

Zehirli ve Ölümcül Bir Mantar Türü Olan *Amanita Phalloides* Fr.(Link) Üzerinde Kimyasal ve Biyolojik Araştırmalar

H.BÜLENT ÇETİN^{a)}, TURHAN BAYTOP^{b)}

^{a)} Adalet Bakanlığı, Adli Tıp Kurumu Başkanlığı, İstanbul, Türkiye

^{b)} İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İstanbul, Türkiye

CHEMICAL AND BIOLOGICAL INVESTIGATIONS OF *AMANITA PHALLOIDES*

Summary

In this study two methods of analysis, namely chemical and biological, were reported to determine the mushroom samples in forensic cases of mushroom poisoning.

Amatoxins, which are responsible of phalloides syndrome, were detected as violet-pink spots on thin layer chromatography. The toxicity and letality of mushroom samples were observed on Swiss-albino mice.

TLC is a simple, rapid and reproducible method. The data of the biological method and TLC results, evaluated together, are used to confirm the autopsy findings.

Hence, application of this developed method will facilitate the identification of mushroom species in forensic cases.

Key words: *Mushroom poisoning - Amanita phalloides*

Özet

Bu çalışmada mantar zehirlenmeleri ile ilgili olan adli olaylarda, mantar örneği gönderildiği takdirde, bunun *Amanita phalloides* türü zehirli ve ölümcül bir mantar olup olmadığının saptanması için kimyasal ve biyolojik iki yöntem bildirilmiştir.

Kimyasal yöntem olarak İnce Tabaka Kromatografisi kullanılmış ve amatoksinler spesifik pembe-mor lekeler halinde saptanmıştır. Biyolojik yöntemde ise Swiss-albino türü farelere verilen mantar örneğinin toksik ve öldürücü etkisi gözlenmiştir.

Kolay uygulanabilen, fazla zaman almadan tekrarlanabilir sonuçlar veren, İTK yöntemine paralel olarak biyolojik yöntem bulgularının da değerlendirilmesi sonucunda, mantar örneğinin *Amanita phalloides* türü olup olmadığını tesbit etmek olanağı doğmuştur.

Bu konu ile ilgili olan adli olaylarda, bu bilgilerin ışığında otopsi bulgularını pekiştirmek artık mümkün olabilecektir

GİRİŞ ve AMAÇ

Bilerek veya bilmeyerek zehirlenme ve zehirlenme kasti ile bunlara bağlı adli olayların aydınlığa kavuşturulmasında, otopsi bulguları ile kimyasal bulguların birbirlerini teyit etmeleri ile en sağlıklı raporlar oluşabilmektedir.

Ölüme neden olan başlıca mantarlar *Amanita phalloides*, *A. verna*, *A. virosa* gibi türlerin içerdiği siklopeptidler, karaciğer ve böbreklerde nekroz yaparak, yendikten 4-5 gün sonra ölüm meydana gelmektedir. Bu süre zarfında zehirli bileşikler vücuttan tümüyle elimine olduğundan, bunların kimyasal yollarla teşhisi post-mortem örneklerde mümkün olamamaktadır.

Bu çalışmanın amacı mantar zehirlenmesi sonucu ölüm şüphesi olan vakalarda yenilen mantarın öldürücü olup olmadığının veya olay yerinde delil sayılabilecek bir

mantar örneğinin bulunması halinde, ölüm olayının bu mantardan ileri gelip gelmediğinin kimyasal ve biyolojik yöntemlerle saptanmasıdır.

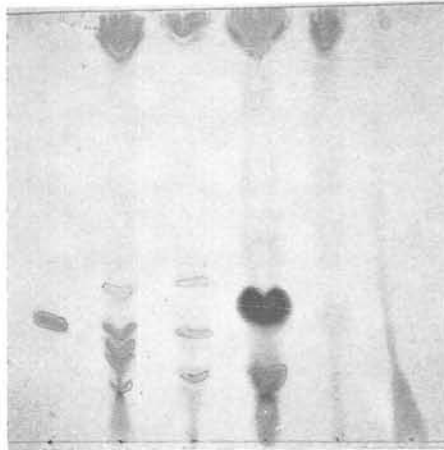
MATERYAL ve METOD (1-3)

Örnek (şüpheli) *Amanita phalloides*'in şahit *Amanita phalloides* ile *A.Citrina*, *Lepiota procera* ve *Agaricus bisporus* karşısında kimyasal ve biyolojik metodlar kullanılarak tanısı hedef alındı.

Kimyasal metotta örnek mantarla amanitin çözeltisi ile şahit mantarların ekstreleri ince tabaka kromatografisine uygulandı. Biyolojik metotta ise mantar örneklerinin Swiss-Albino türü farelerdeki etkileri gözlemlendi.

BULGULAR

Kimyasal çalışmalar sonucunda ince tabaka plakları üzerinde oluşan lekeler incelendiğinde amanitin çözeltisi ile şahit *A.phalloides* ve örnek *A.phalloides* ekstrelerinin uygulandığı yerlerde amatoksinlere ait spesifik pembe-mor lekeler, *A.Citrina* ekstresinin uygulandığı yerde ise bufotenin'e ait spesifik koyu kahverenkli leke görüldü. *Lepiota procera* ve *Agaricus bisporus* ekstrelerinin tatbik edildiği yerlerde ise herhangi bir leke oluşmadı (Resim 1).



Resim 1. 1. α -amanitin çözeltisi, 2. *A. phalloides* şahit ekstresi, 3. *A. phalloides* örnek ekstresi, 4. *A. citrina* şahit ekstresi, 5. *A. lepiota* şahit ekstresi, 6. *Agaricus bisporus* şahit ekstresi. α -amanitin standart maddesi ile mantar ekstrelerinin metanoldeki çözeltileri DC Alufolien Kieselgel 60 F254 No: 5554 plakları üzerine tatbik edildi. Mobil faz olarak kloroform-metanol-asetik asit-su (75:33:5:7,5) karışımı alınarak yürütüldü. Kuru plaklar üzerine sinnamaldehitin metanoldeki taze hazırlanmış % 1'lik çözeltisi püskürtüldü. Plaklar tekrar kurutulduktan sonra 10-20 dakika süre ile HCl buharlarına tutuldu.

Şahit ve örnek *A.phalloides* ekstrelerinin farklı Rf değerlerinde birbirine benzer pembe, mor lekeler vermesi içerdikleri farklı yapılarıdaki (α , β , γ) amatoksin Zehirli ve

türevlerinden ileri gelmektedir. Farklı yapı gösteren amatoksinlerin en az 9 tane olduğu bilinmektedir. *A. phalloides* türü mantarların içerdiği farklı yapıdaki 9 amatoksinin herbir mantarda görülmesi mümkün olmayabilir. Çünkü mevsim, bölge ve toprak gibi değişik yetiştirme faktörlerinin etkisi ile bu toksinlerin daha az sayılarda görülmesi mümkündür (4).

Dolayısıyla kimyasal yapı yönünden 9 farklı amatoksin türevinden bir kaçının spesifik pembe-mor lekelerin İTK plağı üzerinde görmek, örneğin *A. Phalloides* türü bir mantar olduğunu söylemek için yeterlidir.

Ayrıca Belgrat Ormanında *A. phalloides* örneğinin toplanması esnasında yazarların biri (H.B.Ç.) tarafından rastlanan ve niteliği tam olarak belirlenemeyen *Amanita* türü bir mantar üzerinde de benzer çalışmalar yapıldı (5). Sonuçta İTK plağı üzerinde spesifik amatoksin lekelerinin yanı sıra *A. Citrina*'da görülen spesifik bufoterin lekeleri de görüldü. Yapılan literatür araştırmasında sözü geçen maddeler ile ilgili olan bir mantara rastlanamamıştır. Bu nedenle bu mantarın bir melez *Amanita* türü olabileceği düşünülerek bu çerçevede çalışmalarımız sürdürülmektedir.

Biyolojik bulgularda ise, gözlenmeye alınan farelerden ilk 4. saatin içinde yalnız 0.75 mg kurutulmuş ve toz edilmiş örnek ile şahit *A. phalloides* verilerin genel durumlarında bozulmanın başladığı görüldü. Diğer mantar türlerinin verildiği farelerde görülmeyen bu zehirlenme tablosu: titreme, hareket yeteneğinde azalma, solunum sayılarında sıklaşma, gözlerde buğulanma, çapaklanma ve kapanma şeklinde ortaya çıktı.

Bu zehirlenme tablosu ertesi güne kadar devam etti. Sonra bir iyileşmenin başladığı fark edildi. Titremenin düzelmeye başladığı, hareket yeteneğinin arttığı, solunumlarının normalleşmeye başladığı görüldü. Bu iyileşme halinin ikinci gün içinde tekrar bozulmaya başladığı ve ilk zehirlenme tablosuna benzer bir tablonun ortaya çıktığı görüldü. Bu tablo ilkinde oranla daha hızlı gelişerek kısa sürede koma haline dönüştü ve üçüncü gün içinde her iki farenin de öldüğü görüldü.

Farelerde 3 gün içinde ölümle sonuçlanan bu zehirlenme tablosu *A. phalloides* türü bir mantar yenilmesiyle ortaya çıkan ve insanlarda phalloida sendrom adı verilen zehirlenme tablosu ile büyük bir benzerlik göstermektedir. Phalloid sendromu görülen insanlarda zehirlenme belirtileri mantarın yenilmesini izleyen 6-12. saatlerde ortaya çıkıyor, 48. saate kadar devam ediyor sonra bir düzelme devresi başlıyor ve 3. güne kadar devam eden bu devre sonunda tekrarlayan ve hızla gelişen zehirlenme hali görülüyor. Bu hal, 4. gün içinde komaya dönüşerek en geç 6. gün içinde de ölüm meydana geliyor.

TARTIŞMA

Mantar zehirlenmeleri sonucu meydana gelen ölümlerde, otopsi bulgularını doğrulayacak ve post-mortem örneklerde mikotoksikleri tanıyabilecek kimyasal bir çalışma bulunamadığı bildirilmiştir (6). Bu konuda immunolojik yöntemlerden hareketle antijen-antikor reaksiyonlarına dayanan bazı çalışmalar yapıldığı, ancak bunların post-mortem materyallere uygulanamadığı bilinmektedir (7).

Mantar zehirlenmelerini tanı için, canlı örneklerinden, mide muhtevası veya intesti-

nal kanal içeriğinde mikroskopik inceleme ile sporların bulunması, teşhise yardımcı olabilirse de bu sporların birbirine çok benzemesi nedeni ile mantarın özelliği konumunda kesin bir açıklık getirmesi beklenmemektedir.

Phalloid sendromunda ölüm olayının, mantarın yenmesinden ortalama 4-5 gün sonra meydana gelmesinden dolayı ve ilk gastrointestinal şikayet gerek kusma gerekse diare şeklinde ortaya çıkması sebebi ile sporların vücuttan atılmış olması da, bu yolla tanıyı engelleyen bir başka faktör oluşturmaktadır.

Mantar zehirlenmeleri sonucu meydana gelen ölümlerin otopsi bulgularında, amatoksinlerin hepatorenal toksik etkilerinden hareket edilmektedir (7). Fakat amatoksinlerden başka toksik maddelerin ve mikroplarında hem karaciğer ve hem de böbrekler üzerinde nekroz yapabileceği gözönüne alındığında, otopsi bulgularını doğrulaması için şüpheli mantar'ın amatoksinler yönünden kimyasal ve biyolojik incelemesinin yapılması gerçek ölüm sebebinin bulunması bakımından Adli Tıp açısından önem taşımaktadır.

SONUÇ

Mantar zehirlenmesi sonucu meydana geldiği iddia olunan adli olayların aydınlığa kavuşturulmasında, bugüne kadar sadece otopsi bulguları ile yetinilmekte idi.

Otopsi bulgularını doğrulayacak kesim ve Adli Tıp yönünden uygulanabilir bir biyokimyasal metodun olmaması, bu zorunluluğa sebep olmakta idi.

Çalışmalarımızın sonucu ise, şüpheli mantar örneğinin gönderilmesi halinde bu mantarın ölümlerin % 90'a sebep olan, Amanita phalloides türü bir mantar olup olmadığını ortaya koyabileceğimizi göstermiştir.

KAYNAKLAR

- 1 Stijve, T. (1981) *Mitt. Geb. Lebensmittelunters Hyg.*, **72**, 44-54.
- 2 Yocum, R.R., Simans, D.M. (1977) Amatoxins and Phalloxins in Amanita species of the North eastern Unites States. *Lloydia*, **40**, 178-190.
- 3 Hatfield, G.H. (1979) Toxic Plants: Toxic Mushrooms (Kingham, A.D. ed.) S.9-19 Columbia University Newyork.
- 4 Goldfrank, L.R., Kulberg, A.G., Lampe, K.F., Bresnitz, E.A. (1990) Mushrooms: Toxic and Hallucinogenic S. 575-585 Goldfrank L.R. et al. (Ed.) Goldfrank's Toxicologic Emergencies, 4 th. Ed. Prentice Hall, International Inc. USA.
- 5 Çetin, H.B. (1992) Zehirli ve Ölümcül Bir Mantar Türü olan Amanita phalloides Fr.(Link) Üzerinde Kimyasal ve Biyolojik Araştırmalar. İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı yüksek lisans tezi. Prof.Dr. Turhan Baytop danışmanlığında.
- 6 Kurtoğlu, S. (1992) Zehirlenmeler Teşhis ve Tedavi s. 591-600. Erciyes -Üniversitesi Yay. No. 30. Kayseri.
- 7 Çakır, C., Çöloğlu, A.S., Yavuz, M.F., Öztekin, I. (1991) *Adli Tıp Derg.*, **7(1-2)** 4-12.

Ayrı baskı için:

H. Bülent Çetin
Adli Tıp Kurumu
34246 Cerrahpaşa, İstanbul, Türkiye