

Amanita phalloides isimli şapkalı mantar türü, ölümlü sonuçlanan mantar zehirlenmelerinin en az %95'inden sorumlu tutulmaktadır (1). Zehirli başka mantarlar olmasına rağmen, özellikle yaygın olarak yetişmesi ve toksinlerinin gravimetrik etki gücünün yüksek olması nedeniyle bu türe ait ölümcül mantar zehirlenmesi vakaları diğer türlere nazaran sık görülmektedir (2). Mantar içinde amatoksinler ve fallotoksinler ismi verilen 2 grup toksin tanımlanmıştır. Fallotoksinler 7 aminoasidin dairesel olarak bağlanmasıyla oluşan bir yapıya sahiptirler (3). Amatoksinler ise 8 aminoasidin dairesel olarak bağlanması sonucu oluşan peptid yapısına sahiptirler (4). Amatoksinler içinde ilk olarak tanımlananı alfa amanitindir ve bu mantarın toksisitesinden asıl sorumlu tutulan toksin olarak tanımlanmıştır (5). Bu nedenle de *Amanita phalloides* toksinlerinden en fazla araştırılanı olmuştur. Daha sonraları beta amanitin, gama amanitin, epsilon amanitin, amanullin, amanullik asit, amaninamid gibi bazı diğer toksinler de tanımlanmıştır (6). Alfa amanitinin toksik etki mekanizması detaylı olarak aydınlatılmıştır. Hücrelerde protein sentezinin ilk basamağı transkripsiyondur ve bu basamağı RNA polimeraz enzimi gerçekleştirir. Bu enzimin 3 türü tanımlanmıştır. Ökaryotik hücrelerde RNA polimeraz 2 enzimi bu görevi gerçekleştirir. Alfa amanitin bu enzimin spesifik inhibitörüdür (7,8). Ancak bakterilerde bu enzimin yerine görev yapan RNA polimeraz 1'i inhibe etmediğinden alfa amanitin antibakteriyel etkinlik göstermez (9), sadece ökaryot hücrelerde protein sentezini durdurur (10). Protein sentezi hücrelerde birçok hayati fonksiyonun temelini oluşturduğundan, alfa

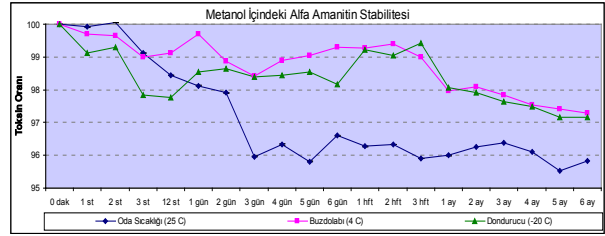
amanitin toksisitesi sonucu hücreler bir süre sonra ölür (11). Hücre içinde daha önceden sentezlenmiş bir miktar protein olduğundan, hücre hemen ölmez, buna bağlı olarak zehirlenme durumunda ölüm hemen gerçekleşmez (12-14). Alfa amanitin toksik etkisini birçok ökaryot hücresinde göstermesine rağmen (15,16) zehirlenme durumunda toksinin birçoğu karaciğere geçtiğinden (17,18) diğer hücrelerde pek toksik etkiye rastlanmaz, asıl toksite hepatositlerde görülür (19). Zehirlenme vakalarında sekel kalmaz, karaciğer hücrelerinin tamamı ölmezse rejenerasyon sonucu tam iyileşme olur. Eğer karaciğerde yaygın hasar gelişirse hepatik yetmezlik sonucu ölüm görülür. Zehirlenen hastada hepatik yetmezlik gelişmişse acil olarak karaciğer transplantasyonu gereklidir, ancak bu tedavi gerçekleştirilemezse hasta genelde kaybedilir (20). Kültür mantarlarının üretimini artması, medyada zehirlenme vakalarının duyulması gibi bazı nedenlerle günümüzde mantar zehirlenmesi vakaları azalmaktadır. Tedavi imkanlarının artması nedeniyle de ölüm vakaları oldukça azalmıştır (21). Günümüzde protein sentezinin durdurulması gereken birçok araştırmada alfa amanitin kullanılmaktadır (22,23). Bazı hücre kültürü çalışmalarında da kullanıldığı görülmektedir. Bu amaçlarla ticari olarak >%90 saflıkta 1 mg viallerde pazarlanmaktadır. Alfa amanitin ve beta amanitin için yüksek saflıkta (>%99) elde etme yöntemi tarafımızdan tanımlanmıştır (24,25). *Amanita phalloides* toksinlerinin mantarın pişirilmesiyle toksisitesini kaybetmediği bilinmektedir. Zehirlenme vakalarının neredeyse tamamı pişirilmiş mantarların yenmesiyle olmaktadır (26). Ayrıca dondurulmuş ve salamura yapılmış mantarların daha sonra yenmesiyle de zehirlenme vakaları bildirilmiştir (27). Bu vakalar düşünüldüğünde, mantar toksinlerinin düşük ve yüksek sıcaklıklarda toksisitesini kaybetmediği



Şekil 1. Kaynayan su (98 ± 1 °C) içinde alfa amanitin stabilitesi.



Şekil 2. Su içindeki alfa amanitin oda ısısında ($+25 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ mavi), buzdolabında ($+4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ pembe) ve dondurucudaki ($-20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ yeşil) stabilite grafiği.



Şekil 3. Metanol içindeki alfa amanitin oda ısısında ($+25 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ mavi), buzdolabında ($+4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ pembe) ve dondurucudaki ($-20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ yeşil) stabilite grafiği.

anlaşılmaktadır. Ancak farklı ısı ortamlarında toksinlerin yapısının değişip değişmediği bilinmemektedir. Ayrıca özellikle moleküler çalışmalarda toksin miktarının değişim oranı çok önemlidir. Literatür taraması yapıldığında, alfa amanitin için detaylı bir termostabilite çalışması yapılmadığı görülmektedir. Bu çalışmada su ve metanol içinde çözülmüş alfa amanitin farklı sıcaklıklardaki stabilitesi altı ay süreyle test edilmiştir.

GEREKÇİ ve YÖNTEM

Alfa amanitin, Amanita phalloides mantarından daha önceden tanımladığımız metodla saflaştırılarak $>99\%$ saflıkta kullanılmıştır (24,25). Bu yöntemde özetle mantarlar toplanmış, mikroskopik ve makroskopik özelliklerine göre sınıflandırması yapılmış, 50% metanolde ekstrakte edilmiş ve evaporasyonla kuru ekstrakt elde edilmiştir. Elde edilen ekstrakt preparatif HPLC yönteminde 2 defa saflaştırılarak alfa amanitin standardı ile karşılaştırma sonrasında yüksek saflıkta alfa amanitin elde edilmiştir. Elde edilen alfa amanitin miktar analizi analitik HPLC sisteminde yapılmıştır. Alfa amanitin standardı Sigma-Aldrich (ABD) firmasından elde edilmiştir. Tüm solüsyonlar analitik grade kullanılmıştır. Alfa amanitin, stok solüsyonları hazırlamak için 100 mL bidistile su ve 100 mL saf metanol içinde 10ug/ml konsantrasyonda çözülmüştür. Tüm çözelti kaplarının kapağı kapalı tutulmuştur. Dondurucu ($-20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), soğutucu ($4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), oda ısısı ($25 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) olmak üzere hem su hem de metanol için gruplar yapılmış, her grupta n sayısı 6 olarak belirlenmiştir. Ayrıca su için kaynama ($98 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) grubu yapılmış, toplamda deneyde 7 grup oluşturulmuştur. Toplam 6 aylık stabilite çalışması yapılmıştır. Kaynama grubunda 6 saat analiz yapılmıştır. Metanol kaynatıldığı durumda çok hızlı buharlaştığından geri yoğunlaştırma işlemi yetersiz kalmıştır ve bu nedenle metanol içinde

kaynatılarak stabilite testi yapılamamıştır. Degazer, 0,05 mL/dakika hassasiyetli pompa, bilgi işlem ünitesi, C18 ODS 5 μm partikül 250x4,6 mm analitik kolon ve UV dedektör kullanılarak analitik HPLC sisteminde ölçümler gerçekleştirilmiştir. Mobil faz akış hızı 1 mL/dakika izokratik olarak kullanılmıştır. Mobil faz olarak amonyum asetat (50 mM, pH 5,5 asetik asit), asetonitril, metanol (80:10:10, v/v/v) kullanılmıştır (28). Öncelikle alfa amanitin standardı 100ug/mL bu sisteme uygulanmış ve tutulma zamanı kaydedilmiştir. Analitik HPLC sisteminde alfa amanitin standardı için 6 noktalı (her biri 3 defa tekrarlı) kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Kalibrasyon eğrisinin denklemine, analizlerde elde edilen pik alanları uygulanarak madde miktarı ölçümü yapılmıştır. Her grupta bulunan altı numunen ölçümü sonucu elde edilen pik alanlarının ortalaması hesaplanmış, ilk elde edilen sonuç 100% olarak belirlenmiş, daha sonraki ortalamaların ilk ortalamaya oranlarına göre sonuçlar $\%$ oranı olarak verilmiştir. Ayrıca istatistik metod kullanmaya gerek duyulmamıştır.

BULGULAR

Su içinde çözümlenerek kaynatılan gruptaki toksin düzeylerini gösteren grafik Şekil 1'de verilmiştir. Bu grupta özellikle 30 dakikadan sonra hızlı bir düşüş yaşanmış ve 6 saat sonunda kalan madde miktarı 5% olmuştur. Su içinde diğer sıcaklıklarda toksin stabilitesi grafikleri Şekil 2'de verilmiştir. Oda sıcaklığında özellikle 2. saatte keskin düşüş görülmekte olup, 6 ay sonunda madde miktarı başlangıçtaki 86% 'sı olarak kalmıştır. Buzdolabında su içinde bekletilen alfa amanitin miktarı altı ay sonunda başlangıçtaki 91% 'i olarak kalmıştır. Dondurucuda su içinde saklanan alfa amanitin miktarları özellikle 2. saatten sonra keskin düşmeye başlamakla birlikte, altı ay sonunda 76% oranında toksin kaldığı görülmek-

tedir. Metanol içinde çözülerek takip edilen alfa amanitin oranları Şekil 3'te verilmiştir. Buzdolabında ve dondurucuda metanoldeki toksin oranları 6 ay sonunda başlangıçtaki %97'si, oda sıcaklığında ise %96'sı oranında kalmıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, *Amanita phalloides* mantarının toksini olan alfa amanitinin, farklı sıcaklıklarda su ve metanol içindeki kimyasal stabilitesi altı ay boyunca belli aralıklarla izlenerek ölçülmüştür. Çalışmamızda kaynatılan su içinde bulunan alfa amanitin miktarı 6 saat içinde başlangıçtaki %5'ine inmiştir. HPLC kromatogramında alfa amanitin piki azalırken yeni bir pik belirmiştir ve zamanla yeni pik yükselmiştir ve alanı artmıştır. Bu durum alfa amanitinin yeni bir yapıya dönüştüğünü göstermektedir. Su içinde kaynatılarak yapılan çalışmalarda bu durumda dikkat edilmelidir. Özellikle moleküler çalışmalarda bu durum çok önemlidir. Çünkü alfa amanitinin ısıda bozulmadığı kabul edildiğinden araştırmacılar çalışmalarında ısı kullanmaktan çekinmemektedirler. Araştırmamız molekül yapısında değişiklik olduğunu doğrulasa da, toksisite hakkında bir fikir vermemektedir. İnsanlarda görülen *Amanita phalloides* mantar zehirlenmelerinin neredeyse tamamında mantar pişirilerek yenmektedir (29). Elimizde tam veri olmamakla birlikte, neredeyse yenilen tüm mantarların 30-60 dakika arasında pişirildiği bilinmektedir. Mantarlar yaş olarak toplanıp pişirildiğinden, aslında su içinde pişirilmiş olmaktadır. Çalışmamızda 30-60 dakika arasında alfa amanitin miktarı %30-40 arasındadır. Mantar içeriğindeki toksin miktarı ve bu toksinin gravimetrik etki potansiyeli düşünüldüğünde, kaynatma sonrası kalan %30-40 toksin miktarının da zehirlenmeye neden olabileceği düşünülebilir. Aslında belki de uzun süre (en az 3 saat) su içinde haşlanma durumunda mantardaki alfa amanitin düzeyinin %10'un altına inmesi mümkün görünmektedir. Ancak yeni oluşan molekülün toksisitesi hakkında çalışma yapılması gerekmektedir. Su içinde moleküllerin kaynatılması durumunda hidrosillenme reaksiyonunun gerçekleştiği bilinmektedir. Alfa amanitin molekül yapısında hidrosillenmeye müsait atomlar bulunmaktadır. Su içinde kaynatma durumunda alfa amanitin molekülünün hidrosillendiği ve başka bir molekül yapısına dönüştüğü varsayımı araştırmamızın çıkarımı olarak önemlidir. Mantarın pişirilmesi sırasında suyunu kaybetmesi ve

yağ ısısı ile 100 C den daha yüksek sıcaklıklara çıkılması mümkündür. Bu durumda toksin stabilitesi hakkında bilgi bulunmamaktadır. Bazı hayvanların mantarı doğada yiyerek zehirlenmesi (30), insanların ise pişirerek yeme sonrası zehirlenmesi, pişirme sırasında uygulanan ısı nedeniyle oluşan molekül değişikliklerinin toksisiteyi engellemediğini çağrıştırmaktadır.

Alfa amanitinin su içinde buzdolabındaki stabilitesi 6 ay sonunda oldukça iyi görünmektedir. 1 haftaya kadar %95 dolaylarında devam edip, 6 ay sonunda %90 üzerinde kalmaktadır. Toksinin eksilen kısmı için belirgin bir pik belirmemiştir, bu durum toksinin eksilen kısmının bozulduğunu çağrıştırmaktadır. Bu durum, eğer alfa amanitin su içinde saklanması gerekiyorsa buzdolabında saklanması uygun olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda, mantarı topladıktan sonra buzdolabında saklamakla toksisitenin çok az eksildiği anlamını taşımaktadır. Buzdolabında saklanan *Amanita phalloides* mantarlarının yenmesiyle de ciddi zehirlenmeler olabileceği bilinmelidir. Oda ısısında su içinde alfa amanitin stabilitesi 1 güne kadar %95, 1 haftaya kadar %90, 6 ay sonunda %85 dolaylarında görünmektedir. Araştırmalar sırasında alfa amanitin çözeltisi oda ısısında kalmaktadır. Bu durumda özellikle 1 güne kadar oda ısısında saklamanın uygun olabileceği anlaşılmaktadır. Ayrıca mantarın toplandıktan sonra oda ısısında bekletildiğinde de toksisitesini kaybetmediği anlaşılmaktadır. Dondurucuda birçok molekül yapısında değişiklik olmaksızın saklanabilmektedir. Alfa amanitin su içinde dondurularak saklanması durumunda 1. günde %80, 1 hafta sonunda ise %75 düzeyine inmekte ve kromatogramda başka bir pik belirmektedir. Bu durum, dondurulduğunda alfa amanitinin molekül yapısında değişiklik olduğunu göstermektedir. Ancak yeni oluşan molekülün toksisitesi hakkında bilgi bulunmamaktadır. Daha önce bildirilmiş olan bir zehirlenme vakasında, dondurularak 6 ay kadar bekletilmiş olan *Amanita phalloides* mantarı yiyen bir yaşlı hasta ölmüştür (31). Bu duruma kalan toksin miktarının neden olabileceği düşünülebilir. Ancak yeni molekülün de toksisiteye katkısının olabileceği düşünülebilir. Dondurup çözme işleminin de molekülün bozulmasına neden olduğu öngörülebilir. Özellikle araştırmalarda kullanımı sırasında eğer alfa amanitin su içinde çözünerek bekletilmesi gerekiyorsa, 3 güne kadar hem oda ısısında, hem de buzdolabında saklanması uygun olduğu anlaşılmaktadır. Daha uzun süre bekletmek gerektiğinde buzdolabında 6 aya kadar saklanma durumunda stabilitenin oldukça iyi olduğu

anlaşılmaktadır. Dondurucuda ise saklanması uygun olmadığı anlaşılmaktadır. Metanol oldukça iyi bir organik çözücüdür ve birçok molekülü çözdüğünden araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Alfa amanitin metanolde çözünmektedir ve birçok araştırmada metanol içinde çözünerek kullanılmaktadır. Metanol içinde alfa amanitinin 2 gün sonunda tüm ısılarda %98 dolaylarında stabilite gösterdiği görülmektedir. 6 ay sonunda tüm ısılarda %96 üzerinde stabilite göstermesi, alfa amanitin için metanolün çok iyi bir bekletme çözücüsü olduğunu göstermektedir. Araştırmalarda mümkünse alfa amanitin metanol içinde çözülerek bekletilmelidir.

Acknowledgment:

Bu çalışma için herhangi bir kurumdan mali bir destek alınmamıştır.

KAYNAKLAR

- Vetter J. *Toxins of Amanita phalloides*. *Toxicon*. 1998;36:13-24.
- McPartland JM, Vilgalys RJ, Cubeta MA. *Mushroom poisoning*. *Am Fam Physician*. 1997; 55(5):1797-800, 1805-9, 1811-2.
- Kaya E, Karahan S, Hancı M, Yaykaşlı KO, Sarıtaş A, Bayram R, Yılmaz İ, Arslan SO. *Düzce yöresinde yetişen Amanita Phalloides mantarındaki Alfa Amanitin düzeyinin HPLC Yöntemiyle Ölçümü*. *Düzce Tıp Dergisi* 2012; 14(2):15-7.
- Faulstich H, Bloching M, Zobeley S, Wieland T. *Conformation and toxicity of amanitins*. *Experientia*. 1973; 15;29(10):1230-2.
- Wieland T. *Structure and mode of action the Amatoxins*. *Naturwissenschaften* 1972; 59(6):225-31.
- Wieland T, Faulstich H. *Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active components of poisonous Amanita mushrooms*, *CRC Crit Rev Biochem* 1978; 5(3): 185-260.
- Wieland T, Götzendörfer C, Zanotti G, Vaisius AC. *The effect of the chemical nature of the side chains of amatoxins in the inhibition of eukaryotic RNA polymerase B*. *Eur J Biochem*, 1981; 117(1): 161-4.
- Buku A, Campadelli-Fiume G, Fiume L, Wieland T. *Inhibitory effect of naturally occurring and chemically modified amatoxins on RNA polymerase of rat liver nuclei*, *FEBS Lett* 1971; 12,14(1); 42-44.
- Bensaude O. *Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity?* *Transcription* 2011; 2(3):103-8.
- Bushnell DA, Cramer P, Kornberg RD. *Structural basis of transcription: alpha-amanitin-RNA polymerase II cocystal at 2.8 Å resolution*. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 5,99(3): 1218-22.
- Kröncke KD, Fricker G, Meier PJ, Gerok W, Wieland T, Kurz G. *Journal Article alpha-Amanitin uptake into hepatocytes. Identification of hepatic membrane transport systems used by amatoxins*. *Journal of Biological Chemistry* 1986; 261(27):12562-7.
- Yamaura Y. *Mushroom poisoning in Japan--recent trends and future considerations*. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 2010;51(6):319-24.
- Ward J, Kapadia K, Brush E, Salhanick SD. *Amatoxin poisoning: case reports and review of current therapies*. *J Emerg Med* 2013;44(1):116-21.
- Lima AD, Costa Fortes R, Carvalho Garbi Novaes MR, Percário S. *Poisonous mushrooms: a review of the most common intoxications*. *Nutr Hosp*. 2012;27(2):402-8.
- Gong XQ, Nedialkov YA, Burton ZF. *Alpha-amanitin blocks translocation by human RNA polymerase II*. *J Biol Chem*. 2004; 279(26):27422-7.
- Christians FC, Hanawalt PC. *Inhibition of transcription and strand-specific DNA repair by alpha-amanitin in Chinese hamster ovary cells*. *Mutat Res*. 1992;274(2):93-101.
- Faulstich H, Talas A, Wellhöner HH. *Toxicokinetics of labeled amatoxins in the dog*. *Arch Toxicol* 1985; 56:190-4.
- Thiel C, Thiel K, Klingert W, Diewold A, Scheuermann K, Hawerkamp E, Lauber J, Scheppach J, Morgalla MH, Königsrainer A, Schenk M. *The enterohepatic circulation of amanitin: kinetics and therapeutical implications*. *Toxicol Lett* 2011; 10,203(2):142-6.
- Cao M, Yan L, Nie YY, Yang ZR, Zhao. *Toxicity of alpha-amanitin on mice in vivo*. *J. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2009;40(5):901-4.
- Rosenthal P. *Auxiliary liver transplantation for Amanita phalloides poisoning*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54(3):438.
- Karlson-Stiber C, Persson H. *Cytotoxic fungi--an overview*. *Toxicon*. 2003; 15,42(4):339-49.
- Tata JR, Hamilton MJO, Shields D. *Effects of -amanitin a in vivo on RNA polymerase and nuclear RNA synthesis*. *Nat New Biol* 1972; 238:161-4.
- Magdalan J, Ostrowska A, Piotrowska A, Izykowska I, Nowak M, Gomułkiewicz A, Podhorska-Okotów M, Szlag A, Dziegiel P. *Alpha-Amanitin induced apoptosis in primary cultured dog hepatocytes*. *Folia Histochem Cytobiol* 2010; 1,48(1):58-62.
- Kaya E, Karahan S, Yaykaşlı KO, Bayram R, Sarıtaş A. *Purification of High Purity Alpha Amanitin Using Preparative HPLC Method*. *Konuralp Med J* 2012;4(3):35-41.
- Kaya E, Yaykaşlı KO, Karahan S, Bayram R, Sarıtaş A, Yaykaşlı E: *Yüksek Safılıkta Beta Amanitin Üretimi*. *Düzce Tıp Dergisi*, 2012; 14 (3) (Baskı aşamasında).
- Bonnet MS, Basson PW. *The toxicology of Amanita phalloides*. *Homeopathy* 2002;91(4):249-54.

27. Işıloğlu M, Gücin F, Mat A. Kasım 1994'de İstanbul'da meydana gelen mantar zehirlenmeleri. *Ekoloji Çevre Dergisi* 1995;14:22-8.
28. Defendenti C, Bonacina E, Mauroni M, Gelosa L. Validation of a high performance liquid chromatographic method for alpha amanitin determination in urine. *Forensic Sci Int* 1998;92(1):59-68.
29. Broussard CN, Aggarwal A, Lacey SR, Post AB, Gramlich T, Henderson JM, Younossi ZM. Mushroom poisoning--from diarrhea to liver transplantation. *Am J Gastroenterol* 2001;96(11):3195-8.
30. Mengs U, Trost W. Acute phalloidin poisoning in dogs. *Arch Toxicol* 1981;48(1):61-7.
31. Himmelmann A, Mang G, Schnorf-Huber S. Lethal ingestion of stored *Amanita phalloides* mushrooms. *Swiss Med Wkly* 2001; 20;131(41-42):616-7.