

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ADLİ TIP ANABİLİM DALI**

**FARKLI BAKTERİ TÜRLERİNİN FARKLI ORTAM KOŞULLARINDA
KAN ALKOL STABİLİTESİNE ETKİSİ**

Dr. Muhammed Zeyit ALEMDAR

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA
2021**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ADLI TIP ANABİLİM DALI**

**FARKLI BAKTERİ TÜRLERİNİN FARKLI ORTAM KOŞULLARINDA
KAN ALKOL STABİLİTESİNE ETKİSİ**

Dr. Muhammed Zeyit ALEMDAR

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet CAVLAK**

**ANKARA
2021**

TEŞEKKÜR

Fikir, görüş ve tecrübeleriyle bana her daim destek olan değerli tez danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Cavlak'a,

Adli toksikoloji üzerine yapmış olduğu akademik çalışmalar ile bu alana ilgimi çeken ve bu alana yönelmemi sağlayan kıymetli hocam sayın Doç. Dr. Ramazan Akçan'a,

Laboratuvar çalışmalarımda ve deney sürecimde bilimsel tecrübeleriyle bana destek olan sayın Doç. Dr. Mukaddes Gürler'e,

Akademik ve eğitim sürecimde değerli katkılarından dolayı sayın Prof. Dr. Ali Rıza Tümer ve Prof. Dr. Aysun Balseven Odabaşı'na,

Beraber çalışmaktan her daim keyif aldığım kıymetli Dr. Burak Taştekin ve diğer tüm asistan arkadaşlarıma,

Her daim sabırla bana destek olan pek değerli eşim Büşra Akman Alemdar'a
Teşekkür ederim.

Dr. M. Zeyit Alemdar

ÖZET

Alemdar, Z., Farklı Bakteri Türlerinin Farklı Ortam Koşullarında Kan Alkol Stabilitesine Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adli Tıp Uzmanlık Tezi, Ankara, 2021. Alkol, uzun yıllardır birçok farklı toplumda yaygın olarak kullanılan ve bağımlılık yapan bir maddedir. Alkolün vücut sıvılarında özellikle de kanda doğru ve hassas olarak analizi adli tıp uygulamalarında önemli bir yer teşkil etmektedir. Bu analizin doğru ve standardize olması için kan numunelerin alınması ve muhafaza edilmesiyle ilgili yönetmelikler yayınlanmıştır. Ancak zaman zaman kan alma personelinin numune alımı sırasında yeterli özeni göstermemesinden ya da numunelerin hazırlanması esnasındaki özen eksikliğinden dolayı kan numuneleri farklı mikroorganizmalar ile kontamine olabilmekte ya da kan numuneleri uygun sıcaklık ve/veya saklama koşullarında muhafaza edilememektedir. Bu gibi nedenlerden dolayı adli makamlara itirazlar olabilmektedir. Çalışmamızda; kan numunelerini kontamine etme riski yüksek olan ve fermentasyon yapan 3 farklı bakterinin kan alkol konsantrasyonu üzerine etkisi ve ayrıca farklı tüp ve sıcaklık şartları altında bu etkinin nasıl değiştiğinin tespiti amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda gönüllü sağlıklı bir yetişkinden alınan 1 ünite tam kan numunesi, EDTA (Etilendiamintetra-asetat) içeren mor kapaklı ve NaF (Sodyum florür) içeren gri kapaklı tüplere doldurulmuş, sonrasında kan tüplerinin yarısına son etil alkol konsantrasyonu 20 mg/dL ve diğer yarısına son etil alkol konsantrasyonu 50 mg/dL olacak şekilde saf etil alkol ilave edilmiştir. Sonrasında bu tüplere son derişimi 10^6 CFU/ml olacak şekilde ayrı ayrı Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli bakterileri eklenmiştir. Tüplerin bir kısmına ise herhangi bir bakteri eklenmemiştir. İçindeki kan etil alkol konsantrasyonu, bakteri çeşit ve derişimleri bilinen kan numuneleri 3 farklı (4, 22 ve 32°C) sıcaklık altında ve 1, 3, 7, 14, 28. günlerde analiz edilmek üzere muhafaza edilmiştir. Analiz günü gelen numunelerin etanol konsantrasyonları HS-GC (Headspace-Gaz Kromatografisi) cihazında analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, 4°C'de muhafaza edilen kan numunelerinin bakteriler ile kontamine olsun ya da olmasın, içerisinde NaF bulunan tüplere alınsın ya da alınmasın, kan etil alkol konsantrasyonunun uzunca bir süre sabit olarak kaldığı; ortam sıcaklığının arttığı (22 ve 32°C) durumlarda, özellikle de Escherichia coli

bakterisi ile kontamine numunelerde kan etanol konsantrasyonunun ilk günlerde artma, sonrasında azalma ya da sabit kalma eğiliminde olduğu; Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus aureus ile kontamine olmuş ya da steril numunelerde ise sıcaklığın arttığı durumlarda kan etanol konsantrasyonunun azalma eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca sıcaklık artışıyla orantılı olarak da kan etanol konsantrasyonundaki azalmanın da arttığı değerlendirilmiştir. Çalışmamızda tespit edilen bulguların doğrultusunda etanol konsantrasyonu çalışılacak kan numunelerinin NaF içeren gri kapaklı kan tüplerine alınması gerektiği, transfer sürecinde kesinlikle düşük sıcaklıklarda muhafaza edilmesi ve olabildiğince hızlı bir şekilde analiz edilmesinin doğru olacağı, kan etil alkol düzeyi analiz edilen vakalarda bakteriyel kontaminasyon iddiası var ise; numunelerdeki muhtemel bakteri türünün tespitinin yapılması gerektiği, bu numuneler Escherichia coli ile kontamine ise kan etil alkol sonucunun güvenilir olmadığı, tıbbi ve hukuki yorum yapılmasından kaçınılması gerektiği, ancak Staphylococcus Aureus veya Staphylococcus Epidermidis ile kontamine ise kan etil alkol sonucunun güvenilir olduğu, tıbbi ve hukuki yorum yapılabileceği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Adli Tıp, Kan alkol konsantrasyonu, Kontaminasyon, Farklı ortam koşulları

ABSTRACT

Alemdar, Z., Blood alcohol concentration effect of different bacterial species under different environmental conditions, Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Forensic Medicine, Ankara, 2021. Alcohol is an addictive substance that has been widely used in different societies for many years. Accurate and precise analysis of alcohol in body fluids, especially in blood, has an important place in forensic medicine applications. Regulations about collection and storage of blood samples have been published in order for this analysis to be accurate and standardized. However, from time to time, blood samples can be contaminated with different microorganisms or blood samples cannot be stored under appropriate temperature and / or storage conditions due to the lack of care during sampling by the blood collection personnel or lack of care during the preparation of the samples. For such reasons, there may be objections to judicial authorities. In our study, it was aimed to determine the effect of 3 different fermentation bacteria with high risk of contaminating blood samples on blood alcohol concentration and also how this effect changes under various tube and temperature conditions. For this purpose, 1 unit of whole blood sample taken from a healthy volunteer adult was filled in purple-capped EDTA (Ethylenediaminetetra-acetate) tubes and gray-capped NaF (sodium fluoride) tubes, and then pure ethyl alcohol was added to half of the blood tubes with a final ethyl alcohol concentration of 20 mg / dL and the other half to a final ethyl alcohol concentration of 50 mg / dL. Afterwards, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* bacteria were added separately to these tubes with a final concentration of 10^6 CFU / ml. Some of the tubes did not contain any bacteria. Blood samples with known blood ethyl alcohol concentration, bacterial types and concentrations were kept under 3 different (4, 22 and 32°C) temperatures in order to be analyzed on the 1st, 3rd, 7th, 14th and 28th days. Ethanol concentrations of the samples were analyzed in HS-GC (Headspace-Gas Chromatography) device on the specified days. As a result of the analysis, whether the blood samples stored at 4 ° C are contaminated with bacteria or not, whether they are taken into tubes containing NaF or not, the blood ethyl alcohol concentration remains constant for a long time; When the ambient temperature increases, especially in samples contaminated with

Escherichia coli bacteria, the blood ethanol concentration tends to increase during the first days, then decrease or remain constant; Samples contaminated with Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus or in sterile samples, when the temperature increased, the blood ethanol concentration tended to decrease. In addition, it was evaluated that the decrease in blood ethanol concentration increased in proportion to the temperature increase. In line with the findings determined in our study, blood samples to be studied should be taken into gray-capped blood tubes containing NaF, it would be correct to keep the blood samples to be analyzed at low temperatures during the transfer process and to analyze the ethanol concentration as quickly as possible. If there is a claim of bacterial contamination in cases whose blood ethyl alcohol level is analyzed, It is necessary to determine the probable type of bacteria in the samples. If these samples are contaminated with Escherichia coli, the result of blood ethyl alcohol is unreliable, medical and legal interpretation should be avoided, but if contaminated with Staphylococcus Aureus or Staphylococcus Epidermidis, the result of blood ethyl alcohol is reliable, medical and legal interpretation It was thought that it could be done.

Keywords: Forensic Medicine, Blood alcohol concentration, Contamination, Different environmental conditions

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER.....	xi
TABLolar	xiii
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Alkolün Tanımı	3
2.2. Alkolün Tarihçesi	3
2.3. Etil Alkolün Genel Özellikleri	4
2.4. Elde Edilişi	4
2.5. Alımı, Emilimi, Metabolizması ve İtrahı	7
2.6. Alkollü İçecekler	10
2.7. Etil Alkol Tayin Yöntemleri.....	11
2.8. Metil Alkol	15
2.9. Alkolün Davranışlar Üzerine Etkisi	15
2.10. Ülkemizde Trafikte Alkollü Araç Kullanımı veya Denetimi ile İlgili Düzenlemeler.....	17
2.11. Kan Alımı Esnasında Kontaminasyona Neden Olabilen Bakteriler	18
2.12. Kan Muhafazası İçin Kullanılan Tüpler	21
MATERYAL VE METOD.....	22
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	22
3.2. Çalışma Protokolü ve Yöntem	27
3.3. İstatistiksel analiz	30
BULGULAR.....	30
TARTIŞMA	42
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	48
KAYNAKLAR	49
EKLER.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
8.1. Etik kurul onayı.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

8.2. Dekanlık tez olur yazısı**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**

SİMGELER VE KISALTMALAR

- ADH:** Aldehid dehidrogenaz
BAC: Kan alkol konsantrasyonu
CFU/ml: Colony-forming unit/mililitre
cm/sec: santimetre/saniye
CoA: Koenzim A
°C: santigrat derece
EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit
GC: Gaz Kromatografisi
HS: Headspace
psi: Pounds per square inch
KNS: Koagülaz negatif stafilokok
mg/dl: miligram/desilitre
mL/min: mililitre/dakika
MEOS: Mikrozomal etanol oksitleyici sistem
ml: mililitre
NaF: Sodyum Florür
NAD: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADP: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
kg: kilogram
TCK: Türk Ceza Kanunu
TMK: Türk Medeni Kanunu
-OH: Hidroksil Grubu

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Etanolün moleküler yapısı.....	4
Şekil 2.2. Biranın mayalanma şekli.....	6
Şekil 2.3. Alkol distilasyonunun şematik görüntüsü	7
Şekil 2.4. Etanolün metabolizması.....	9
Şekil 2.5. Etanolün metabolizması	9
Şekil 2.6. İçkilerin alkol yüzdeleri ve zamana göre kan alkol düzeyi.....	11
Şekil 2.7. Headspace çalışma mekanizmasını gösteren şematik resim.....	15
Şekil 2.8. Gram pozitif kokların mikroskop altında görünümü ve kanlı agar kültüründe sarımsı koloni oluşturmasına ait görüntü	19
Şekil 2.9. Üriner sistem enfeksiyonu yapmış gram negatif basillerin mikroskop altında görünümü ve endo agarda kırmızı renkli koloni oluşturmasına ait görüntü.....	21
Şekil 3.1. BD Vacutainer marka mor ve gri kapaklı kan tüpleri	22
Şekil 3.2. Sigma Aldrich marka %99,9 saflıkta etanol ve 2-propanol	23
Şekil 3.3. Brand Transferpette S ayarlanabilir otomatik pipet	23
Şekil 3.4. VWR marka vorteks (karıştırıcı)	24
Şekil 3.5. “Microtest® MIT 120” iklimlendirme kabini	24
Şekil 3.6. Isolab marka 20 ml hacimli klempeli headspace viali	25
Şekil 3.7. Agilent marka 7694E seri numaralı HS örnekleyici ve Agilent marka 7890B serili GC cihazı	25
Şekil 3.8. Deney prosedürünün şematik görüntüsü	29
Şekil 3.9. Kan tüplerinin deney sürecince spordaki görüntüsü	30
Şekil 4.1. 4°C’de mor kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine derişimi 50 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği.....	31
Şekil 4.2. 4°C’de gri kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine derişimi 50 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği.....	32

Şekil 4.3. 4°C’de mor kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisinde derişimi 20 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği.....	33
Şekil 4.4. 4°C’de gri kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisinde derişimi 20 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği.....	33
Şekil 4.5. 22°C’de mor kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisinde derişimi 50 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği.....	34
Şekil 4.6. 22°C’de gri kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisinde derişimi 50 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği.....	35
Şekil 4.7. 22°C’de mor kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisinde derişimi 20 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği.....	35
Şekil 4.8. 22°C’de gri kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisinde derişimi 20 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği.....	36
Şekil 4.9. 32°C’de mor kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisinde derişimi 50 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği.....	37
Şekil 4.10. 32°C’de gri kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisinde derişimi 50 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği.....	38
Şekil 4.11. 32°C’de mor kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisinde derişimi 20 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği.....	39
Şekil 4.12. 32°C’de gri kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisinde derişimi 20 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği.....	39
Şekil 4.13. Tüm deney numunelerinin zamana göre etil alkol düzeyi değişim grafikleri.....	41

TABLÖLAR

Tablo	Sayfa
Tablo 3.1. Agilent 7890b GC Parametreleri	26
Tablo 3.2. Agilent 7694e Headspace Parametreleri	27

GİRİŞ VE AMAÇ

Alkol, birçok toplumda uzun yıllardır yaygın olarak kullanılan, bağımlılık yapan bir maddedir. Alkol kullanımı ile ilgili sorunlar tüm dünyada önemli bir yer teşkil etmektedir. Alkolün vücut sıvılarında özellikle kanda doğru ve hassas olarak tayini adli tıp uygulamalarında önemli bir yer teşkil etmektedir. Kan numunelerin alınması ve kan alkol analizi için tıbbi laboratuvar incelemelerinin belirli bir standardizasyon içinde yapılabilmesi için Sağlık Bakanlığı tarafından en son 2017 yılında bir genelge yayınlanmıştır (1). Bu genelgede kan alım görevlisinin işlem esnasında nelere dikkat etmesi gerektiği, farklı amaçla alınan kan numuneleri için hangi özellikte kan tüpleri kullanması gerektiği ya da işlemden sonra numuneleri nasıl saklaması ve transport etmesi gibi bilgiler mevcuttur. Ancak zaman zaman kan alma personelinin numune alımı sırasında yeterli özeni göstermemesinden ya da numunelerin hazırlanması esnasındaki özen eksikliğinden dolayı kan numuneleri farklı mikroorganizmalar ile kontamine olabilmektedir. Ayrıca kan numuneleri her zaman istenilen sıcaklıklarda ya da saklama koşullarında muhafaza edilememekte veya bu şekilde iddialar ortaya atılabilmektedir. Bu gibi nedenlerden dolayı özellikle kanda alkol tespit edilen durumlarda numune alınması ve saklama koşullarının uygunsuz olduğu şeklinde adli makamlara itirazlar olabilmektedir. İtiraz eden kişiler kanlarının steril koşullarda alınmadığı (kontamine olduğu) ya da uygun şartlarda saklanmadığını iddia etmektedirler. Bunlardan bazıları alkol almadığını, bazıları ise alkol aldığını ancak tespit edilen alkolün kendisinin aldığından çok daha yüksek olduğu yönünde itirazlarda bulunmaktadır.

Kan alımı sırasında görevli personel tarafından antisepsi kurallarına özen gösterilmemesi halinde kan numuneleri çeşitli bakteri türleri ile kontamine olabilmektedir (2). Bu bakteriler ile kontamine kanlarda fermantasyon sonucu alkol seviyesi değişime uğramaktadır (3). Bu yüzden alkol seviyesi çalışılacak kan numunelerinin içinde bir çeşit fermantasyon inhibitörü olan NaF (sodyum florür) bulunan gri kapaklı tüplere alınması tavsiye edilmektedir. Ayrıca bakterilerin viabilitesinin önlenmesi için kan numunelerinin +4°C'de saklanması tavsiye edilmektedir. Yanlış tüplere alınan ya da uygun olmayan sıcaklıklarda muhafaza edilen kanlarda kan alkol değerlerinde değişiklikler görülebilmektedir.

“Blood alcohol concentration”, “Contamination”, “Blood sample storage”, “In vitro ethanol production”, “Stability of ethanol” gibi anahtar kelimeleri ile yaptığımız literatür taramasında kan alkol konsantrasyonu ile ilgili birçok çalışma yapıldığı görüldü. Bu çalışmalarının bir kısmının postmortem kan örneklerinden bir kısmının da antemortem kan örnekleri ile yapıldığı değerlendirildi.

Postmortem alkol çalışmaları daha çok ölüm sonrasında vücutta alkolün oluşma süreçlerine yoğunlaştığı veya alkol almamış olduğu bilinen kişilerde (örneğin bebek veya uzun süre hastane yatışı olan kişi) postmortem alınan kanda alkol tespit edilmesi sorunun çözümüne yönelik araştırmalar olduğu, antemortem çalışmaların ise temelde trafikte alkollü araç kullanmanın denetimine yönelik alınan kanda yapılan alkol analizine yapılan itirazlardaki sorulara cevap bulmak ve verilen cevaplara bilimsel bir temel oluşturmak amacıyla yapıldığı değerlendirildi.

Postmortem alkol değişimlerinin antemortem değişimlere göre daha fazla olduğu ve bununla genel olarak postmortem çürümeye bağlı olduğu görüldü (4). Antemortem yapılan çalışmalarda ise daha çok tüp çeşitleri ve sıcaklık değişimi ile kan alkol konsantrasyonu arasındaki ilişkinin değerlendirildiği tespit edildi. Tüp olarak içinde enzim inhibitörü olup olmamasına göre gri ya da mor kapaklı tüplerin kullanıldığı, sıcaklık değişimleri için ise dondurucuda saklanarak -20°C, buzdolabına konularak 4°C, oda sıcaklığına bırakılarak 20-24°C ve iklimlendirme kabinleri kullanılarak 32-38°C gibi sıcaklıklarda kan alkol stabilitesinin tespit edildiği görüldü. Sıcaklık aralıklarının bu kadar geniş olmasının sebebi olarak, gerçek hayatta kan alınımından sonra numunelerin analiz edilinceye kadar oluşabilecek istenilmeye senaryoların (yanlış sıcaklıklarda muhafaza etme, numunenin hemen çalışılmayıp bekletilmesi ya da numunenin unutulması vs.) simüle edilebilmesi için yapıldığı değerlendirildi. Kan numunelerinin kontaminasyonu ile kan alkol konsantrasyonu arasındaki değişimin ise yeterince değerlendirilmediği görüldü. Candida albicans mantarı ile kontamine edilmiş kan numunelerindeki kan alkol konsantrasyon değişiminin çalışıldığı ancak bakteriler ile kontaminasyon üzerinde çalışılmadığı görüldü.

Mevcut çalışmamızda ise daha öncesinde araştırılmamış fermentasyon yapan bakterilerinin kan alkol konsantrasyonu üzerine etkisi ve ayrıca farklı tüp ve sıcaklık şartları altında bu etkinin nasıl değiştiğinin tespiti amaçlanmıştır. Bu amaç

doğrultusunda Stafilokokkus epidermidis, Stafilokokkus aureus, Escherichia coli bakterileri ile kontamine edilmiş olan ve kan etil alkol düzeyleri bilinen numuneler farklı tüp (gri ve mor kapaklı) ve farklı sıcaklıklarda (+4, +22 ve +32°C) muhafaza edilerek kan etil alkol seviyelerinin zaman içindeki değişimi tespit edilmiştir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Alkolün Tanımı

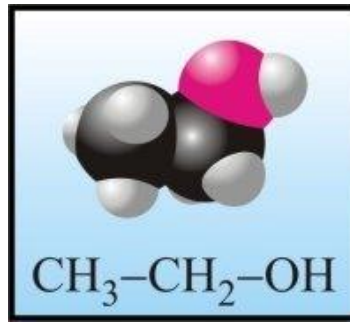
Karbon grubuna doğrudan –OH grubunun bağlı olduğu organik moleküllerdir. Bir molekülde bulunan hidroksil grubu sayısına göre monoalkoller, dialkoller, trialkoller olarak üçe ayrılmaktadırlar. Günlük hayatta karşımıza en çok çıkan etil alkol (C₂H₅OH) bir monoalkoldür (5). Etilen glikol bir dialkol ve gliserin ise bir trialkoldür.

2.2. Alkolün Tarihi

Alkolün tarihi hemen hemen insanlık tarihi ile yaşıttır. Alkol kelime olarak Arapçadaki “kuhl” kelimesinden (al-kohl, al-kuhl) kaynaklanmaktadır. İspanyolcaya “alcohol”, Fransızcaya ise “alcool” şeklinde girmiştir (6). Alkolün ilk defa ne zaman ve hangi koşullarda keşfedildiği bilinmese de bu konuda bazı fikirler ve efsaneler süregelmiştir. Bir efsaneye göre Nuh Tufanı esnasında Nuh'un gemisinde bulunan üzümün, üzüm suyuna, sonra şıraya ve şaraba dönüştüğü, tufandan sonra da gemide bulunan insanların şarap içerek karaya ayak bastığı ve şarabı dünyaya yaydığı belirtilmiştir (7). M.Ö. 3000 yılında Avrupa kıtası henüz şarabı tanımazken Anadolu'da şarap imal edildiği bildirilmiştir. Bağcılık kültürü Anadolu'nun doğusuna Mezopotamya üzerinden Nil deltasına doğru olmuştur. Eski mısırdaki özellikle dördüncü ve altıncı sülale dönemlerinde şarapçılığın üst düzeylere ulaştığı bildiren mozaikler bulunmuştur. Bağcılık kültürünün Anadolu'nun batısına yayılımında ise Girit ve Ege adalarına göç eden Hititlerin büyük etkisi olmuştur. Göç eden Hititlerin bu bölgede kurduğu Minos Uygarlığı'nın başlattığı bağcılık zamanla Mora Adası ve Trakya'ya yayılmıştır. Yunanlılar ve özellikle de Fenikeliler bağcılık kültürünü Akdeniz'in batısına taşımışlardır. Biranın ise ilk defa yaklaşık 8 bin yıl önce Mezopotamyalıların arpayı ekmek yapmaya çalışması esnasında keşfedildiği düşünülmektedir (8). İlk biralar yapılırken hurmalardan elde edilen doğal mayalar, arparın ufalanmasının ardından su ile karıştırılarak içine konuluyor ve mayalanmaya bırakılıyordu. Ardından da ardından da süzülüp baharat katılarak ile servise hazır hale getiriliyordu (9).

2.3. Etil Alkolün Genel Özellikleri

Etil alkol günlük hayatta karşımıza en sık çıkan alkol çeşididir. Bunun sebebi alkollü içeceklerin temel maddesini oluşturmasıdır. Renksizdir ve uçucu özelliktedir. Bir monoalkol türüdür (10). Kimyasal formülü C_2H_5OH 'tır. Molekül ağırlığı 46,06844'tür. Kaynama noktası $78,5\text{ }^{\circ}C$, erime noktası $-117,3\text{ }^{\circ}C$ ve özkütlesi $0,79\text{ gr/ml}$ 'dir. Alkollü içeceklerin kullanımının yanı sıra yakıtlarda katkı maddesi olarak, ilaç sanayisinde, parfüm yapımında ve el dezenfektanlarında dahil olmak üzere birçok üründe kullanılmaktadır (11). Yanıcı bir madde olmasından dolayı ateşten uzak tutulmalıdır. Oksidasyonun minimum seviyede olması için serin bir ortamda ve evaporasyonun engellenmesi için kapağı kapalı şişelerde saklanmalıdır.



Şekil 2.1. Etanolün molekül yapısı (12)

2.4. Elde Edilişi

Etil alkol fermantasyon ve distilasyon olmak üzere iki yöntem ile elde edilmektedir. Etil alkol üretimi sanayi ortamında, hobi amaçlı üretim yerlerinde ve hatta evlerde yapılmaktadır.

Etil alkolün endüstriyel üretiminde saf alkol üreten fabrikalar vardır. Tarım ve Orman Bakanlığı etil alkol üretimi yapan firmaların listelerini kendi hesapları üzerinden paylaşmıştır (13). Rakı, votka ve viski gibi yüksek alkollü içeceklerin yapımında ya da kolonya, el dezenfektanı gibi ürünlerin yapımında bu endüstriyel firmalardan etil alkol temin edilebilmektedir.

Alkolün önemli bir özelliği de antiseptik özelliğidir. Bu amaçla özellikle hastane, poliklinik gibi sağlık kuruluşları başta olmak üzere işyerlerinde yüzey dezenfeksiyonu amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca ağız içi antisepsisinde gargaralarında içeriğinde yer almaktadır.

Alkolün bazı ülkelerde satışının yasak olmasından dolayı, bazı ülkelerde de fiyatının pahalı olmasından dolayı sahte içkiler üretilmektedir. Sahte içki yapımında etil alkol istenilen şartlarda damıtılmadığında yüksek sıcaklığa maruz kaldığında ilk üründe en çok olmak üzere yan ürün olarak metanol oluşabilmektedir. Metil alkol etil alkole göre daha toksik olduğu ve dolayısıyla toksik ve letal dozu daha düşük olduğu için zehirlenmelere neden olabilmektedir. Ayrıca ucuz olmasından dolayı etanol yerine direkt metanol de kullanılabilir.

Hobi amaçlı alkol üretimlerinde ise genellikle fermentasyon yöntemi kullanıldığı için zehirlenmeler ender görülmektedir. Ancak hazır alkol alınarak meyve özütleri ile yapılan içkilerde de zehirlenme riski tabii ki vardır. Özellikle alkollü içecek fiyatlarının yüksek olduğu ülkelerde hobi amaçlı üretim çok sık görülmektedir. Sıklıkla bira, şarap, rakı gibi alkollü içkiler ev ortamlarında yapılmaktadır. Ticari olarak satılmadığı sürece devlet tarafından evde yapılan içkiler için bir yaptırım ya da denetim söz konusu değildir.

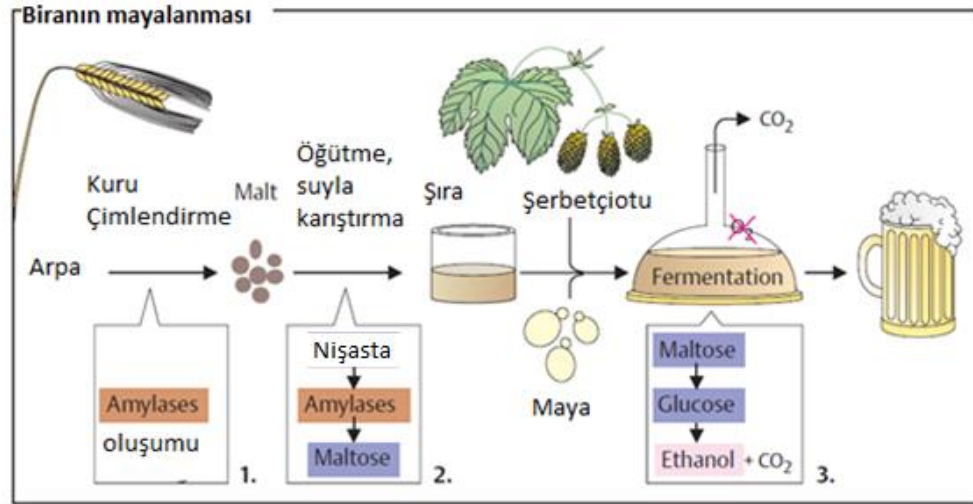
2.4.1. Fermantasyon Yolu

Yaş ya da kuru meyve ve tahılların içinde bulunan şekerlerin maya mantarları tarafından fermantasyonu ile elde edilir. Fermantasyon ortamında etil alkol konsantrasyonu yaklaşık %15'e eriştiğinde, yüksek etil alkol düzeyi mantarları öldürdüğünden fermantasyon durur. Bu yolla daha yüksek konsantrasyonda alkol elde edilemez. Arpanın fermantasyonu ile bira elde edilirken, meyvelerin özellikle de üzümün fermantasyonuyla şarap elde edilir. Bu şekilde elde edilen içkilere bira, şarap, vermut ve likör örnek olarak gösterilebilir (8).

Alkol üretiminde yaş meyvelerin içinde en çok üzüm tercih edilmektedir. Üzümün hasat zamanı kuzey yarım küre ülkelerinde ağustos ve eylül aylarıdır. Üretim yapılan coğrafyaya göre değişmekle beraber Merlot, Şiraz, Carignan, Cabernet vb. gibi farklı farklı şaraplık üzüm cinsleri vardır.

Biranın ana maddesi arpadır. Arpa kuru ortamda çimlenmeye bırakılır ve sonrasında taneleri fırınlanıp toplanarak malt elde edilir. Elde edilen malt öğütülüp suyla karıştırıldıktan sonra mayseleşme kazanlarına alınır. Sonrasında kademeli olarak ısıtılarak amilaz enzimi sayesinde nişasta maltoza dönüşür. Mayseleşme işleminde sonra süzme işlemi yapılarak şıra elde edilir. Süzülen şıra kaynatma kazanına alınır ve şerbetçi otu, maya ilave edilir. Elde edilen ürün soğumaya ve sonrasında

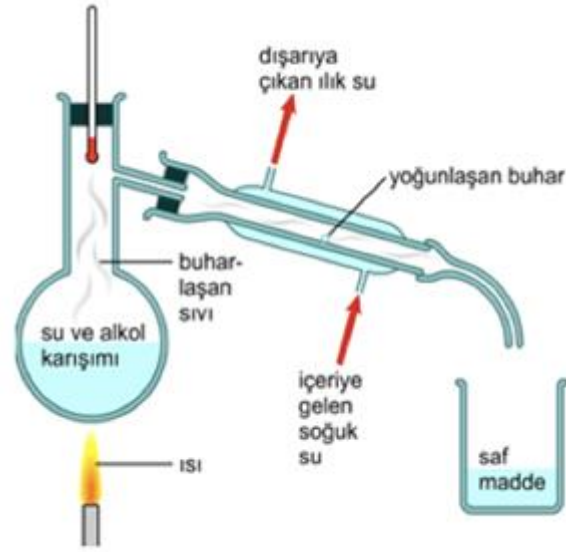
fermantasyona bırakılır (Şekil 2.2). Yaklaşık olarak üç hafta sonrasında fermentasyon ve dinlenme aşaması sona erer. Son olarak bira süzülerek istenilen berraklığa kavuşturulur.



Şekil 2.2. Biranın mayalanma şekli (11)

2.4.2. Distilasyon Yolu

Fermentasyon yöntemi ile yüksek oranlarda alkol içeriği elde edilememektedir. Bu sebepten ötürü fermentasyon ile elde edilen alkol içeriğini saflaştırılarak daha yüksek oranlarda alkollü içkiler elde edebilmek için distilasyon yöntemi kullanılmaya başlamıştır. Fermentasyon sonucu elde edilen ve sudan daha düşük kaynama noktasına sahip etil alkolün uçurularak sudan ayrılması ve toplanması esasına dayanır. Bu yöntemde damıtılacak alkollü içerik bir kaba konular ve ısıtılır. Buharlaşmaya başlayan içerik bir boru vasıtasıyla soğutulur ve yoğunlaşma ile daha yüksek oranda alkol içeriği elde edilmiş olur (Şekil 2.3.). Üretim için daha fazla teknik malzeme ve bilgi gerektirdiği için ev içi veya hobi amaçlı üretiminde fermentasyon yoluna göre daha az tercih edilmektedir. Rakı, votka, cin, viski, konyak distilasyon yolu ile elde edilen içkilere örneklerdir (8).



Şekil 2.3. Alkol distilasyonunun şematik görüntüsü

2.5. Alımı, Emilimi, Metabolizması ve İtrahı

Alkol keyif verici bir madde olması nedeniyle kutlamalarda, sosyal buluşmalarda, sıklıkla alınmaktadır. Aynı zamanda anksiyete giderici ve cesaretlendirici özelliğinden dolayı insanlar üzüntülü, sıkıntılı zamanlarında da alkolü tercih etmektedirler. Alkol evde veya restoranlarda yemek esnasında alındığı gibi evde veya bar, gece kulübü gibi ortamlarda tek başına da alınabilmektedir. Alkolün tek başına alınıp alınmaması onun vücutta emilim hızını ve dolayısıyla metabolize edilme sürecini doğrudan etkilemektedir.

Alkol alındıktan sonra özefagustan hızlıca mideye geçer. Alkolün emilimi %20 oranında mide, %80 oranında ise ince barsak mukozasından kana geçiş şeklinde olur. Alkol tüm gastrointestinal sistem mukozal yüzeylerinden absorbe edilebilir. Konsantrasyonunun yüksek olduğu mukoza yüzeyinden daha düşük konsantrasyondaki mukoza kan dolaşımına basit difüzyonla geçer (14). Kan alkol düzeyi, alınan alkolün miktarı, içim hızı ve içindeki alkol oranı (alkol oranı %10-30 arasındaki içecekler en hızlı emilir) birlikte alınan diğer yiyeceklerin varlığı (yağlı besinler alkol emilimini yavaşlatır, mide boşken emilim en hızlı olur) ile kişiye ait faktörlere bağlı olarak farklılıklar gösterir.

Midede yiyecek bulunması durumunda; yiyecek etanol emilim alanı ile yarışa girerek etanolün emilimini azaltacaktır. Etanolün konsantrasyonunun %30 üzerinde

olduğu içeceklerin alınmasıyla mide mukozasında irritasyon meydana gelecek, pilorda spazm oluşacak ve etanolün mideden ince bağırsağına geçişi dolayısıyla emilimi gecikecektir (8).

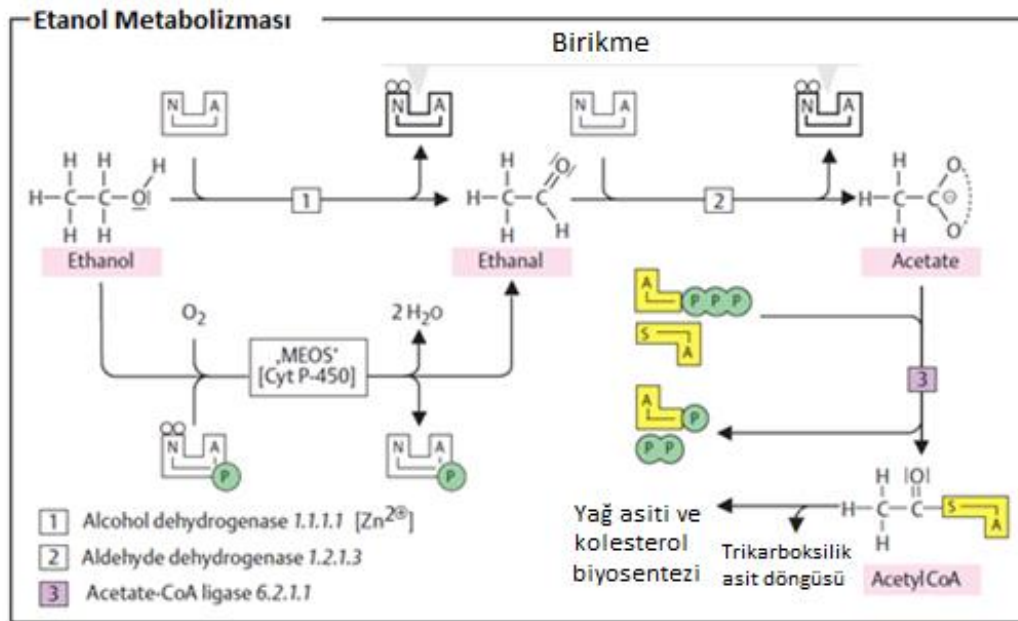
Kişiye ait faktörler içerisinde tolerans başta olmak üzere; cinsiyet, kilo, fiziksel yapı, gastrointestinal mukoza yüzey alanı, kanlanması ve hareketliliğı; diyabet, gastrektomi, psikojenik faktörler vb. durumlar sayılabilir. Mide boşken tek bir doz alkol alımını takiben 1 saat içinde kan alkol düzeyi en yüksek düzeydedir (15).

Saatler boyunca birden fazla alkol alımı olduğı durumlarda, son alkol alımından sonraki 30-60 dakikada kan alkol düzeyi en yüksek noktaya ulaşır. Kronik alkol içiciler diğeri içicilere göre alkolü daha hızlı metabolize ederler (16).

Etanol hidrofilik yapısından dolayı su oranı yüksek olan dokulara daha çok yayılım gösterir. Erkeklerde toplam vücut ağırlığına düşen suyun yüzdesi %68 iken, kadınlarda %55 olduğundan erkeklerde etanolün vücuda dağılım miktarı kadınlara göre daha fazladır. Bu nedenle aynı miktarda alkol alan kadınlarla karşılaştırıldığında, erkeklerde kan etanol oranı daha düşük miktarda çıkacaktır (17).

Etil alkol tüm vücut sıvılarına geçmektedir. Buralarda kan etil alkol konsantrasyonuna yakın değerlerde bulunmaktadır. Kan etil alkol konsantrasyonunu 1 birim olarak kabul edildiğinde yaklaşık olarak 1,35 oranında idrarda, 1,17 oranında beyin omurilik sıvısında, 1,12 oranında tükürükte, 1,14 oranında göz içi sıvısında bulunmaktadır (18).

Alınan alkolün yaklaşık olarak %98'i karaciğerde metabolize edilir (17). Etanol karaciğerde NAD, NADP, sitozolik alkol dehidrogenaz (ADH) ve p450 enzimlerinin bir parçası olan mikrozomal etanol okside edici sistem (MEOS) enzimleri ile metabolize edilir (Şekil 2.4). Etil alkolün metabolizmasındaki ana yol, karaciğerde asetaldehit ve hidrojene oksidasyonudur. Karaciğerinde enzimatik etanol oksidasyonunun ilk metabolik ürünü asetaldehittir. Etanolden daha toksiktir. Bu sebeple alkol kullanımıyla ilişkili fizyolojik değışikliklerin çoğunluğı etanolden çok asetaldehit ile bağlantılıdır (19).



Şekil 2.4. Etanolün metabolizması(11)

Alkol dehidrojenaz (ADH), mikrozomal etil alkol oksitleyici sistem (MEOS) ve katalaz etil alkolün oksidasyonundan sorumludur.



ASETİK ASİT -----> ASETİL KOA ----> TCA ve **YAĞ ASİDİ SENTEZİ**

Şekil 2.5. Etanolün metabolizması

Asetaldehit, ADH enziminin katalizör etkisiyle asetata dönüştürülür. Asetat ise daha sonra asetat-CoA ligaz enzimi tarafından asetil-CoA'ya dönüştürülür. Asetatın büyük bir kısmı karaciğer dışındaki dokularda karbondioksit ve suya oksitlenir. Geri kalan kısmı ise akciğerlerde alveollerden nefesle, böbreklerden idrar olarak ve ter bezleri tarafından salgılanarak atılır (11,20).

Alkol alımının bitiminden sonraki saatler içerisindeki kan alkol değerlerinin belirlenmesi ile ilgili olarak çeşitli formüller (Widmark ve Jung Minchel formülleri) geliştirilmiştir. Ortalama olarak kan alkol düzeyindeki 1 saatlik ortalama düşüş erkeklerde 18 mg/100 ml kadınlarda 15 mg/100ml olmak üzere her iki cinste 10-25 mg/100 ml arasında değişmektedir (5). Bir litre kanda bulunan alkol miktarının gram cinsinden karşılığı promil olarak ifade edilir. % mg olarak verilen kan alkolü miktarı 10 ile çarpılıp 1000' e bölüldüğünde promil olarak hesaplanmış olur.

Alkol dehidrogenaz aktivitesini etkileyen tüm ilaçlar (simetidin, ranitidin, vb.) beklenen kan etanol miktarında değişikliğe sebep olacaktır.

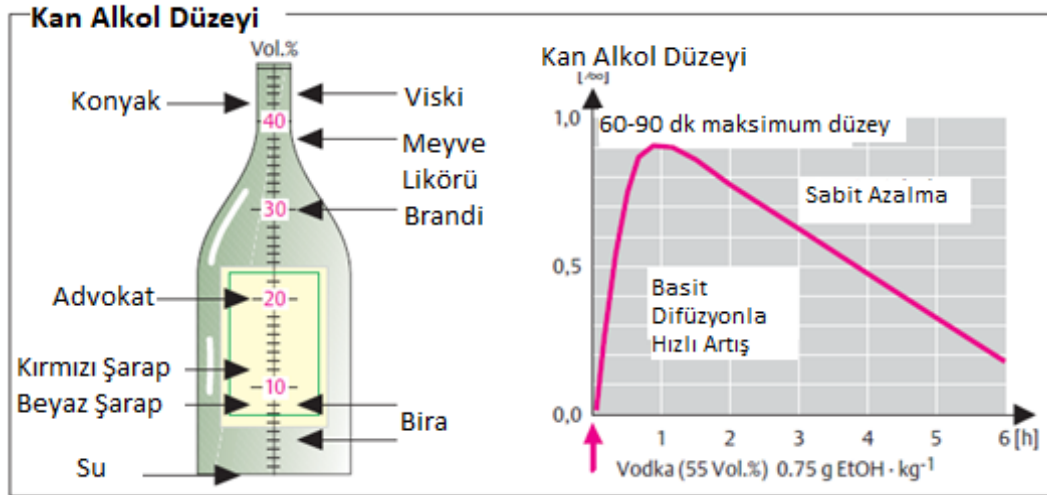
Alkolün vücuttan eliminasyon oranı, yaklaşık 0,1 g etanol / kg vücut ağırlığı / saat ortalaması ile sabittir. Bu nedenle, örneğin vücut ağırlığı 75 kg olan bir kişi için bir şişe şarapta yaklaşık 80 g etanol bulunduğundan dolayı vücuttan atılabilmesi yaklaşık 10 saat sürmektedir (21).

2.6. Alkollü İçecekler

Alkollü içecekler saf olarak üretilmemekte içerisinde bazı ek maddeler bulunmaktadır. Bu maddeler arasında bazı düşük molekül ağırlıklı alkoller (metanol ve bütanol), bazı aldehitler (asetaldehit), histamin, fenol türevi maddeler, tanenler, kobalt ve kurşun gibi bazı inorganik maddeler bulunmaktadır (22).

Alkollü İçeceklerdeki Alkol Oranı:

- Bira: %5
- Şaraplar: %10-18
- Köpüklü şaraplar: %12-13
- Likörler: %16
- Rakı: %45
- Cin: %47
- Votka: %40
- Viskiler : %40-50 (14,15)



Şekil 2.6. İçkilerin alkol yüzdeleri ve zamana göre kan alkol düzeyi (11)

2.7. Etil Alkol Tayin Yöntemleri

Alkol konsantrasyon tespitinde birçok biyolojik numune kullanılabilmeyle beraber alımının kolay ve görece daha az girişimsel olmasından dolayı en çok kan ve solunum havası kullanılmaktadır. Kullanılan yöntemler; invaziv yöntemler (kan) ve invaziv olmayan yöntemler (nefes havası, idrar, tükürük ve saç) olarak sınıflandırılabilir (23).

2.7.1. Enzimatik Yöntem

ADH enzimi katalizörlüğünde etil alkolün NAD tarafından oksitlenmesi ve NADH oluşumu ve oluşan bu NADH'nin doğrudan ultraviyole alanda spektrometrik veya florimetrik olarak ölçülmesine dayanır. Diğer bir enzimatik yöntemde ise alkol oksidaz ve peroksidaz enzimleri kullanılıp, renk reaksiyonu fenol ve 4-amino antipirin ile gerçekleştirilir (24).

2.7.2. Gaz Kromatografisi Yöntemi

Alkol tayini için ilk olarak 1958 yılında uygulanmıştır. Sonrasında birçok araştırmacı tarafından geliştirilmiştir. Gaz kromatografisiyle çok az miktarda (0,2 ml ve daha az) örnekle çalışılarak, etil alkol, metil alkol ve asetaldehidin kantitatif analizleri yapılabilmektedir. Gaz kromatografisine Headspace tekniğinin eklenmesi ile az miktarda numuneden dahi alkol analizi yapılabilmekte ve otomatik sistemleri sayesinde çok sayıda numunenin çalışılması mümkün olmaktadır (24).

2.7.3. Alkolmetre Yöntemi

Trafik kazalarında veya trafik kontrollerinde yaşayan kişilerin alkol alıp almadığı öncelikle solunum havasında etil alkol tayini yapılarak araştırılmaktadır. Son zamanlarda analitik teknolojideki gelişmeler solunum alkol cihazlarına da yansımıştır ve üreticiler bu gelişmeleri dikkate alıp cihazlarında uygulayarak dünya pazarına sunmaktadırlar (25).

Bu cihazlarla solunum havasından alkol tayini yapılmaktadır. Sonuçlar kandaki alkol miktarına göre kalibre edilmektedir. Kinetik olarak ortalama “solunum havası alkol düzeyi/kan alkol düzeyi” oranı, literatüre göre değişmekle birlikte 1/2100 olarak bildirilmiştir. Bu cihazlar kan alkol konsantrasyonunu 100 ml kanda mg cinsinden göstermektedir (20).

Bu yöntem ileri düzeyde bir eğitim gerektirmemesi, kullanılan cihazın taşınabilir olmasından ve hızlıca sonuç vermesinden dolayı emniyet güçleri tarafından sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak solunum havası alkol düzeyi/kan alkol düzeyi arasındaki ilişkinin kesin olarak bilinmemesi ve edinsel sebeplerden etkilenmesinden dolayı bu yöntem sadece tarama amaçlı olarak kullanılmaktadır. Kesin sonuç için kan numunesi analizi gerekmektedir.

2.7.4. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi toksikolojik analizlerde kullanılan temel yöntemlerden biridir. İlk defa 1906 yılında bir Rus botanikçi olan Tswett tarafından bitkilerin renk verici bileşenlerin ayrılmasında kullanılmıştır. Molekül ağırlığı yüksek olan maddeleri özellikle de proteinleri ayırmak amacıyla kullanılmaktadır. Kromatografi teknikleri, hareketli fazın türüne, ayrılmayı sağlayan kuvvetlere ve cihazlara göre sınıflandırılmaktadır (26).

2.7.5. Sıvı Kromatografi Teknikleri

Partisyon Kromatografisi

Bir maddenin birden fazla sıvıdaki konsantrasyonunun birbirine oranı partisyon katsayısı olarak tanımlanmaktadır. Partisyon kromatografisi ise bu partisyon katsayısı esas alan bir yöntemdir. Her madde için farklı olan bu değerler ayrı ayrı toplanarak karışım oluşturulmaktadır (27,28).

Adsorpsiyon Kromatografisi

Bir maddenin, yüzeyindeki gerilimi azaltmak için, aynı ortamdaki başka bir maddeyi yüzeyine çekmesine adsorpsiyon denilmektedir. Bu çekim gücü olan katı maddeler adsorban olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntem ile bir takım adsorban ve çözücü maddeler kullanılarak analizler yapılmaktadır (27,28).

İyon Değişirme Kromatografisi

Çözeltideki aynı yükteki iyonlar ile kullanılan iyon değiştirici maddedeki iyonlar arasında dengeli bir yer değiştirmesi ile farklı iyon yüklü maddeler arasında ayırım yapılabildiği yöntemdir (27,28).

Jel Filtrasyon Kromatografisi

Moleküllerin büyüklük ve ağırlığına bağlı ayrılma temeline dayanan tekniktir. Bu yöntemde jeldeki porlara girebilecek moleküllerin porlara tutunabildiği, giremeyecek moleküllerin ise porlara tutunamadığı görülmektedir (27,28).

2.7.6. Gaz Kromatografi Teknikleri

Gaz kromatografisi, gaz fazında bulunan veya gaz fazına geçebilen karışımları ayırmaya ve ayrılan bileşenlerin miktarlarını belirlemeye yarayan bir analitik tekniktir. Hareketli ve durgun faz olarak iki kısmı vardır. Hareketli fazda inert bir gaz, durgun fazda ise genellikle cam ya da metal bir kolona doldurulmuş bir katı madde veya adsorplama gücü olmayan toz bir madde üzerindeki bir sıvı madde kullanılır. Durgun fazda kullanılan madde katı ise gaz-katı, sıvı ise sıvı-katı kromatografisi olarak adlandırılır.

Enjektör ile kolona verilen gaz halindeki maddeler taşıyıcı gaz ile detektöre taşınmaktadır. Dedektöre alınan madde sinyal aracılığıyla elektrometreye iletilir. Kolonu terk edene kadarki geçen süre boyunca konsantrasyonunu gösteren pikler kontrol ekranına yansıtılmakta ve tüm bu geçen süreye alıkonma zamanı denilmektedir.

Gaz kromatografisi, dedektör türüne göre çok küçük madde miktarlarını bile tespit edebilme özelliğine sahiptir. Kompleks bileşenleri ayırabilmedeki hızlılığı ve duyarlılığı önemli özelliklerindedir (29).

Taşıyıcı Gaz

Bileşenin kolon boyunca taşınmasını sağlayan bu gaz için genellikle helyum, hidrojen veya azot gazları kullanılmaktadır. Helyum ile daha hızlı sonuçlar alınırken, azot helyuma göre daha yavaş sonuç vermektedir. Ancak daha ucuzdur.

Sabit Faz

Sabit faz, kapiller kolonun iç duvarında ya da dolgulu kolonlardaki katı destekleyici partiküllerin yüzeyinde ince film tabakası halinde bulunmaktadır. İdeal sabit faz düşük uçuculuk limitleri nedeniyle yüksek molekül ağırlıklı ve viskoz olmalıdır. Sıklıkla kullanılan sabit faz sıvıları polisiloksanlardır. Polar bileşikler için yüksek seçicilik sağlamalarından dolayı sık kullanılmaktadırlar.

Dedektör

Birden fazla dedektör çeşidi vardır. Genellikle, üstün hassasiyeti ve kararlılığından dolayı alev iyonlaştırıcı dedektörler kullanılmaktadırlar. Kolondan çıkan analitin yakılmasından dolayı karbon ve hidrojen bağları iyonize olmaktadır. İyonize haldeki analitler ise elektrotlara çarparak sinyal üretmektedir. Ayrıca kütle hassasiyetli dedektörler ise birim zamanda dedektöre giren kütle prensibine bağlı çalışırken, konsantrasyon hassasiyetli dedektörler ise analitin konsantrasyonu ölçerek çalışmaktadırlar (30).

Numune Zenginleştirme Teknikleri

Az miktarda maddeleri konsantre etmek için numune zenginleştirme teknikleri kullanılmaktadır. Soğuk tuzaklama, katı faz mikroekstraksiyon ve headspace bu yöntemlerdendir (31).

Headspace (HS)

Sıvı ve katı örneklerdeki bileşenlerin hızlı bir şekilde tespit edebilmek için kullanılmaktadır. Raoult kanununa göre kapalı bir sistemde sıvı ve gaz faz arasında termodinamik denge mevcuttur. Kapalı bir kaptaki ve sabit sıcaklıkta uçucu maddenin sıvı ve gaz fazındaki dağılım oranı sabit olduğundan, enjeksiyon numunenin gaz fazından alınması esasına göre yapılmaktadır. İçinde gaz bulunduran sıvı ya da katı örnek cam vial içine yerleştirildikten sonra iki faz arasında termodinamik bir denge oluşuncaya kadar ısıtılmaktadır (Şekil 2.7) (32).

Etil alkolün kan konsantrasyonlarına bağlı olarak ortaya çıkan merkezi sinir sistemine etkileri;

10-50 (mg/dl) → Düşüncede açıklık, kendine güven, atılganlık, konuşkanlık, iyimserlik

50-100 (mg/dl) → Serebellar ve motor hareketlerde hafif bozulma, yüksek komplike iradeli fonksiyonlarda bozulma, fazla konuşma, gülme, hafif duygusallaşma

100-150 (mg/dl) → Hareketlerde uyumsuzluk; konuşma, yürüme bozukluğu, huzursuzluk

150-200 (mg/dl) → Belirgin sarhoşluk, amaca yönelik koordine hareketlerin belirgin olarak yapılamaması, ataksiler, mide bulantısı

200-300 (mg/dl) → Retiküler aktive edici sistem hareketlerinde bozulma, kusma, baş dönmesi, kan basıncında düşme, solunumda bozulma, konfüzyon-amnezi, uzun horlamalı uyku dönemi, komaya yakın tablo

300-350 (mg/dl) → Kusmaya bağlı aspirasyon tehlikesi, stupor, koma

350 (mg/dl) + → Yüzeysel ve düzensiz solunum; kalp atımı alınamayan kan basıncında ileri derecede düşme; solunum depresyonuna bağlı olarak yavaş yavaş gelişen ölüm.

Nadirde olsa, kan alkol değerleri 500 mg/dl üzerinde olduğu halde ayakta kalan, herhangi bir yaşamsal tehlike geçirmeyen kişilerde mevcuttur. Kronik alkoliklerde 1000 mg/dl kan alkol değerlerini geçtiği halde kurtulan olgular vardır (8,16).

Kan alkol düzeyi 50 mg/dl düzeyine kadar alkol alımlarında motor hareketlerde, kara verme yetisinde ve reflekslerde belirgin etkilenme görülmediği için dünya üzerindeki birçok ülkede araba kullanımı için bu düzey sınır olarak görülmektedir. Avustralya, Kanada, Hollanda, İtalya, İsviçre, Almanya, Güney Afrika, Amerika'nın çoğu eyaleti ve Türkiye bu ülkelerden bazılarıdır.

2.10. Ülkemizde Trafikte Alkollü Araç Kullanımı veya Denetimi ile İlgili Düzenlemeler

2.10.1. Karayolları Trafik Kanunu

Trafikte alkollü araç kullanımı Karayolları Trafik Kanunu'nun Alkollü İçki, Uyuşturucu veya Keyif Verici Maddelerin Etkisi Altında Araç Sürme Yasağı" başlığı altında trafikte alkollü araç kullanımı ile ilgili düzenlemeler yapılmıştır.

"Hususi otomobil sürücüleri bakımından 0,50 promilin, diğer araç sürücüleri bakımından 0,20 promilin üzerinde alkollü olan sürücülerin trafik kazasına sebebiyet vermesi hâlinde, ayrıca Türk Ceza Kanunu'nun ilgili hükümleri uygulanır." (36) .

Kişinin yaralanmalı veya ölümlü ya da maddi hasarlı trafik kazasına karışması hâlinde, muayeneye tabi tutulması zorunlu tutulmuştur. Karayolları Trafik Yönetmeliği'nde (Md. 97/f) "teknik cihazla yapılan ölçüm sonucuna itiraz edilmesi durumunda tekrar ölçüm yapılmaz, yapılan işlemlere itiraz 30/3/2005 tarihli ve 5326 sayılı Kabahatler Kanununun 27. maddesi kapsamında ilgili mahkemelere yapılır." denilmektedir. Bu da solunum havasında alkolmetre ile alkol tespitinin ikinci defa yapılmasını engellemektedir. Ancak mahkemelere yapılan itiraz sonucunda, kandaki alkol miktarının belirlenmesi için, bu konuda eğitilmiş ve kan almaya yetkili kılınmış personel tarafından kan alınarak, tahlil için polis kriminal laboratuvarına gönderileceği, polis kriminal laboratuvarlarında tahlilin mümkün olmaması halinde, sürücü kandaki alkol miktarının tespiti için adli tip merkezlerine ve Sağlık Bakanlığına bağlı tahlil yapılabilecek teknik ve tıbbi imkanlara sahip olan en yakın sağlık kuruluşlarına gönderileceği, kandaki alkol miktarının teknik cihazla ve kan alınarak laboratuvarında tespit imkânlarının bulunmadığı hallerde, alkollü olarak araç kullandığı tespit edilen sürücülerin en yakın resmi sağlık kuruluşuna sevk edilerek, bu kurum hekimi tarafından rutin alkol muayenesinden geçirileceği belirtilmiştir.

2.10.2. Türk Ceza Kanunu

Türk ceza kanununda alkol ile ilgili düzenlemeler iradi olmayan sebeplerle alkol alımı, alkol bağımlılığı ve trafik güvenliğini tehlikeye sokma suçu şeklinde 3 konunun içinde yer almaktadır.

Madde 34- "Geçici bir nedenle ya da irade dışı alınan alkol veya uyuşturucu madde etkisiyle, işlediği fiilin hukukî anlam ve sonuçlarını algılayamayan veya bu fiille ilgili olarak davranışlarını yönlendirme yeteneği önemli derecede azalmış olan

kişiyeye ceza verilmez. İradî olarak alınan alkol veya uyuşturucu madde etkisinde suç işleyen kişi hakkında birinci fıkra hükmü uygulanmaz.”

Madde 57- “Suç işleyen alkol ya da uyuşturucu veya uyarıcı madde bağımlısı kişilerin, güvenlik tedbiri olarak, alkol ya da uyuşturucu veya uyarıcı madde bağımlılarına özgü sağlık kuruluşunda tedavi altına alınmasına karar verilir. Bu kişilerin tedavisi, alkol ya da uyuşturucu veya uyarıcı madde bağımlılığından kurtulmalarına kadar devam eder. Bu kişiler, yerleştirildiği kurumun sağlık kurulunca bu yönde düzenlenecek rapor üzerine mahkeme veya hâkim kararıyla serbest bırakılabilir.”

Madde 179- Trafik Güvenliğini Tehlikeye Sokma Suçu. “Alkol veya uyuşturucu madde etkisiyle ya da başka bir nedenle emniyetli bir şekilde araç sevk ve idare edemeyecek hâlde olmasına rağmen araç kullanan kişi yukarıdaki fıkra (iki yıla kadar hapis cezası ile cezalandırılmasına ilişkin fıkra) hükmüne göre (bir aydan iki yıla kadar) cezalandırılır.” hükümleri yer almaktadır (37).

2.10.3. Türk Medeni Kanunu

Türk Medeni Kanununun 406, 409, 432, 436 ve 475. maddelerinde alkol bağımlısı kişilerin fiili ehliyetleri sağlık kurulu raporu dikkate alınarak hâkim tarafından kısıtlanacağı, kişisel korunmasının başka şekilde sağlanamaması hâlinde, tedavisi, eğitimi ve ıslahı için elverişli bir kuruma yerleştirileceği yönünde hükümler yer almaktadır (34).

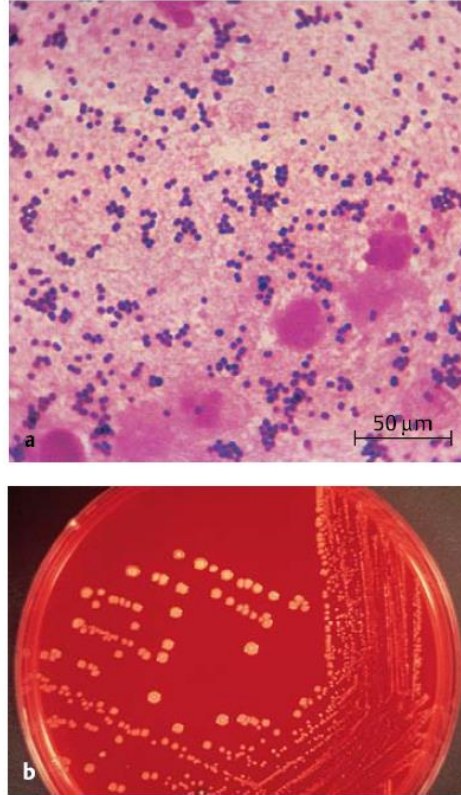
2.11. Kan Alımı Esnasında Kontaminasyona Neden Olabilen Bakteriler

Kan alımı esnasında görevli personelin gerekli özeni göstermemesi ile kan numuneleri çeşitli bakteriler ile kontamine olabilmektedir. Özellikle de kişilerin floralarında bulunan flora bakterileri bunda önemli bir yer teşkil etmektedir. Bu bakteriler içinde deri floramızda bulunan Stafilokokkus epidermidis, burun floramızda bulunan Stafilokokkus aureus ve ürogenital floramızda bulunan Escherichia coli bakterileri sterilite kurallarına uyulmadığı zamanda kan numunelerini kolayca kontamine edebilecek bakterilerden bazılarıdır. Çalışmamızda da gram pozitif bakterilerin en önemli üyesi Stafilokokkus aureus, Koagüloz Negatif Stafilokoklar içinde en önemli yeri teşkil eden Stafilokokkus epidermidis ve gram negatif bakterilerin en önde gelenlerinden Escherichia coli tercih edilmiştir. Bu üç bakteride fermentasyon yaparak kan glikozundan etil alkol üretmektedirler.

2.11.1. Stafilococcus Aureusun Genel Özellikleri

Stafilokoklar 1878 yılında Robert Koch tarafından tarif edilmiş 0,5-1,5 µm çapında, yuvarlak, tüm hücreleri uniform, sporsuz ve hareketsiz gram pozitif koklardır. Hücreler, tetradlar ve kısa zincirler şeklinde görülebilmelerine rağmen genel olarak üzüm salkımına benzeyen kümeler oluştururlar (38).

Stafilokoklar Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'sinde Firmicutes şubesinin, Bacilli sınıfının, Bacillales takımındaki Staphylococcaceae ailesi içinde sınıflandırılmıştır (39). Günümüzde Staphylococcus ailesi içerisinde 35 tür tespit edilmiştir. Stafilococcus aureus bütün stafilokoklar içerisindeki en önemli insan patojeni olarak izole edilmektedir (40).



Şekil 2.8. Gram pozitif kokların mikroskop altında görünüm (a) ve kanlı agar kültüründe sarımsı koloni oluşturmasına ait görüntü (b) (41)

Stafilokokkus aureus yetişkinlerde %20-40 oranında burun taşıyıcılığının yanı sıra; deri katlantı bölgeleri, perine, aksilla ve vajende kolonize halde bulunmaktadır. Normal insan florasının bir parçasıdır. Bağışıklığın düştüğü durumlarda önemli

oportunistik enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Bu gibi durumlarda lokal cilt enfeksiyonlarından mortal sonuçlar verebilen sistemik enfeksiyonlara kadar birçok hastalığa neden olabilmektedir (42).

Stafilokoklar glikozu fermantatif olarak parçalayarak son ürün olarak laktik asit ve etil alkol oluştururlar. Glikozun haricinde laktoz, sükröz, mannoz ve maltozu da fermente edebilirler (43).

2.11.2. Stafilokokkus Epidermidisin Genel Özellikleri

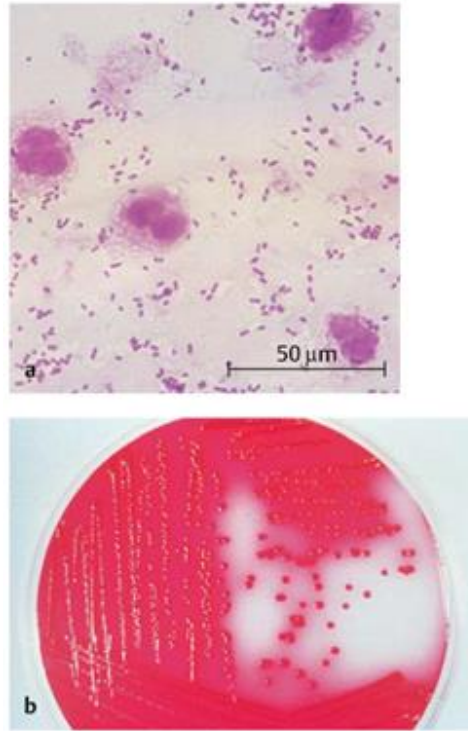
Stafilokok ailesi içerisinde en patojen tür olarak *S. aureus* yer almaktadır. *S. aureus* haricindeki tüm stafilokok türleri ise genel olarak Koagüloz Negatif Stafilokoklar (KNS) ismi altında geçmektedir. KNS'lar içerisinde ise klinik örneklerden sıklıkla izole edilen tür bir deri flora üyesi olan *Stafilokokkus epidermidis*'tir (41).

Katalaz pozitif, koagülaz negatif, aerobik solunum veya fermantasyon yapabilen fakültatif bir anaerob bakteridir.

S.epidermidis başı çekmek üzere KNS'lar son yıllarda hastane enfeksiyonlarının önemli etkenleridir. Bu durumun nedeni normal flora bakterileri olmaları ve girişimsel işlemleri kolayca kontamine edebilmeleridir. İnsanlarda en fazla patojen olan tür *S.epidermidis*'dir. KNS'ların enfeksiyonlarının çoğu kateter, protez gibi tıbbi aletler ile ilişkilidir. *S.epidermidis* enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu ise hastane kökenlidir (44).

2.11.3. Escherichia Colinin Genel Özellikleri

Escherichia coli sindirim sistemimizde bulunan fakültatif anaerob bir bakteridir. Enterobacteriaceae familyasının en sık izole edilen patojenidir (45). Boyu yaklaşık olarak 2-6 µm, eni 1-1,5 µm olan ve bakteriyolojik boyalarla iyi boyanan gram negatif bakterilerdir. Ayrıca glikozu fermante eden basillerdir (46). Çoğunlukla bakteri ve konak yıllar boyunca kommensal biçimde hayatlarını sürdürmektedirler. Fakat kommensal *Escherichia coli*'ler dışında patojenik formlar da kolonizasyon oluşturabilmekte ve enfeksiyonlara neden olabilmektedir (47).



Şekil 2.9. Üriner sistem enfeksiyonu yapmış gram negatif basillerin mikroskop altında görünümü (a) ve endoagarda kırmızı renkli koloni oluşturmaya ait görüntü (b) (41)

Üriner sistem enfeksiyonlarının %70-%90'ında izole edilen etkendirler. Ayrıca hastane enfeksiyonu olgularının ortalama %40'ı *Escherichia coli* ile ilişkilidir (48).

2.12. Kan Muhafazası İçin Kullanılan Tüpler

Kan alımı sırasında alınma amacına göre farklı renk kapaklara sahip tüpler kullanılmaktadır. Bu kapak renkleri içinde bulunan koruyucu madde türlerine göre evrensel olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda gri kapaklı ve mor kapaklı kan tüpleri kullanılmıştır.

2.12.1. Mor Kapaklı Kan Tüpü

Kan alma merkezlerinde en çok kullanılan kan tüpleridir. Tam kan sayımı, karaciğer fonksiyon parametreleri, böbrek fonksiyon parametreleri, kan elektrolitleri gibi değerlerinin ölçümü için bu tüp kullanılmaktadır. Bu tüplerde antikoagülan etkili Etilendiamintetra-asetat (EDTA) bulunur. EDTA, trombosit aktivasyonu ve

agregasyonu için gerekli olan kalsiyum iyonuna bağlanarak kanın pıhtılaşmasını inhibe eder.

2.12.2. Gri Kapaklı Kan Tüpü

Gri kapaklı kan tüplerinin içerisinde sodyum florür (NaF) bulunur. NaF glikoliz enzimlerinden biri olan enolazı inhibe ederek etki gösterir. Kan glikoz analizi veya etanol analizi yapılacağı zaman kullanılır. Bu tüpler ayrıca pıhtılaşmayı önlemek için potasyum oksalat ya da EDTA ihtiva ederler.

MATERYAL VE METOD

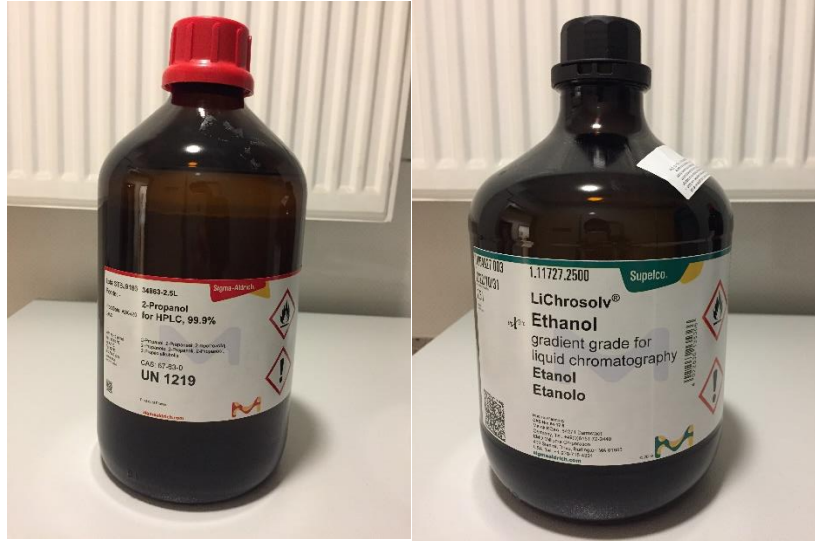
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Tez çalışması süresince kan numuneleri ve bakteri türleri “BD Vacutainer” marka içerisinde K₂EDTA(7,2mg) bulunan mor kapaklı ve “BD Vacutainer” marka içerisinde NaF (6,0mg) ile Na₂EDTA (12,0mg) bulunan gri kapaklı kan tüplerine alınmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 3.1. BD Vacutainer marka mor ve gri kapaklı kan tüpleri

Numunelerdeki istenilen kan alkol seviyesini elde etmek için “Sigma Aldrich” marka %99,9 saflıkta etanol ve internal standart olarak “Sigma Aldrich” marka %99,9 saflıkta 2-Propanol kullanılmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 3.2. Sigma Aldrich marka %99,9 saflıkta etanol ve 2-Propanol

İstenilen hacimde kan, bakteri solüsyonu ve alkol seviyesi elde edilmesi için Brand “Transferpette S Ayarlanabilir Otomatik Pipet” kullanılmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 3.3. Brand Transferpette S Ayarlanabilir Otomatik Pipet

İçerisinde kan, etanol ve bakteri bulunan numunelerin homojenize edilmesi için “VWR” marka vorteks (karıştırıcı) kullanılmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 3.4. VWR marka vorteks (karıştırıcı)

Numunelerin istenilen standart sıcaklık altında tutulması için 120 litre hacimli “Microtest® MIT 120” iklimlendirme kabini kullanılmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 3.5. “Microtest® MIT 120” iklimlendirme kabini

Çalışmada kan etanol seviyesinin analizi için Isolab marka 20 ml hacimli klemppli headspace viali kullanılmıştır (Şekil4.6).



Şekil 3.6. Isolab marka 20 ml hacimli klemppli headspace viali

Etanol konsantrasyonunun analizi için Agilent marka 7694E seri numaralı Headspace örnekleyici ve Agilent marka 7890B serili GC cihazı kullanılmıştır (Şekil 4.7). HS-GC analitik sistemi ile ilgili özellikler ve çalışma koşulları Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Agilent marka 7694E seri numaralı HS örnekleyici ve Agilent marka 7890B serili GC cihazı

Tablo 3.1. Agilent 7890b GC Parametreleri

GİRİŞ		
Sıcaklık	250°C	
Basınç	11,615psi	
Toplam akış	57,6 mL/dk	
Duvar temizleme akışı	3 mL/dk	
Gaz koruma	Kapalı	
Mod	Split	
Bölünme oranı	20: 1 52 mL/dk	
KOLON		
	Back detector FID	Front detector FID
Akış	2,6 mL/dk	2,6397 mL/dk
Basınç	11,615psi	11,615psi
Ortalama hız	40,41 cm/sn	40,717 cm/sn
Bekleme süresi	1,2373 dk	1,228 dk
Akış tipi	Sürekli	
Çalışma sonrası	0,0019342 mL/dk	0,012703 mL/dk
FIRIN		
Fırın açılış sıcaklığı	40°C	
Dengeleme süresi	0,5 dk	
Maksimum fırın sıcaklığı	260°C	
Çalıştırma sonrası	50°C	
Çalıştırma sonrası süre	0 dk	
DEDEKTÖR		
	Arka dedektör FID	Ön dedektör FID
Isıtıcı	260°C	26 °C
H₂ akış	30 mL/dk	30 mL/dk
Hava akımı	300 mL/dk	300 mL/dk

Parlaklık	Açık	Açık
Düzen akışı: (He)	20 mL/dk	-

Tablo 3.2. Agilent 7694e Headspace Parametreleri

Vial sıcaklığı	70°C
Döngü sıcaklığı	80°C
Transfer hattı	90°C
GC döngü zamanı	25 dk
Vial dengeleme süresi	15 dk
Basınç uygulama süresi	20 dk
Döngü doldurma süresi	0,2 dk
Döngü dengeleme süresi	0,05 dk
Enjeksiyon süresi	1 dk

3.2. Çalışma Protokolü ve Yöntem

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı'na bağlı olan Adli Toksikoloji Laboratuvarı'nda 2021 yılında gerçekleştirilmiştir.

Çalışma için gerekli olan kan tüpleri ve kimyasal solüsyonlar İnterlab Laboratuvar San. A.Ş.'den ve HS-GC valfi Sem Laboratuvar Cihazları Paz. San. ve Tic. A.Ş.'den Hacettepe Üniversite Bilimsel Araştırma Projeleri desteğiyle satın alınmıştır. Kan numunesi Hacettepe Üniversite Hastanesi Kan Alma Merkezi tarafından gönüllü sağlıklı bir yetişkinden içinde antikoagülan etkisi olup kan alkol konsantrasyonuna etkisi olmayan Citrate-phosphate-dextrose adenine (CPD-A) solüsyonu bulunan kan torbasına alınıp bize teslim edilmiştir. Kullanılan bakteri solüsyonları Hacettepe Üniversite Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir.

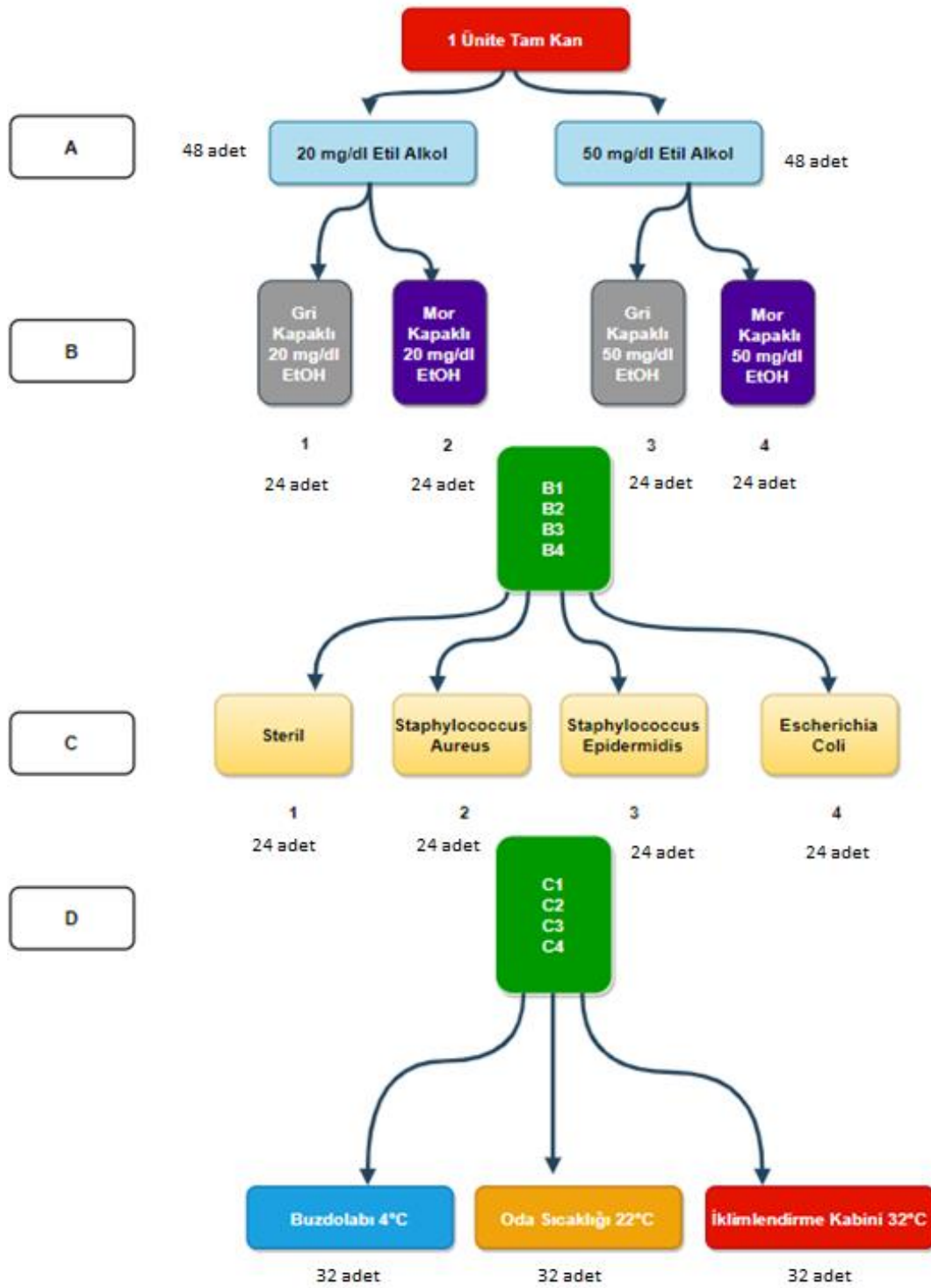
Gönüllü sağlıklı bir yetişkinden Kan Merkezi aracılığı ile temin edilen 1 ünite (400ml) tam kan numunesi 48 adet EDTA (Etilendiamintetra-asetat) içeren mor kapaklı ve 48 adet NaF (Sodyum florür) içeren gri kapaklı tüplere dolduruldu. Sonrasında kan tüplerini yarısına son etil alkol düzeyi 20 mg/dL ve diğer yarısına son etil alkol düzeyi 50 mg/dL olacak şekilde saf etil alkol ilave edildi. Sonrasında,

öncesinde etiketlenmiş olan bu tüplere son derişimi 10^6 CFU/ml olacak şekilde ayrı ayrı *Staphylococcus epidermidis* (24 adet), *Staphylococcus aureus* (24 adet), *Escherichia coli* (24 adet) bakterileri eklenmiştir. Yirmi dört tüpe ise herhangi bir bakteri eklenmedi. Elde edilen içindeki kan etil alkol seviyeleri, bakteri çeşit ve derişimleri bilinen kan numuneleri 3 farklı (4, 22 ve 32°C) sıcaklık altında ve 1, 3, 7, 14, 28. günlerde analiz edilmek üzere muhafaza edilmiştir. Deney süresinde farklı bakterileri içeren ve farklı ortam şartlarında saklanan numunelerin tekrarlı analizleri için tek tüp kullanılmasından dolayı, her analiz öncesinde kan tüpünün kapağı açılıp kapatılmıştır. Toplam olarak 28 gün boyunca kan tüpleri 5 defa açılıp kapatılmıştır.

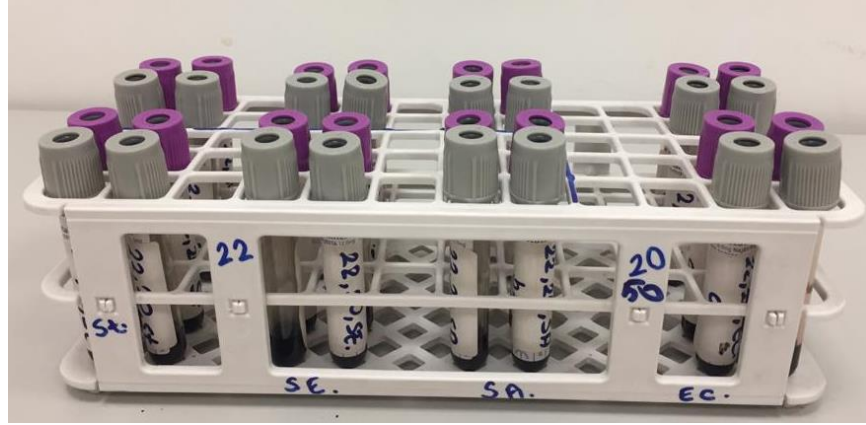
Buzdolabının 4°C'lik bölümüne termometre yerleştirildi ve her gün düzenli olarak sıcaklığı ölçüldü. 22°C, ortalama oda sıcaklığı olarak kabul edilmiştir (49). Sabah ve akşam düzenli olarak oda sıcaklığı ölçülerek ve günlük ortalama sıcaklık alınarak oluşturulmaya çalışılmıştır (28 gün boyunca en düşük sıcaklık 16,9°C, en yüksek sıcaklık 25,8°C, ortalama sıcaklık 21,8°C). 32°C ise iklimlendirme kabini kullanılarak elde edilmiştir. Belirlenen sıcaklıklarda ve sürelerde muhafaza edilen numuneler, planlanan analiz günü geldiğinde buzdolabı/iklimlendirme kabininden çıkarılarak analiz için hazırlanmıştır. Etiketli kan tüpleri çalışılmadan önce homojenize hale getirmek için vortekslenmiştir. Sonrasında içerisinden 0,4 mL kan örneği alınarak headspace viallerine konulmuş ve üzerine internal standart olarak kullanılan 0,1mL n-propanol eklenmiştir. Akabinde ağzı parafin ile hava almayacak şekilde sıkıca kapatılarak ve 3 dakika boyunca tekrar vorteks üzerine konularak homojen hale getirilmiştir.

Hazırlanan numunelerin etanol düzeyleri HS-GC cihazında analiz edilmiş ve Microsoft Excel programı üzerinden kaydedilmiştir. Yapılan analiz sonrasında ölçülen değerler, ilk etil alkol konsantrasyonları ile karşılaştırılarak ve farklı bakteri türleri içeren farklı ortam koşullarının kan alkol stabilitesi üzerine etkisi ortaya konulmuştur.

Çalışmamız, Hacettepe Üniversite Etik Komisyonu'nun 22 Eylül 2020 tarihinde yapmış olduğu toplantıda incelenmiş ve 16969557-1457 sayılı karar onayı ile etik açıdan uygun bulunmuştur. Ayrıca Hacettepe Üniversite Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 11 Aralık 2020 tarihli ve 2020/30 toplantı numaralı proje onayı ile desteklenmeye uygun bulunmuştur.



Şekil 3.8. Deney prosedürünün şematik görüntüsü



Şekil 3.9. Kan tüplerinin deney sürecince spordaki görüntüsü

3.3. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler IBM SPSS sürüm 23 programı kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler sürekli değişkenler için ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir. Etil alkol konsantrasyon düzeyinin zaman içinde değişimini etkileyen faktörleri bulmak için tekrarlı ölçümlerde iç içe çok etkenli deney tasarımı oluşturulmuştur ve bu tasarıma uygun varyans çözümlemesi sonuçları verilmiştir. Tekrarlı ölçümlerde iç içe çok etkenli deney tasarımı varyans çözümlemesi çoklu karşılaştırma sonuçları Bonferroni düzeltmesi yapılarak incelenmiştir. Bütün testlerde anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak alınmıştır.

BULGULAR

Yirmi dört adet gri ve 24 adet mor kapaklı kan tüpünden 5 ayrı zamanda toplamda 480 adet vial hazırlanmış ve HS-GC cihazında çalışılmıştır. Her kan numunesi iki kere çalışılmış ve 4 sonuç elde edilmiştir. Elde edilen veriler Excel programı üzerinden mg/dl cinsinden kayıt altına alınmıştır.

4°C’de muhafaza edilen içerisine derişimi 20 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenmiş numunelerin 5 ayrı zamandaki ortalama etil alkol değeri 25,72 mg/dl bulunmuştur. İçerisine derişimi 50 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenmiş numunelerin ise 5 ayrı zamandaki ortalama etil alkol değeri 46,63 mg/dl bulunmuştur.

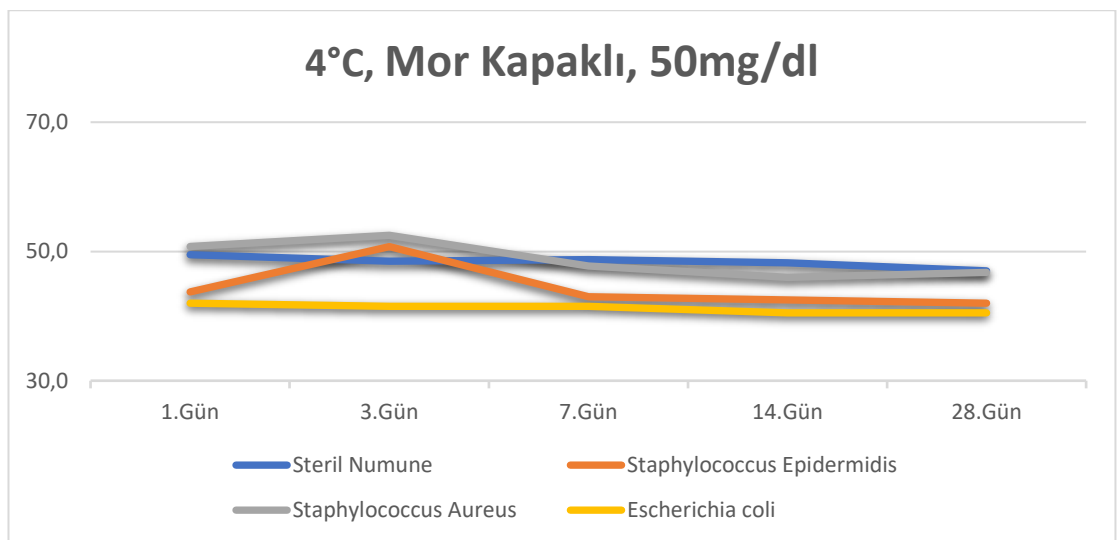
22°C’de muhafaza edilen içerisine derişimi 20 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenmiş numunelerin 5 ayrı zamandaki ortalama etil alkol değeri 24,16 mg/dl bulunmuştur. İçerisine derişimi 50 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenmiş numunelerin ise 5 ayrı zamandaki ortalama etil alkol değeri 55,69 mg/dl bulunmuştur.

32°C’de muhafaza edilen içerisine derişimi 20 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenmiş numunelerin 5 ayrı zamandaki ortalama etil alkol değeri 26,56 mg/dl bulunmuştur. İçerisine derişimi 50 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenmiş numunelerin ise 5 ayrı zamandaki ortalama etil alkol değeri 61,69 mg/dl bulunmuştur.

İçerisine derişimi 20 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin ilk alkol analizinde saptanan en küçük değeri 22 mg/dl, en yüksek değeri 31 mg/dl olarak tespit edilmiştir. İçerisine derişimi 50 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin ilk alkol analizinde saptanan en küçük değeri 43 mg/dl, en yüksek değeri 70 mg/dl olarak tespit edilmiştir. Alkol konsantrasyonlarında bu şekilde bir aralık olmasının sebebi ise 20 mg/dl ve 50 mg/dl derişimlerini elde etmek için kan numunelerine 0,76 µl ve 1,9 µl gibi çok küçük hacimlerde saf etil alkolün konulmasıdır. Bu kadar küçük hacimlerde çalışıldığı için mikropipet ve standardize el kaynaklı küçük hatalar oluşmuştur. Ancak araştırmamızda kan alkol değerlerinin oransal olarak anlamlı değışiklikleri önem arz ettiğinde dolayı çalışmamız için bir problem teşkil etmemiştir.

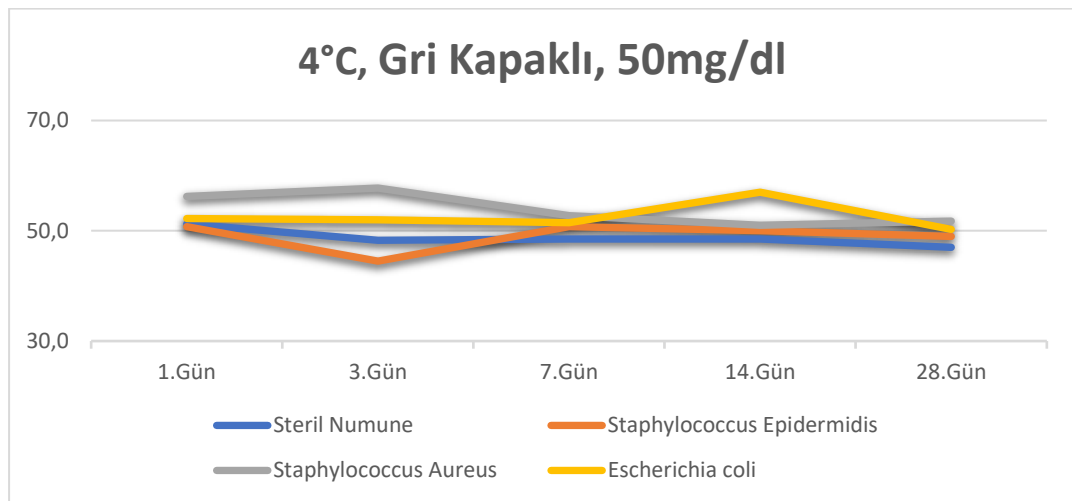
Farklı koruyucu madde içeren, farklı sıcaklıklarda saklanan ve farklı bakteri türleri ekilen tüplerdeki kan etil alkol düzeyi değışimi anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$).

Gri ve mor kapaklı tüplere alınan, içerisine farklı bakteriler eklenen ve 3 ayrı sıcaklık altında muhafaza edilen numunelerin 1-28. günler arasındaki kan etil alkol düzeyindeki değışimleri grafikler halinde aşağıda verilmiştir (Şekil 4.1-4.12).



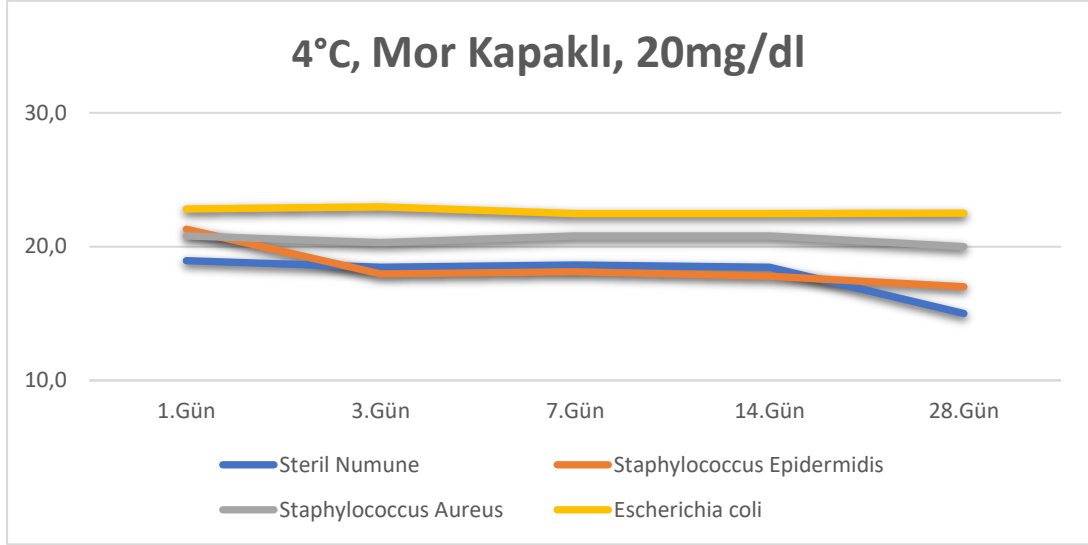
Şekil 4.1. 4°C’de mor kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine derişimi 50 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği

4°C’de mor kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine 50 mg/dl etil alkol eklenen steril numunelerde 28 gün boyunca kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p>0,05$). Stafilokokkus epidermidis ekilen numunelerde ise 1. gün ile 3. gün arasında anlamlı bir değişiklik saptanmamış ($p>0,05$) ancak 3. gün ile 7. gün arasında kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir azalma olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Ayrıca 7. günden sonra da anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p>0,05$). Stafilokokkus aureus ve Escherichia coli ekilen numunelerde ise 28 gün boyunca kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p>0,05$). (Şekil 4.1)



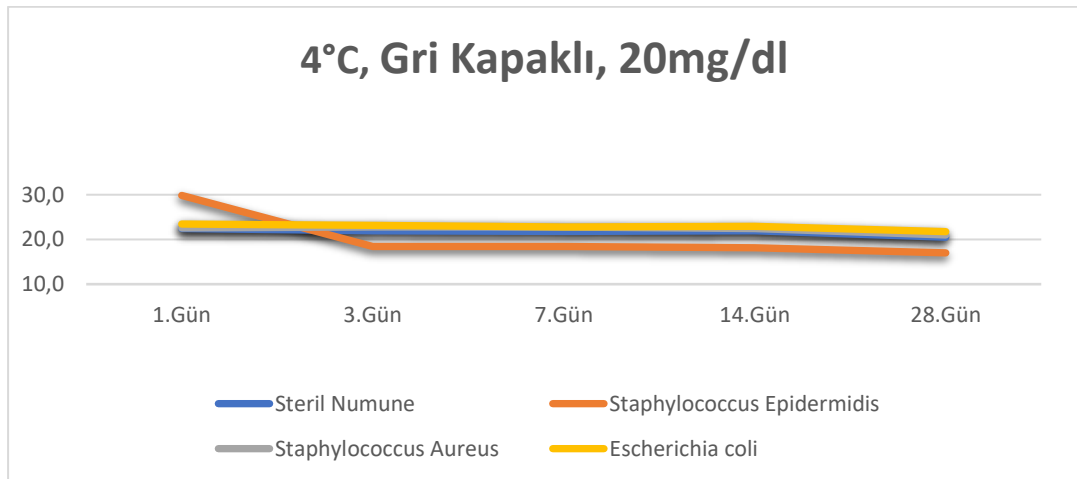
Şekil 4.2. 4°C’de gri kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine derişim 50 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği

4°C’de gri kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine 50 mg/dl etil alkol eklenen steril numunelerde, Stafilokokkus epidermidis, Stafilokokkus aureus ve Escherichia coli ekilen numunelerde 28 gün boyunca kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p>0,05$). (Şekil 4.2)



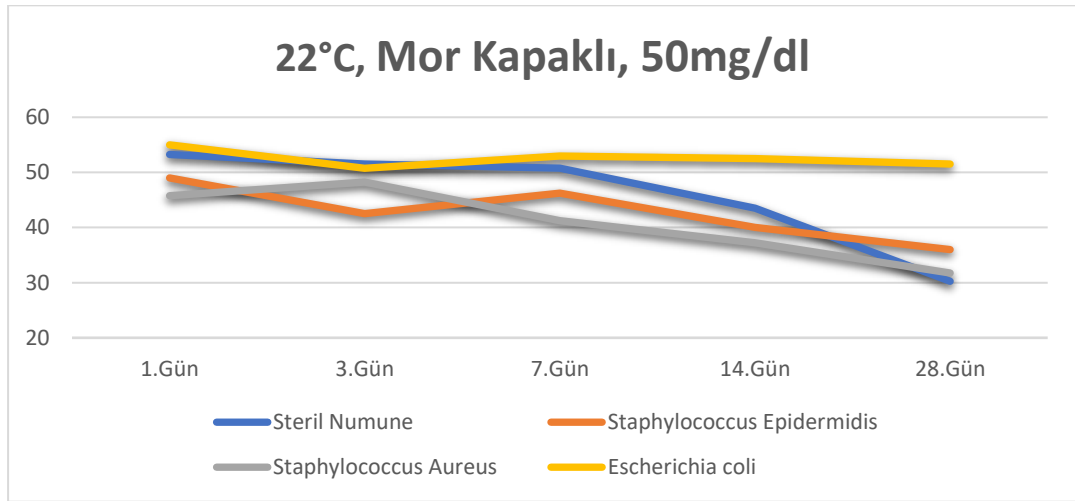
Şekil 4.3. 4°C’de mor kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine derişimi 20 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği

4°C’de mor kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine 20 mg/dl etil alkol eklenen steril numunelerde, Stafilokokkus epidermidis, Stafilokokkus aureus ve Escherichia coli ekilen numunelerde 28 gün boyunca kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p>0,05$). (Şekil 4.3)



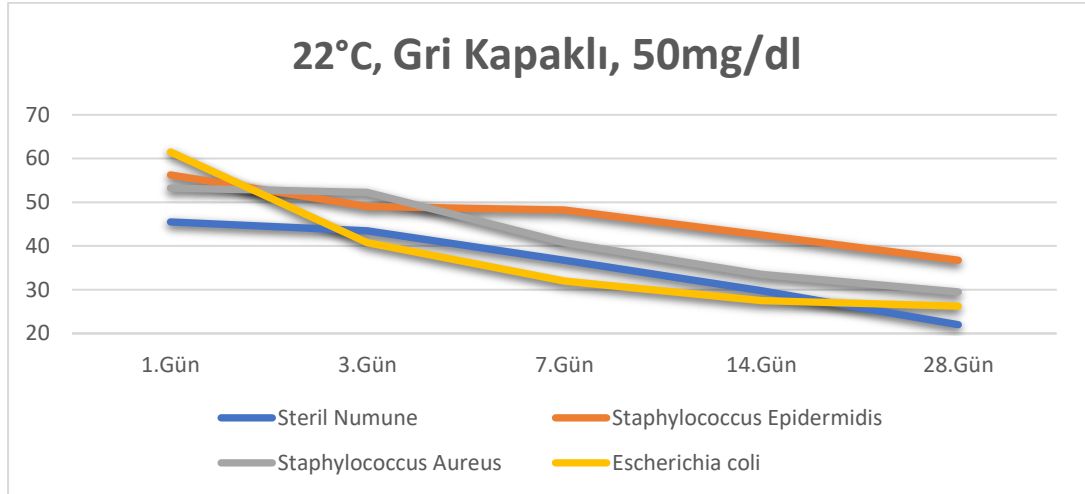
Şekil 4.4. 4°C’de gri kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine derişimi 20 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği

4°C’de gri kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisinde 20 mg/dl etil alkol eklenen steril numunelerde 28 gün boyunca kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p>0,05$). Stafilokokkus epidermidis ekilen numunelerde ise ilk 3 günde kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,01$). Stafilokokkus aureus ve Escherichia coli ekilen numunelerde ise 28 gün boyunca kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p>0,05$).



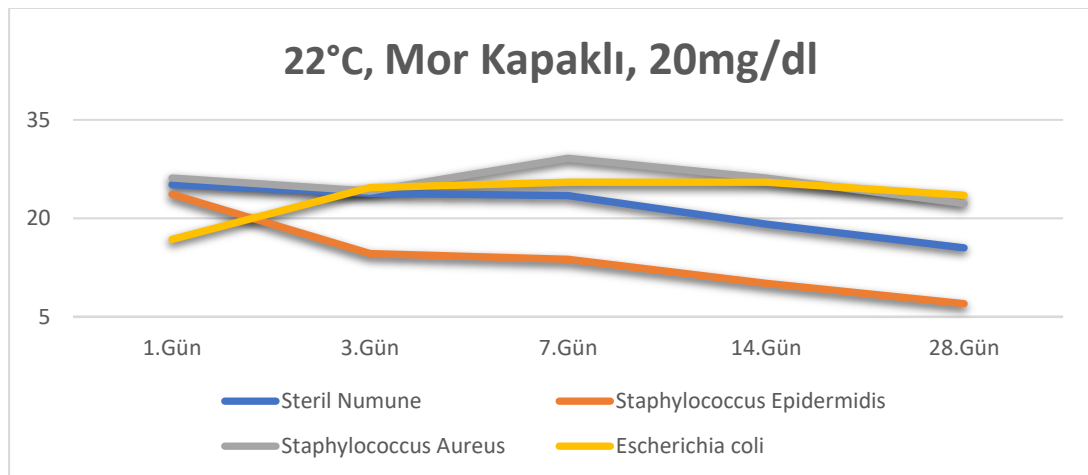
Şekil 4.5. 22°C’de mor kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisinde derişimi 50 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği

22°C’de mor kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisinde 50 mg/dl etil alkol eklenen steril numunelerde 7. günden itibaren kan etil alkol düzeyinin anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,01$). Stafilokokkus epidermidis ekilen numunelerde de 7. günden itibaren kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,01$). Stafilokokkus aureus ekilen numunelerde ise 14. günden itibaren kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,05$). Escherichia coli ekilen numunelerde ise ilk 3 günde kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,01$). (Şekil 4.5)



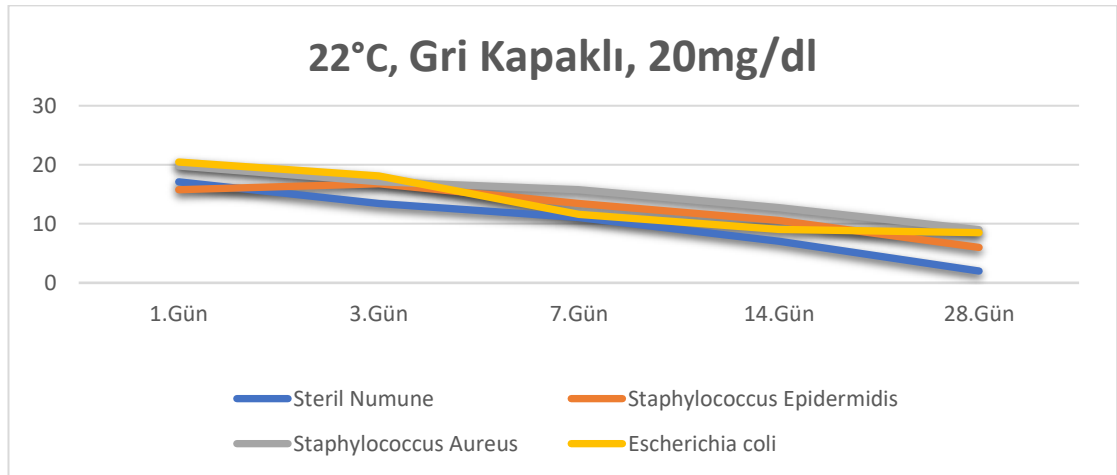
Şekil 4.6. 22°C’de gri kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine derişimi 50 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği

22°C’de gri kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine 50 mg/dl etil alkol eklenen steril numunelerde 3. günden itibaren kan etil alkol düzeyinin anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,01$). Stafilokokkus epidermidis ekilen numunelerde ise 7. günden itibaren kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,01$). Stafilokokkus aureus ekilen numunelerde ise 3. günden itibaren kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,01$). Escherichia coli ekilen numunelerde ise ilk 7 günde kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,01$). (Şekil 4.6)



Şekil 4.7. 22°C’de mor kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine derişimi 20 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği

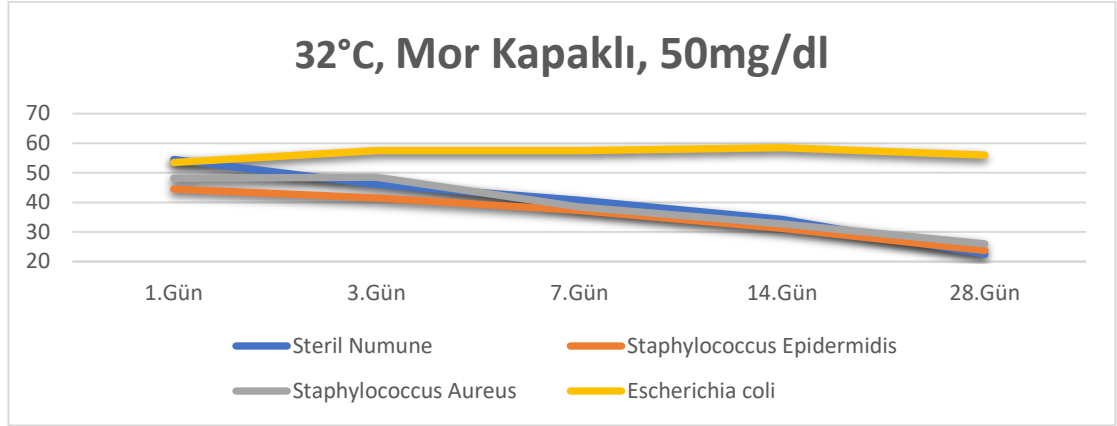
22°C’de mor kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine 20 mg/dl etil alkol eklenen steril numunelerde 28. gün kan etil alkol düzeyinin ilk 7 güne göre anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,01$). Stafilokokkus epidermidis ekilen numunelerde ise 1. günden itibaren kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,01$). Stafilokokkus aureus ekilen numunelerde ise 28 gün boyunca kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p>0,05$). Escherichia coli ekilen numunelerde ise ilk 3 günde kadar kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir artış saptanmıştır ($p<0,05$). (Şekil 4.7)



Şekil 4.8. 22°C’de gri kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine derişimi 20 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği

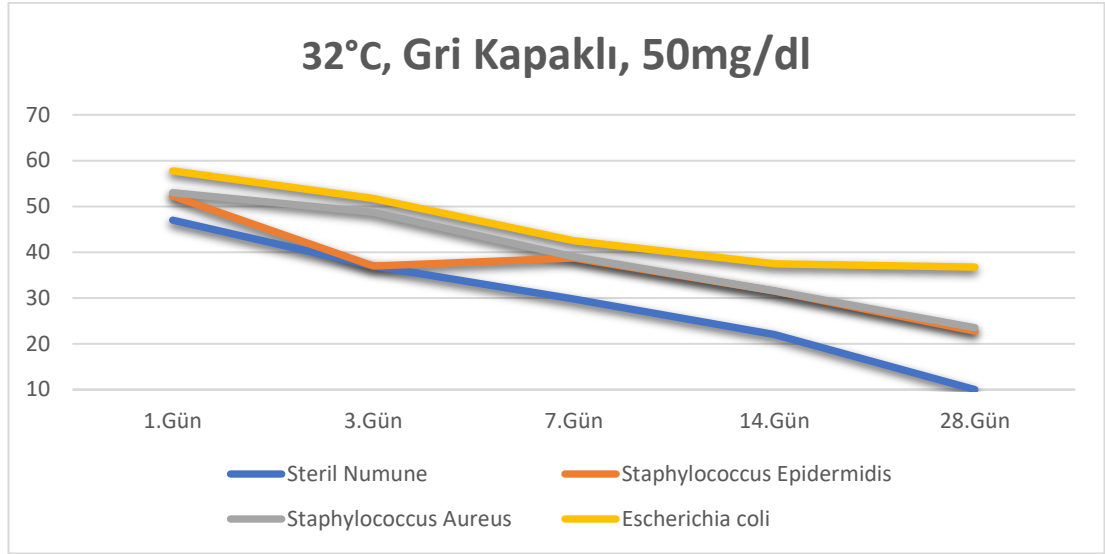
22°C’de gri kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine 20 mg/dl etil alkol eklenen steril numunelerde 28 gün boyunca kan etil alkol düzeyinin anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,01$). Stafilokokkus epidermidis ekilen numunelerde ise 3. gün ile 14. gün arasında kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,01$). Stafilokokkus aureus ekilen numunelerde ise 28. günde ilk 7 güne göre kan

etil alkol düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,01$). Escherichia coli ekilen numunelerde ise 3. günden itibaren kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,05$). (Şekil 4.8)



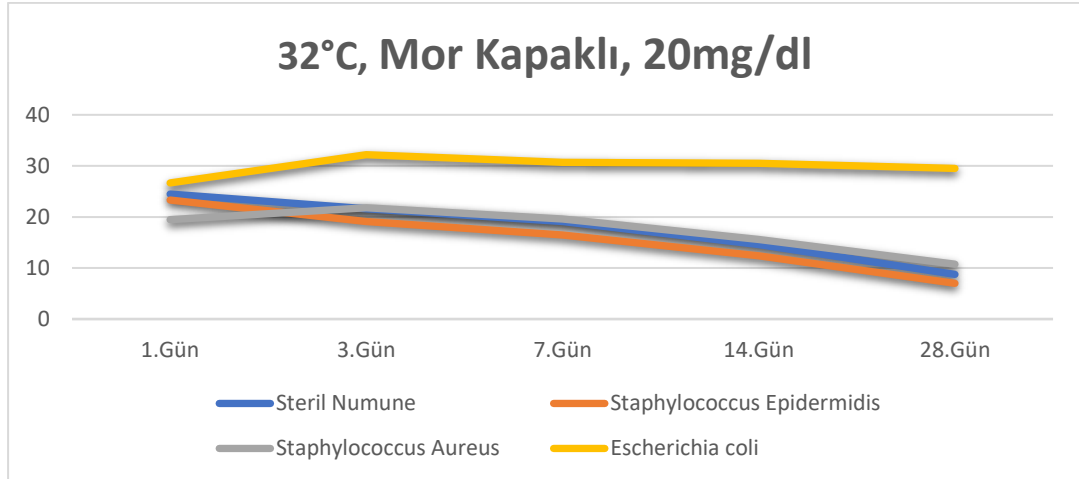
Şekil 4.9. 32°C’de mor kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine derişimi 50 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği

32°C’de mor kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine 50 mg/dl etil alkol eklenen steril numunelerde 1. günden itibaren etil alkol düzeyinin anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$). Stafilokokkus epidermidis ekilen numunelerde ise 14. günden itibaren kan etil alkol düzeyinin anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,01$). Stafilokokkus aureus ekilen numunelerde ise 7. günden itibaren kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,01$). Escherichia coli ekilen numunelerde ise 28 gün boyunca kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p>0,05$). (Şekil 4.9)



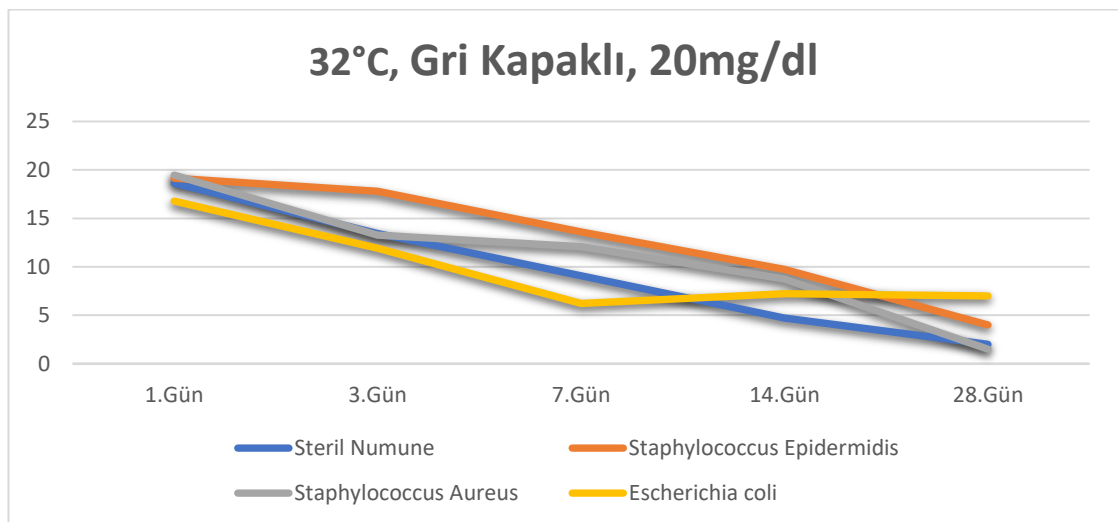
Şekil 4.10. 32°C’de gri kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine derişimi 50 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği

32°C’de gri kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine 50 mg/dl etil alkol eklenen steril numunelerde 1. günden itibaren kan etil alkol düzeyinin anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,01$). Stafilokokkus epidermidis ekilen numunelerde ise 3-7. günler arası hariç olmak üzere 28 gün boyunca kan etil alkol düzeyinin anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,01$). Stafilokokkus aureus ekilen numunelerde 3. günden itibaren kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,01$). Escherichia coli ekilen numunelerde ise 3. günden itibaren kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,01$). (Şekil 4.10)



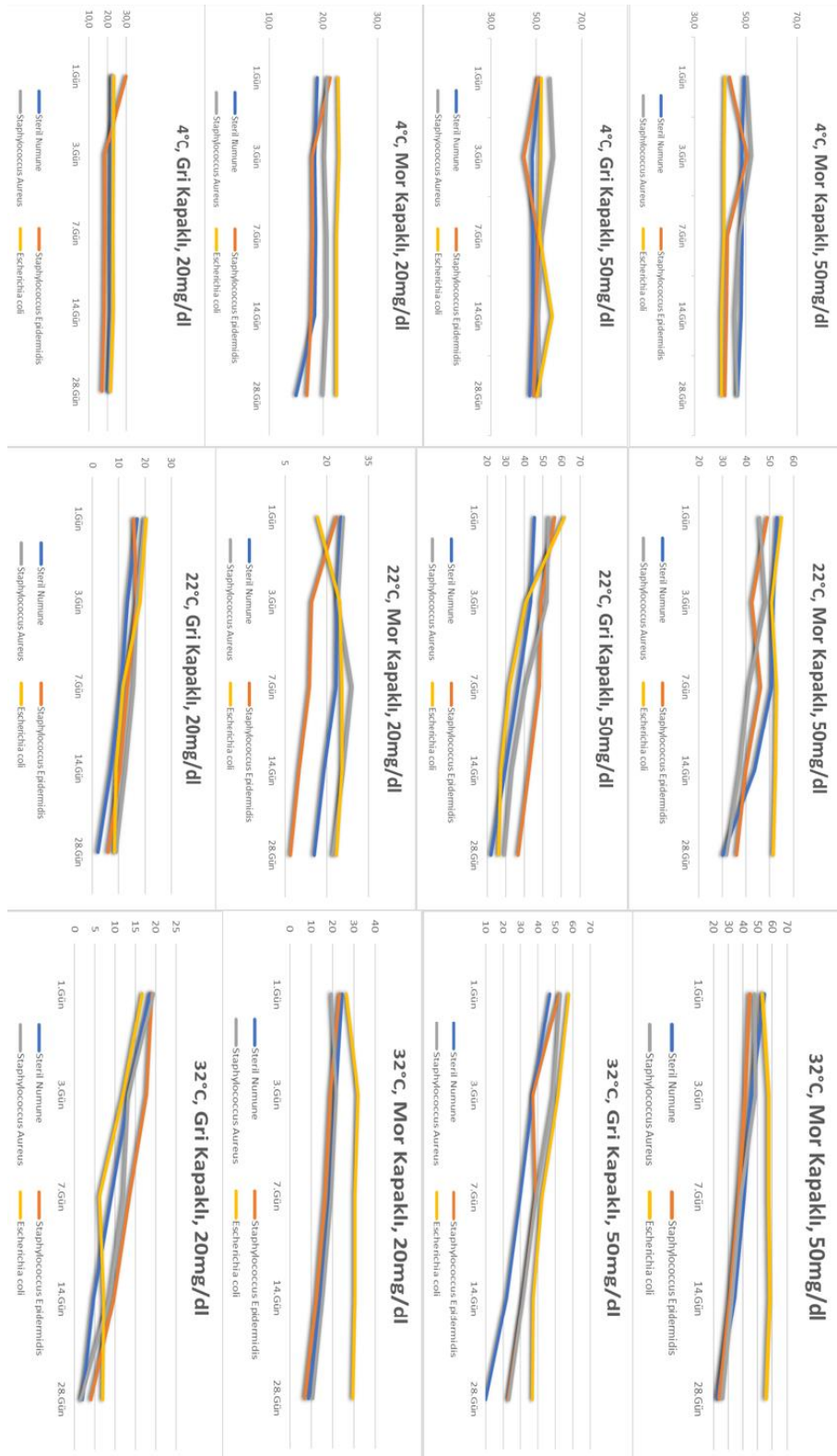
Şekil 4.11. 32°C’de mor kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine derişimi 20 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği

32°C’de mor kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine 20 mg/dl etil alkol eklenen steril numunelerde 14. günden itibaren kan etil alkol düzeyinin anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$). Stafilokokkus epidermidis ekilen numunelerde ise 14. günden itibaren kan etil alkol düzeyinin anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,05$). Stafilokokkus aureus ekilen numunelerde ise 28. günde kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,05$). Escherichia coli ekilen numunelerde ise kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır ($p>0,05$). (Şekil 4.11)



Şekil 4.12. 32°C’de gri kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine derişimi 20 mg/dl olacak şekilde etil alkol eklenen numunelerin zamana göre etil alkol düzeyi değişimi grafiği

32°C’de gri kapaklı tüpte muhafaza edilen ve içerisine 20 mg/dl etil alkol eklenen steril numunelerde 7. günden itibaren kan etil alkol düzeyinin anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,01$). Stafilokokkus epidermidis ekilen numunelerde ise 28. gündeki kan etil alkol düzeyinin ilk 14 güne göre anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır ($p<0,01$). Stafilokokkus aureus ekilen numunelerde 14. günden itibaren kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,01$). Escherichia coli ekilen numunelerde ise ilk 7 günde kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p<0,01$). (Şekil 4.12)



Şekil 4.13. Tüm deney numunelerinin zamana göre etil alkol düzeyi değişim grafikleri

Excel programı üzerinden sonuçların ortalaması alınarak çizilen grafikler üzerinden karşılaştırma yapıldığı zaman 22°C ve 32°C’de aynı bakteri türlerini ve aynı derişimde alkol içeren numunelerde, NaF bulunanlarda bulunmayanlara göre kan alkol düzeyinin daha fazla azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca sıcaklık artışıyla beraber kan alkol düzeyindeki azalmanın arttığı değerlendirilmiştir (Şekil 4.13).

TARTIŞMA

Alkol çok uzun yıllardır birçok toplumda kullanılan bağımlılık yapma etkisi olan bir maddedir. Alkol etkisi altındayken adli olayların meydana gelmesinin arttığı bilinmektedir (15). Özellikle de adli olaylarda kişinin alkol etkisi altında olup olmadığının doğru tespiti önem teşkil etmektedir. Adli toksikoloji bilim dalı bu konu üzerine uzun mesailer harcamaktadır. Kan numunelerin alınması ve kan alkol analizi için tıbbi laboratuvar incelemelerinin belirli bir standardizasyon içinde yapabilmemesi için Sağlık Bakanlığı tarafından güncel bir genelge yayınlanmıştır (1). Kan alımı esnasında söz konusu genelgeye ve standartlara uyulmaması halinde kan numuneleri mikroorganizmalar ile kontamine olabilmektedir. Diğer taraftan kan numuneleri her zaman doğru sıcaklıklarda ya da saklama koşullarında muhafaza edilmeyebilmektedir. İş yoğunluğu ve lojistik sebeplerden dolayı numunelerin analiz edilebilmesi için uzun süreler geçebilmektedir. Bu durumların sonucunda kan etil alkol düzeyinde bir değişiklik olup olmadığının araştırılmasına yönelik deneyler yapılması ihtiyacı doğmaktadır.

Yapılan çalışmalarda kan etanol düzeyinin ortam sıcaklığı, saklama süresi, koruyucu madde içerip içermemesi, tüpün içinde bulunan hava boşluğu ve tüpün kapağının açılıp açılmaması gibi değişkenlerden etkilendiği görülmüştür (50). Ayrıca bakteri ile kontamine olmuş kan numunelerinde bakterilerin fermantasyon sonucu kan etanol düzeyini arttırabildikleri tespit edilmiştir (51).

Kapalı kan tüplerindeki etil alkol seviyesindeki azalma için en kabul görmüş teori kan numunelerinde oksihemoglobinin non-enzimatik mekanizma ile etanolü asetaldehite dönüştürmesidir (52). Bu reaksiyonun oksihemoglobinin methemoglobine dönüşmesine katkı sağlayan sodyum azid eklenmesi halinde engellendiği görülmüştür (53).

Rutin uygulamada kan tüplerinin kapaklarının analiz için sık sık açılması ya da uzun süre açık vaziyette bırakılması evaporasyon ile kan etil alkol seviyesinin azalmasına neden olacağı da bilinmektedir.

Jones ve arkadaşları tarafından 2016 yılında yapılan bir çalışmada 4°C'de 2, 7, 14, 28, 91,182 ve 364 gün muhafaza edilen kan örnekleri etanol konsantrasyonlarının stabilitesi açısından incelenmiş ve 14-28. günden sonra etanol konsantrasyonlarında düşüşler gözlemlenmiştir (50). Tiscione ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı bir çalışmada ise, 110 tane şahit kan numunesi 5,4-10,3 yılları arasında muhafaza edildikten sonra etanol düzeyleri analiz edilmiş ve ilk kan etanol konsantrasyonları ile karşılaştırılmıştır. Etanol düzeyi negatif olan 7 numunede etanol düzeyinin saklama sonrasında da negatif olduğu, etanolü pozitif olan numunelerde ise etanol seviyesinde anlamlı azalma olduğu gösterilmiştir. Kapağı açılmayan ve yarısından fazlası kanla dolu tüplerde ise azalmanın diğer tüplere nazaran anlamlı olarak daha az olduğu değerlendirilmiştir (54). Zamengo ve arkadaşları tarafından 2019 yılında yapılan bir diğer çalışmada ise, kan bankasından alınan tam kan örneklerine koruyucu ve antikoagülan olarak sodyum florit, potasyum oksalat ve son konsantrasyon 0-0,5 g/L arasında olacak şekilde saf etanol eklenmiştir. 4°C ve -20°C'de muhafaza edilen numunelerin etanol seviyeleri belirlenmek ve varsa farklılıkları tespit edilmek üzere analiz edilmiştir. 20 günlük bir süre boyunca dondurulmuş veya soğutulmuş numunelerde kandaki etanol konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gösterilmiştir (55). Çalışmamızda da Zamengo ve arkadaşlarını destekleyecek şekilde, 4°C'de muhafaza edilen steril numunelerde, NaF bulunsun ya da bulunmasın, ilk kan etanol konsantrasyonundan bağımsız olarak 28 gün boyunca kan alkol konsantrasyonunda anlamlı bir değişiklik olmadığı değerlendirilmiştir. Deney sürecinin 28 gün gibi kısmen kısa bir zaman aralığı kapsamasından dolayı Jones ve arkadaşları tarafından tespit edilen 14-28. günden sonraki etanol konsantrasyonlarındaki azalma ya da Tiscione ve arkadaşları tarafından tespit edilen 5,4-10,3 yılları arasındaki azalma ise tarafımızca değerlendirilememiştir. Ayrıca deneyimiz sürecinde standart seviyeye kadar doldurulmuş tek tip tüp kullanıldığı için Tiscione ve arkadaşları tarafından tespit edilen tüp doluluk oranı ile kan alkol konsantrasyonundaki azalma arasındaki ilişki değerlendirilememiştir.

Laurens ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptıkları bir çalışmada ise, NaF'lı ve NaF'sız tüplerde *Candida albicans* içeren ve içermeyen olarak 0,2 ve 0,5 g/L etanol konsantrasyonu içeren kan örneklerini hazırlamış ve 4°C ve 22°C'de 29 hafta muhafaza ederek haftada bir etanol konsantrasyonu ölçümü gerçekleştirmişlerdir. Numuneler NaF'lı tüp içerisinde olsun veya olmasın, bakteri üremesi olsun veya olmasın etanol konsantrasyonlarında zaman içerisinde artış olmadığını, aksine azalma eğilimi gösterdiğini saptamışlardır (56). Çalışmamızda da NaF içersin ya da içermesin, 0,2 veya 0,5 g/L etanol konsantrasyonu içeren *Stafilokokkus epidermidis*, ya da *Stafilokokkus aureus* bulunan tüplerde 28 gün boyunca kan alkol konsantrasyonunda bir artış olmadığı özellikle 7. günden itibaren azalma eğiliminde olduğu değerlendirilmiştir.

Yajima ve arkadaşları tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada ise, içerisinde glikoz ve *Candida albicans* eklenen gönüllü 4 kişiden alınan kanlar 24°C'de muhafaza edilmiş ve 2,4,8,12. günlerde etanol düzeyleri analiz edilmiştir. Kan etanol düzeyinin NaF içermeyen tüplerde özellikle ilk 4 günde arttığını sonrasında azaldığını, NaF eklenen numunelerde ise kan etanol düzeyinin zamanla azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca etanol seviyesi artarken glikoz seviyesinin azaldığını göstermişlerdir (57). Çalışmamızda da NaF içermeyen, 20 mg/dl etil alkol bulunan ve 22°C'de muhafaza edilen *Escherichia coli* içeren numunelerde ilk 3 günde kan alkol konsantrasyonunda artış saptanmıştır. Bu da *Candida albicans* mayasının ve *Escherichia coli* bakterisinin uygun sıcaklık ve ortam şartlarında fermantasyon yaparak kan glikozundan etil alkol ürettiğini göstermektedir.

Yaman ve arkadaşları tarafından 2009 yılında deney hayvanları ile yapılan bir tez çalışmasında ise, deneklerin bir kısmı diyabetik hale getirilmiş bir kısmı da sağlıklı kontrol grubu olarak ayrılmıştır. Sağlıklı olanların kan numuneleri NaF içersin ya da içermesin oda sıcaklığında saklansa bile ilk 96 saatte kan etil alkol düzeyinde anlamlı bir değişiklik olmadığı saptanmıştır. Diyabetik (kan glikozu yüksek) olan deney grubunda ise oda sıcaklığında bekletilen, NaF içeren tüplere alınan kan örneklerinin %30'unda 48 saat sonra, NaF içermeyen tüplere alınan kan örneklerinin %70'inde 72 saat sonra etil alkol oluştuğu gözlenmiştir. Diyabet grubunda yer alan kan örnekleri, NaF içersin ya da içermesin buzdolabında bekletildiğinde ise 96 saat sonra etil alkol oluşmadığı saptanmıştır (58). Çalışmamızda kan glikoz seviyesi tespit edilemediği için

kan glikozu ile alkol konsantrasyonu arasında ilişki değerlendirilememiştir. Ancak 22°C’de muhafaza edilen *Escherichia coli* içeren numunelerde ilk 3 günde kan alkol konsantrasyonunda artış olması ve 4°C’de buzdolabında muhafaza edilen numunelerde kan alkol konsantrasyonunda bir değişiklik olmaması Yaman ve arkadaşlarını desteklemektedir. Bu da 4°C gibi düşük sıcaklıklarda fermantasyon mekanizmasının durduğunu ya da belirgin etki oluşturmayacak düzeyde azaldığını düşündürmektedir.

Shan ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada ise, 25 kan örneği 6 ay süreyle farklı sıcaklıklarda muhafaza edilmiştir. Etanol negatif olan 7 örnek oda sıcaklığı ya da 38°C’de saklansa bile kan etil alkol düzeyinin negatif kaldığı saptanmıştır. Kan etil alkolü pozitif saptanan ve 38°C saklanan numunelerde 7. günün sonunda anlamlı bir değişiklik olmadığı ancak 28. gün ve 6. ayın sonunda kan etanol düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir (59). Çalışmamızda da 32°C’de muhafaza edilen, ilk etanol konsantrasyonu 50 mg/dl olan ve NaF içermeyen numunelerde, *Stafilokokkus Epidermidis* içerenlerde 14. günden itibaren, *Stafilokokkus Aureus* içerenlerde 7. günden itibaren ve steril numunelerde ise 1. günden itibaren kan etanol konsantrasyonlarında azalma saptanmıştır. *Escherichia coli* içeren numunelerde ise 28 gün boyunca kan alkol konsantrasyonunda azalma saptanmamıştır. Azalma olmaması fermantasyon sonucu artan etanol konsantrasyonu ile non-enzimatik oksidasyon ve evaporasyonla azalan kan etanol konsantrasyonunda bir dengede olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca *Escherichia coli* bulunan ve NaF içeren benzer numunelerde ise kan etanol düzeyinin azalma göstermesi NaF’ün fermantasyonu engellediğini desteklemektedir.

Kocak ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yapılan bir çalışmada ise, plazma etanol düzeylerinin ölçümü için toplam 80 numune 2,3,4 ve 5. aylarda çalışılmak üzere -20°C saklanmıştır. Beşinci ayda çalışılan numuneler haricinde diğer numunelerde anlamlı bir değişiklik olmadığı gösterilmiş ve -20°C saklanan plazma örneklerinin en geç 3-4. aylarda çalışılması gerektiği tavsiye edilmiştir (60). Vance ve arkadaşları tarafından 2015 yılında yapılan bir çalışmada ise, 34 etanol negatif ve 21 etanol pozitif kan numuneleri alınmış, etanol negatif numuneleri ortalama 18°C oda sıcaklığında, etanol pozitif olanları ise buzdolabında ve oda sıcaklığında muhafaza ederek 0-60. günler arasında analiz edilmiştir. Deney sonucunda saklama koşullarından bağımsız

olarak etanol negatif olan numunelerde etanole rastlanmamış ve etanol pozitif numunelerde ise zamanla etanol düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir ve antemortem mikrobiyal etanol oluşumunun olası olmadığı hipotezini desteklemişlerdir (61). Çalışmamızda da Vance ve arkadaşlarını destekleyecek şekilde 22°C muhafaza edilen *Stafilokokkus Epidermidis* veya *Stafilokokkus Aureus* içeren ya da steril numunelerde kan alkol konsantrasyonunda 28. günde 1. güne göre azalma olduğu değerlendirilmiştir. Bu da zaman içinde kan etil alkolünün non-enzimatik oksidasyon mekanizması ve evaporasyonla azaldığını göstermektedir.

Boumba ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları bir çalışmada ise, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sporogenes*, *Enterococcus faecalis* bakteri türlerini kan tüplerine ekmiş ve 25°C'de 30 gün boyunca etanol, 1-propanol, 1-butanol, isobutanol, metil-bütanol seviyelerini tespit etmişlerdir. Sonuç olarak bakterinin türünün, kan glikoz seviyesinin ve ortam şartlarının kandaki etanol üretimini açıkça etkilediği değerlendirilmiştir (62). Çalışmamızda da Boumba ve arkadaşlarını destekler şekilde *Stafilokokkus epidermidis*, *Stafilokokkus aureus* veya *Escherichia coli* ekilen numunelerde, kan alkol konsantrasyonundaki değişimin steril numunelere göre farklı olduğu ve bakteri türleri ile ortam şartlarının kandaki etanol konsantrasyonunu açıkça etkilediği değerlendirilmiştir.

Çalışmamız sonucunda; 4°C'de muhafaza edilen numunelerde farklı bakteriler bulunsun ya da bulunmasın, NaF bulunsun ya da bulunmasın, ilk kan etanol konsantrasyonundan bağımsız olarak 28 gün boyunca kan etanol seviyesinde artış olmadığı ancak *Stafilokokkus epidermidis* içeren bazı tüplerde özellikle ilk 3 günde etanol seviyesinin düşme eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Bu da düşük sıcaklıkta non-enzimatik oksidasyon mekanizmasının inaktive olması ile kan etanol seviyesinin azalmayıp sabit kalma eğiliminde olduğu savını desteklemektedir.

22°C'de muhafaza edilen ve ilk etanol konsantrasyonları 50 mg/dl olan numunelerde içerisinde NaF olsun ya da olmasın, bakteri türlerinden bağımsız olarak, kan etanol seviyesinin özellikle de 7. günden itibaren azalma eğilimine girdiği değerlendirilmiştir. İlk etanol konsantrasyonu 20 mg/dl olan ve içerisine *Escherichia coli* bakterisi ekilen NaF içermeyen numunelerde ise ilk 3 günde kan etanol düzeyinde anlamlı bir artış olduğu değerlendirilmiştir. Bunun da *Escherichia coli* bakterisinin fermantasyon yoluyla etanol üretmesi ile meydana geldiği değerlendirilmiştir. Ancak

çalışmamızda kan glikoz düzeyleri analiz edilemediği için etanol üretimi ile glikoz seviyesi arasındaki ilişki değerlendirilememiştir. Ayrıca etanol seviyesindeki artışın sadece 20 mg/dl olan numunelerde görülmesi, fermantasyonun kan etanol miktarından da etkilendiğini göstermektedir. *Stafilokokkus epidermidis* veya *Stafilokokkus aureus* içeren numuneler ile steril numunelerde ise kan etanol seviyesi ve koruyucu madde içeriğinden bağımsız olarak özellikle 7. günden itibaren kan etanol seviyesinin azalma eğiliminde olduğu değerlendirilmiştir. Bu da sıcaklık artışıyla beraber non-enzimatik oksidasyon mekanizmasının aktive olması ile etanolün asetaldehite metabolize olması ile açıklanabilmektedir. Ayrıca analiz yapılabilmesi için her seferinde kan tüplerinin açılıp kapatılması da evaporasyon ile kan etanol seviyesinin azalmasına etki etmiştir.

32°C’de muhafaza edilen, ilk etanol konsantrasyonu 50 mg/dl olan, NaF içermeyen numuneler ve *Escherichia coli* bakterisi ekilen numunelerde 28 gün boyunca kan etanol düzeyinde anlamlı bir değişiklik olmazken, *Stafilokokkus epidermidis* içeren numunelerde 14. günden itibaren, *Stafilokokkus aureus* içeren numunelerde 7. günden itibaren ve steril numunelerde ise 1. günden itibaren kan etanol konsantrasyonlarında anlamlı azalma saptanmıştır. *Stafilokokkus epidermidis*, *Stafilokokkus aureus* içeren ve steril numunelerde kan etanol konsantrasyonu azalırken *Escherichia coli* içeren numunelerde ise azalma olmamasının nedeni olarak fermantasyon sonucu artan etanol konsantrasyonu ile non-enzimatik oksidasyon ve evaporasyonla azalan kan etanol konsantrasyonunda bir denge olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca *Escherichia coli* bulunan ve NaF içeren benzer numunelerde ise kan etanol düzeyinin azalma göstermesi NaF’ün fermantasyonu engellediğini göstermektedir. Benzer şekilde ilk kan etanol konsantrasyonu 20mg/dl olan *Escherichia coli* bakterisi ekilen numunelerde de 28 gün boyunca kan etanol düzeyinde anlamlı bir değişiklik olmazken diğer numunelerdeki etanol seviyesi azalma eğilimi göstermektedir.

Çalışmamızda sıcaklık artışıyla birlikte kan etanol düzeylerindeki azalmanın anlamlı olarak arttığı görülmüştür. 32°C’de muhafaza edilen benzer özelliklere sahip numunelerdeki etanol düzeyindeki azalmanın 22°C’de muhafaza edilen benzer numunelerden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu da sıcaklık artışının non-enzimatik etanol metabolizmasını hızlandırdığını göstermektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak görülmektedir ki 4°C’de muhafaza edilen kan numunelerinde bakteriler ile kontamine olsun ya da olmasın, içerisinde NaF bulunan tüplere alınsın ya da alınmasın, kan etil alkol düzeyleri uzunca bir süre sabit olarak kalmaktadır.

Ortam sıcaklığının arttığı durumlarda özellikle Escherichia coli bakterisi ile kontamine olmuş numunelerde kan alkol konsantrasyonunun ilk günlerde artma sonrasında ise azalma ya da sabit kalma eğiliminde olması, gecikmiş analizlerde objektif sonuçlar ortaya koymayı zorlaştırmaktadır. Diğer bakteriler ile kontamine olmuş ya da steril numunelerde ise sıcaklığın arttığı (22 ve 32°C) durumlarda kan etanol konsantrasyonunda azalma eğilimi olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ortam sıcaklığının arttığı durumlarda kan etanol düzeyindeki azalmanın da arttığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda tespit edilen bulgular doğrultusunda, kan etil alkol düzeyi analiz edilen vakalarda bakteriyel kontaminasyon iddiası var ise; numunelerdeki muhtemel bakteri türünün tespitinin yapılması gerektiği, bu numuneler Escherichia coli ile kontamine ise kan etil alkol sonucunun güvenilirmez olduğu, tıbbi ve hukuki yorum yapılmasından kaçınılması gerektiği, ancak Staphylococcus Aureus veya Staphylococcus Epidermidis ile kontamine ise kan etil alkol sonucunun güvenilir olduğu, tıbbi ve hukuki yorum yapılabileceği düşünülmüştür.

Ayrıca adli süreçlerin uzamaması ve kafa karışıklıklarına neden olmaması için kan alma personelinin antisepsi kurallarına özen göstermesi, etanol çalışılacak kan numunelerinin NaF içeren gri kapaklı kan tüplerine alınması, transfer sürecinde kesinlikle düşük sıcaklıklarda muhafaza edilmesi ve olabildiğince hızlı bir şekilde analiz edilmesinin doğru olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Tibbi Laboratuvarlarda kan numunelerinde etanol analizi işlemleri Genelgesi (2017/12) yayınlandı [Internet]. [cited 2021 Feb 26]. Available from: <https://shgmlabdb.saglik.gov.tr/TR-32673/tibbi-laboratuvarlarda-kan-numunelerinde-etanol-analizi-islemleri-genelgesi-201712-yayinlandi.html>
2. Gonsalves WI, Cornish N, Moore M, Chen A, Varman M. Effects of volume and site of blood draw on blood culture results. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2009 Nov 1 [cited 2021 Feb 26];47(11):3482–5. Available from: <https://jcm.asm.org/content/47/11/3482>
3. Boumba VA, Kourkoumelis N, Gousia P, Economou V, Papadopoulou C, Vougiouklakis T. Modeling microbial ethanol production by *E. coli* under aerobic/anaerobic conditions: Applicability to real postmortem cases and to postmortem blood derived microbial cultures. *Forensic Sci Int*. 2013 Oct 10;232(1–3):191–8.
4. Quintas MJ, Costa P, Melo P, Castro A, Franco JM, Teixeira HM. Postmortem in vitro ethanol production—It could be more common than we think! *Forensic Sci Int* [Internet]. 2017;274:113–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.12.040>
5. Lappas NT, Lappas CM. *Forensic Toxicology: Principles and Concepts*. *Forensic Toxicology: Principles and Concepts*. Elsevier Inc.; 2016. 1–358 p.
6. Sermet K. Alkol ve Madde Kullanımı ile İlgili Adli Tıp Sorunları. In: *Adli Tıp Ders Kitabı*. 2011. p. 425–55.
7. Öncü F, Ögel K, Çakmak D. Alkol Kültürü-1: Tarihsel Süreç ve Meyhane Kültürü. *Bağımlılık Derg*. 2001;2(3):133–8.
8. Soysal Z. Çakalır C, *Adli Tıp*, 1. Basım, cilt: 3, 1345–1359, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul, 1999.
9. *TOP TEN ANSİKLOPEDİSİ*. İstanbul: HÜRRİYET OFSET MATBAACILIK; 1990.
10. Considine GD. *Van Nostrand Reinhold encyclopedia of chemistry*. Wiley-Interscience; 2005.
11. Koolman J, Roehm K-H. *Color Atlas of Biochemistry* Second edition. 2005.

- 146–148 p.
12. [Http://ecosofia.org/files/Etanol.jpg](http://ecosofia.org/files/Etanol.jpg). Etanol picture [Internet]. Available from: <http://ecosofia.org/files/Etanol.jpg>
 13. Etil Alkol Üreticisi Firmalar Listesi [Internet]. [cited 2021 Apr 19]. Available from: <https://www.tarimorman.gov.tr/TADB/Haber/76/Etil-Alkol-Ureticisi-Firmalar-Listesi>
 14. Forensic Issues in Alcohol Testing - 1st Edition - Steven B. Karch, M.
 15. Dettmeyer RB, Verhoff MA. Forensische Alkoholologie und Toxikologie. In 2011. p. 159–215.
 16. Knight's Forensic Pathology 4th Edition (2016).
 17. Jones AW. Pharmacokinetics of Ethanol-Issues of Forensic Importance Theory and practice of forensic breath alcohol analysis View project Toxicity of cocaethylene View project. 2011.
 18. Harding P. Alcohol toxicology for prosecutors: targeting hardcore impaired drivers. Alexandria, VA Am Prosec Res Inst. 2003;5–28.
 19. Werner Goedde H, Agarwal DP. Pharmacogenetics of aldehyde dehydrogenase (ALDH). *Pharmacol Ther*. 1990 Jan 1;45(3):345–71.
 20. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 10. Baskı.
 21. Zheng Y. Development and application of an lc-ms method for the alcohol biomarker phosphatidylethanol (peth) in blood. 2011. 2011.
 22. Söylemezoğlu T. Madde Bağımlılığı Ders Notları. Ankara; 2004.
 23. Tin Win D. Breath Alcohol Testers - Prevents Road Accidents. Vol. 10, AU J.T. 2006.
 24. Vural N. Toksikoloji laboratuvar kitabı. 2000;
 25. Encyclopedia of Forensic Sciences.
 26. Kishikawa N, El-Maghrabey MH, Kuroda N. Chromatographic methods and sample pretreatment techniques for aldehydes determination in biological, food, and environmental samples [Internet]. Vol. 175, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier B.V.; 2019 [cited 2021 Feb 27]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31387030/>
 27. van den Broek I, Sobhani K, Van Eyk JE. Advances in quantifying apolipoproteins using LC-MS/MS technology: implications for the clinic.

- Expert Rev Proteomics. 2017;14(10):869–80.
28. Vogeser M, Parhofer KG. Liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)-technique and applications in endocrinology. *Exp Clin Endocrinol diabetes*. 2007;115(09):559–70.
 29. Honour JW. Gas chromatography-mass spectrometry. *Horm Assays Biol Fluids*. 2006;53–74.
 30. Poole CF. Ionization-based detectors for gas chromatography. *J Chromatogr A*. 2015;1421:137–53.
 31. Zuo HL, Yang FQ, Huang WH, Xia ZN. Preparative gas chromatography and its applications. *J Chromatogr Sci*. 2013;51(7):704–15.
 32. Kolb B, Ettre LS. *Static Headspace-Gas Chromatography Theory and Practice*. New York: WILEY-VCH,; 1997. 21–31 p.
 33. Agilent Technologies. Agilent 7694 headspace sampler: Operating manual. 2000;1–148.
 34. Baduroğlu E, Üniversitesi Tıp Fakültesi U, Durak D, Tıp Anabilim Dalı A, Tıp Kurumu Bursa Grup Başkanlığı A. Alkol İle İlgili Adli Tıp Sorunları [Internet]. Vol. 36, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2010 Jun [cited 2021 Feb 27]. Available from: <https://dergipark.org.tr/en/pub/uutfd/391543>
 35. Poisoning AA of CTAHC on the TG for M, Barceloux DG, Randall Bond G, Krenzelok EP, Cooper H, Allister Vale J. American Academy of Clinical Toxicology practice guidelines on the treatment of methanol poisoning. *J Toxicol Clin Toxicol*. 2002;40(4):415–46.
 36. Kanunu KT. 6047 Karayollari Trafik Kanunu (1) (2)(3). 2005;(1).
 37. Gazete YR. Türk Ceza Kanunu. 2005;(1).
 38. Bilgehan H. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı* 4. Baskı. Barış Yayınevi. 2004. p. 495–523.
 39. Garrity G, JG H. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: an overview of the road map to the manual*. New York, Bergey's Man Trust. 2000;
 40. *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase-Positive Cocci **. In: *Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition*. American Society of Microbiology; 2015. p. 308–30.
 41. Gary W. Procop MD MS, Deirdre L. Church, Geraldine S. Hall, William M.

- Janda, Elmer W. Koneman, Paul C. Schreckenberger GLW. [Color Atlas & Textbook of Diagnostic Microbiology] Gary W. 2016. p. 1864.
42. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev. 2015;28(3):603–61.
 43. Mandell DB. Mandell, Bennett, & Dolin - Principles and Practice of Infectious Diseases (2005, Elsevier). 2005.
 44. Dündar V. Stafilokok Enfeksiyonları. In: Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2008. p. 2065–77.
 45. Fındık D. Escherichia Türleri. In: Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi, 4 Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kİtabevleri; 2017. p. 1861–70.
 46. Erdem B. Enterobacteriaceae. In: Temel ve klinik mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi; 1999.
 47. Tez D, Akif M. Escherichia coli izolatlarında hızlı duyarlılık yöntemi geliştirilmesi. 2020;
 48. Brzuszkiewicz E, Brüggemann H, Liesegang H, Emmerth M, Ölschläger T, Nagy G, et al. How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains. Proc Natl Acad Sci. 2006;103(34):12879–84.
 49. Meteoroloji Genel Müdürlüğü [Internet]. [cited 2021 Mar 1]. Available from: <https://www.mgm.gov.tr/veridegerlendirme/il-ve-ilceler-istatistik.aspx?m=ANKARA>
 50. Jones AW, Ericsson E. Decreases in blood ethanol concentrations during storage at 4° C for 12 months were the same for specimens kept in glass or plastic tubes. Pract Lab Med. 2016;4:76–81.
 51. Dick GL, Stone HM. Alcohol loss arising from microbial contamination of drivers' blood specimens. Forensic Sci Int. 1987;34(1–2):17–27.
 52. Smalldon KW, Brown GA. The stability of ethanol in stored blood. Part II. The mechanism of ethanol oxidation. Anal Chim Acta. 1973 Sep 1;66(2):285–90.
 53. Kristoffersen L, Strand DH, Liane VH, Vindenes V, Tvette IF, Aldrin M. Determination of safety margins for whole blood concentrations of alcohol

- and nineteen drugs in driving under the influence cases. *Forensic Sci Int*. 2016 Feb 1;259:119–26.
54. Tiscione NB, Vacha RE, Alford I, Yeatman DT, Shan X. Long-term blood alcohol stability in forensic antemortem whole blood samples. *J Anal Toxicol*. 2015;39(6):419–25.
 55. Zamengo L, Tedeschi G, Frison G, Griffoni C, Ponzin D, Jones AW. Inter-laboratory proficiency results of blood alcohol determinations at clinical and forensic laboratories in Italy. *Forensic Sci Int*. 2019;295:213–8.
 56. Laurens JB, Sewell FJJ, Kock MM. Pre-analytical factors related to the stability of ethanol concentration during storage of ante-mortem blood alcohol specimens. *J Forensic Leg Med*. 2018;58:155–63.
 57. Yajima D, Motani H, Kamei K, Sato Y, Hayakawa M, Iwase H. Ethanol production by *Candida albicans* in postmortem human blood samples: Effects of blood glucose level and dilution. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2006;164(2):116–21. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073805006420>
 58. Yaman E. Yüksek kan şekerinin endojen etil alkol oluşumuna etkisi. 2009;
 59. Shan X, Tiscione NB, Alford I, Yeatman DT. A study of blood alcohol stability in forensic antemortem blood samples. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2011;211(1–3):47–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.04.012>
 60. Kocak FE, Isiklar OO, Kocak H, Meral A. Comparison of blood ethanol stabilities in different storage periods. *Biochem Medica*. 2015;25(1):57–63.
 61. Vance CS, Carter CR, Carter RJ, Del Valle MM, Peña JR. Comparison of immediate and delayed blood alcohol concentration testing. *J Anal Toxicol*. 2015;39(7):538–44.
 62. Boumba VA, Economou V, Kourkoumelis N, Gousia P, Papadopoulou C, Vougiouklakis T. Microbial ethanol production: Experimental study and multivariate evaluation. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2012;215(1–3):189–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.03.003>