KAN ALKOL DÜZEYİNİ ETKİLEYEN FAKTÖRLERİN ADLİ TIP AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

The Medico-Legal Evalutaion of Various Factors Effective on Blood Alcohol Level

Nevin Vural *, Hülya Sayın **

Vural N, Sayın H. Kan alkol düzeyini etkileyen faktörlerin adli tıp açısından değerlendrilmesi, Adli Tıp Bülteni, 1996;1(2):74-81.

ÖZET

Antemortem ve postmortem kan alkolünün doğru olarak analizi adli tıp açısından çok önemlidir. Postmortem kan örneğinin alınması, saklama ve korunma koşulları kan alkol düzeyini etkileyebilmektedir. Postmortem mikrobiyal etkilerden dolayı, kan alkol tayini için en uygun kan örneği kaynağı femoral ven'dir. Kafa ve boyun venleri de postmortem kan alımında kullanılabilir. Kalp kanı endojen alkol oluşumu veya biyokimyasal alkol oksidasyonundan dolayı ideal değildir.

Bu çalışma, kan alkol düzeyine sodyum florür ve sodyum azidin koruyucu etkisini tanımlamaktadır. Postmortem kan örnekleri +4°C ve +22°C'de 28 gün bekletilerek, 0.,7., 14., 21. ve 28. günlerde alkol konsantrasyonları tayin edilmiştir.

Bulgulara göre, postmortem kan alkolünün korunması için +4°C'de sodyum azidin sodyum florürden daha etkili olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Endojen Etil Alkol, Etil Alkol, Kan Etil Alkol Analizi, Kimyasal Stabilite, Mikrodifüzyon Yöntemi, Postmortem Kan Alkol Kaybı, Saklama Koşulları.

SUMMARY

Accurate analysis of alcohol (ethanol) in antemortem and postmortem blood is very important for medicolegal purposes. Source of postmortem blood sample, collection and preservation conditions can effect blood alcohol levels. Femoral vein is the most suitable source for blood alcohol determination as the postmortem invasion of microorganisms spread takes place through arteries. Also head and neck veins can be used for postmortem blood sampling. Blood drawn from the heart is not ideal due to endogenous alcohol formation or biochemical alcohol oxidation.

This study describes the preservative effect of sodium fluoride and sodium azide on blood alcohol level. Postmortem blood samples were stored at +4°C and +22°C for 28 days and alcohol levels were determined at the 0., 7 th, 14 th, 21st and 28th days.

The results showed that sodium azide is more effective than sodium fluoride for the preservation of postmortem blood alcohol at +4°C.

Key words: Blood Ethanol Analysis, Chemical Stabilisation, Endogenous Ethanol, Ethly Alcohol, Microdiffusion Analysis, Postmortem Blood Alcohol Loss, Storage Conditions.

GİRİŞ

Etil alkolün vücut sıvılarında özellikle kanda doğru ve hassas olarak tayini toksikolojik amaç ve adli tıp açısından önemlidir. Ülkelerin birçoğunda hastane yataklarının %20'den fazlası alkoliklere ve alkolle ilgili hastalık ve kazaya uğrayanlara ayrılmıştır. Irza tecavüzlerin %80'i, trafik kazası yapanların %60'ı, yangına sebebiyet verenlerin %16'sı alkol etkisinde olan kişilerdir. Ölümlere gelince, trafik kazalarında ölenlerin %50'sinde, düşmelerde ölenlerin %45'inde, cinayetlerin %50-70'inde, ana baba katillerinin %20'sinde alkollü içki sorumlu bulunmuştur (1). Trafik kazalarında ve bu sebeple oluşan ölümlerde, alkol etkisinde araç kul-

*Bu çalışma 13-16 Mayıs 1996 Tarihinde Bursa'da düzenlenen II.Adli Bilimler Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

* Prof. Dr., A.Ü. Eczacılık Fakültesi Farm. Toksikoloji ABD; A.Ü. Adli Tıp Enstitüsü Fen Bilimleri ABD

** Uzm. Kim., Adli Tıp Kurumu Ankara Grup Başkanlığı

Geliş Tarihi:18.5.1996, Düzeltme Tarihi:20.6.1996, Kabul Tarihi:30.7.1996.

lanmanın önemli bir neden olduğu birçok araştırmalarda gösterilmiştir. Bu nedenle birçok ülke trafik yasalarında alkol etkisinde araç kullanmayı yasaklarken, kandaki alkol düzeyinin yasal alkol limiti üstündeki değerini suç olarak kabul etmektedirler (2). Yasal alkol limiti Türkiye ve Norveç'te 0.5 promil, Fransa, Danimarka, Belçika, İsviçre ve Almanya'da 0.8 promil, Amerika Birleşik Devletleri eyaletlerinin çoğunda 1.0 promil'dir. İtalya, İspanya ve Portekiz trafik kanunlarında ise sarhoşluk halinde araç kullanılması yasak edilmiş, kandaki miktar kanunla kısıtlanmamıştır (1,3).

Türkiye'de bu konuda yapılan çalışmalarda trafik kazası yapan veya trafik kurallarını ihlal eden sürücülerin %65'inde kan alkol seviyesi 1.0 promilden yüksek bulunmuştur (4,5,6,7).

Türkiye'de 18 Ekim 1983 tarih ve 18195 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanan ve 13 Ekim 1983'te kabul edilen 2918 no'lu Karayolları Trafik Kanunu'nun 48. maddesi "Uyuşturucu ve keyif verici maddeleri almış olanlar ile alkollü içki almaları nedeniyle güvenli sürme yeteneklerini kaybetmiş kişilerin karayollarında araç kullanmalarını" yasaklamakta ve "alkollü içkilerin etki dereceleri ve kandaki miktarlarının tespit usullerini ve muayene şartlarını" bu konuda hazırlanacak yönetmeliğe bırakmaktadır (8). 16.6.1985 tarihinde yürürlüğe giren Karayolları Trafik Yönetmeliğinin 110. maddesinde bu yasaklar belirtilmiştir. Ceza kanunları ve kaza sigorta poliçelerindeki bazı koşulların sağlanması açısından araba kazasında alkol etkisinin bilinmesi önemlidir.

Trafik yasası dışında alkol alma ile ilgili cezai hükümler TCK'nın 571, 572, 573, 574 ve 575. maddelerinde yer almaktadır. Ceza kanunlarımıza göre sarhoşluk şahsın iradesi dışında veya alkolden husule gelen akıl hastalığı dolayısıyla olmuşsa cezai sorumluluğu yoktur (TCK madde 46, 47, 48).

Alkolle zehirlenmede veya adli tıp açısından bir kişinin sarhoşluk derecesinin saptanmasında en uygun biyolojik materyal kandır. Alkolün gösterdiği semptomlarla kan alkol düzeyi arasında genelde bir ilişki vardır. Kandaki etil alkol miktarı %50 mg'dan az olduğunda kişi çok hafif olarak etkilenir. Kandaki alkol miktarı %100-200 mg arasında olduğunda kişinin alkol aldığı hareketlerinden anlaşılır, %300-500 mg arasında iken ciddi zehirlenme belirtileri ortaya çıkar. %500 mg üstündeki konsantrasyonlarda ölüm kesindir. Alkol etkisi, alkollü içkiyi alma hızı, miktarı, içki sıcaklığı, kişinin açlığı, tokluğu, genetik ve bireysel faktörlere göre değişmektedir (1,3,8).

Adli tıp ve trafik bakımından kanda, idrarda ve solunum havasında alkol miktarının saptanması, sarhoşluğun tayini, alkol alınma zamanı ve kazanın oluş zamanını göstermesi bakımından çok büyük önem taşır (3). Adli olaylarda etil alkol seviyelerinin doğru olarak ölçülmesi için numunelerin alınması ve saklanması sırasında gerekli prosedürlere dikkat edilmesi gerekmektedir (9).

ALKOL KONSANTRASYONUNU ETKİLEYEN FAKTÖRLER

1. NUMUNELERİN ALINMASI

Etil alkol analizinde genelde kullanılan biyolojik sıvılar kan ve idrardır. Bunların dışında solunum havası, vitröz hümör, tükrük, çeşitli sıvı ve dokularda da etil alkol analizi yapılabilir. Ölüm sonrası ceset -10°C altında muhafaza edilir ve 24 saat içinde postmortem numune alınırsa mikroorganizma kontaminasyonu daha az olmaktadır. Eğer ceset 24 saatten fazla +20°C'de kalmışsa, postmortem numune alımında dikkatli olunmalıdır (9).

Kan: Antemortem kan numunesi ön kol toplardamarından uzman personel tarafından alınmalıdır. Deri yüzeyi alkol veya organik çözücü kullanılmadan temizlenmelidir. $HgCl_2$ bu işlem için uygundur. Amerika'da hala klinik amaçlı ıslak deri temizleyicileri (%70 v/v izopropil alkol) kullanılmaktadır ve bunlar kan alkol konsantrasyonunu artırabilmektedir (10). Steril şırınga veya vakum tipinde kan toplama tüpleri kullanılmalıdır. Tüplerin üzerinde isim, numune alınma zamanı ve tarihi, hangi tip koruyucu madde kullanıldığı, numuneyi alan kişinin adı ve imzası bulunmalıdır. Numuneler ağzı sıkıca kapalı olarak analize kadar ve analiz sonrasında buzdolabında +4°C'de saklanmalıdır (11).

Postmortem kan numunesi almak için uygun bölgeler seçilmelidir, eğer çürüme başlamışsa veya şiddetli bir şekilde yaralanma veya yırtılma varsa dikkat edilmelidir. Kan numuneleri femoral damarlar veya kalbin bozulmamış, yırtılmamış odaklarından alınmalıdır. Kalpten alınan kan ideal değildir, çünkü yüksek seviyede glukoz içerir, eğer mikroorganizma kontaminasyonu varsa etil alkol seviyesini yükseltebilir. En iyi kan numunesi kaynağı ven'dir. İntestinal arterler postmortem mikropların kaynağı olduğundan femoral ven daha uygundur. Fazla miktarda damar içeren bacak venleri, barsaktan gelen kanları hareket ettirir. Kafa ve boyun venleri daha az sayıda damar ihtiva ettiğinden, postmortem kan alımı için ikinci kaynaktır. Başka yerden kan örneği almak mümkün değilse, göğüs veya karın boşluğundan örnek alınabilir, fakat bu bölgelerde büyük ölçüde mikroorganizma içermektedir. Mümkün olursa steril şırınga veya iğne yardımıyla doku yüzeyini delerek numune alınabilir, yine de çok gerekmezse yapılmamalıdır (9).

Prouty ve Anderson (1987) tarafından 100 vaka'da yapılan bir araştırmada, kalp kan alkol konsantrasyonu ve femoral kan alkol konsantrasyon farkı 19 mg/dl olarak bulunmuştur. İki örnek arasındaki fark hematokrit, viskosite farkı, lipemik ka-

rakter ve kişinin ölüm zamanında absorbladığı alkole göre değişmektedir. Sonuç olarak, kalp ve femoral kan alkol konsantrasyonları arasında çok büyük sayılabilecek fark bulunmadığı, postmortem alkol tayininde kalp kanının inanılır bir örnek olduğu gözlenmiştir (12). Marraccini ve ark. (1990) tarafından yapılan bir araştırmada, sağ ve sol kalp alkol seviyelerinin farklı olduğu ve etil alkol içeren kusmuk aspirasyonunun aort'daki etil alkol miktarını artırdığı saptanmıştır (13).

Ertürk ve Ege (1988) tarafından yapılan bir araştırmada, iliak ven, kalp kanı ve karaciğer kesit yüzeyinden sızan kanlarda yapılan etil alkol tayininde bazı olgularda kalp kan alkol konsantrasyonunun yüksek bulunması, bu olguların ölüm anında muhtemelen absorpsiyon safhasında olduklarına bağlanmıştır. Karaciğer kesit yüzeyinden alınan kan alkol konsantrasyonları, iliak ven kanından elde edilen değerlere göre genelde daha düşük bulunmuştur. Bu çalışma sonunda, ölüm sonrası etil alkol tayini gereken vakalarda en uygun kan örneği kaynağının periferik venler olduğu kanaatine varılmıştır (14).

Kan numunesi analiz için yeterli olmadığında (travmatik yaralanmalar), kan numunesi kirlendiğinde, çeşitli sıvı ve dokular alkol analizi için alınabilir. Otopsi sırasında kalp zarı boşluğundan, omirilikten, mide içeriğinden, beyin zarı kanama odaklarından, beyin frontal lobundan numune alınabilir (15). Buchsbaum ve ark. (1989) tarafından yapılan bir çalışmada, kalp kanı ile beyin zarı kanama odaklarından alınan örneklerde alkol seviyesi karşılaştırılmış ve özellikle kafa travmasından ölenlerde kazadan ölüme kadar geçen zaman aralığı uzun olduğunda, kalp kan alkol seviyesinin düştüğü veya ölçülemediği gösterilmiştir. Travma sonrası ölüme kadarki zaman aralığı (PTTI) 9 saatten daha az olduğunda kalp kanı ile beyin zarı kanama odaklarındaki alkol seviyesi aynı bulunmuş, PTTI 9 saatten daha fazla olduğunda ise kalp kanı alkol seviyesi negatife yaklaşırken, beyin zarı kanama odaklarındaki alkol seviyesi yüksek bulunmuştur (16).

İdrar: İdrar numunesi metal kapaklı veya lastik tıpalı cam şişelere alınmalıdır. Antemortem veya postmortem idrar numunesi alımında 28 ml'lik kapaklı kaplar kullanılabilir. Postmortem idrar numunesi, steril şırınga ile idrar kesesinden alınmalıdır (9, 15).

Vitröz hümör: Önceden ilaçlanarak saklanan cesetlerde vitröz hümör kullanılarak alkol tayini kolayca yapılabilmektedir. Bu işlem bilhassa uçak kazası, endüstriyel kaza, travma ve yangınlarda ölen kişilerde kullanılabilinir. Vitröz hümör, skleradan göz içine girilerek, vakumlu şırınga kullanılarak alınır. Buzdolabında +4C'de alkol analizine kadar bekletilir. Vitröz hümör kimyasal olarak kararlıdır, anatomik olarak izoledir ve ölümden sonra bekleyen cesetlerde etil alkol seviyesini en doğru veren örnektir. Ölçülen vitröz hümör alkol değerinden, kan alkol konsantrasyonuna dönüşüm faktörü 0.89 olarak bildirilmiştir (9, 13, 15, 17, 18, 19).

Tükrük: Tükrük numunesi kan numunesi ile aynı koşullarda saklanabilir. Tükrük numunesindeki alkol seviyesinin kullanılabilmesi için kan alkol konsantrasyonuna dönüşüm faktörüne ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (20).

Solunum havası: Trafikte pratik olmasından dolayı solunum havasında alkol konsantrasyonunu ölçmek için çeşitli cihazlar kullanılmaktadır. Bu işlemi yapan kişinin deneyimli olması ve kullanılan cihazı en ince ayrıntısına kadar bilmesi gerekir. Alkol uçucu bir bileşik olduğu için, kandaki alkol miktarı ile alveoler havadaki alkol arasında bir ilişki vardır. Kan: nefes oranı 1/2300 olarak adapte edildiğinde sistematik hatalar elimine edilebilir. Bunlara rağmen solunum havasındaki alkol ölçümü kan alkolünün gerçek anlamda tayin metodu değildir (1, 3, 8, 20).

2. SAKLAMA KOŞULLARI

Alkol analizi için alınacak numunelerin saklanması sırasında, endojen alkol oluşumu veya alkol kaybı mekanizmalarının etkisiyle numunelerin alkol konsantrasyonunda değişmeler olmaktadır. Bu mekanizmalar ilerleyen konularda detaylı olarak açıklanmıştır.

NUMUNELERİN KORUNMASI

İdeal bir koruyucu basit bir kimyasal bileşime sahip olmalı, ısıya dayanıklılığı yüksek olmalı ve laboratuvarda kolayca bulunabilmelidir. Numunelerin korunması işleminde, koruyucu madde solüsyonları kan tüplerine önceden konulmalı, uçurulmalı, daha sonra kan numuneleri konularak karıştırılmalıdır. Sodyum florür, sodyum azid, civa klorür, potasyum oksalat, heparin, iyodo-asetat, kloramfenikol, siklohegzimid gibi maddeler kan numuneleri için koruyucu madde olarak önerilmiştir (9, 21).

Kan numuneleri için koruyucu olarak sodyum florür (15 mg/ml), gerekirse antikoagülan olarak potasyum oksalat (4 mg/ml) kullanılabilinir. A.B.D'de kullanılan sodyum florür (2.5 mg/ml) ve potasyum oksalat (2 mg/ml) miktarı daha düşüktür. Alkol oksidasyonunu önlemek için, bu iki tuzla beraber sodyum nitrit'te (0.13-2.5 mg/ml) kullanılabilinir. Fakat bu madde numune içinde kahverengi bir çökelek oluşturmakta ve analizi zorlaştırmaktadır (9, 21).

Antikoagülan olarak NaF ve EDTA konan örneklerde bazen pıhtılaşma olabilir. Pıhtılı kanlarda etil alkol konsantrasyonunun daha düşük olduğu, bununda

pıhtıyı ezme işlemi sırasında alkolün uçmasından dolayı olabileceği bildirilmiştir (22, 23).

Birkaç yıl öncesine kadar, idrar numunelerinde koruyucu olarak 50 mg fenilcivanitrat ve 100 mg sodyum florür, 170 ml'lik şişede olacak şekilde kullanılırdı. Daha sonra organik civa tuzlarının toksisitesinden dolayı, bu miktar 28 ml'lik şişede 300-400 mg NaF olacak şekilde değiştirilmiştir. Koruyucular şişelere önceden konulmalı, idrar numunesi daha sonra alınmalıdır (9).

3. ANALİZ YÖNTEMLERİ

Genel olarak biyolojik materyalde alkol tayininde kullanılan başlıca yöntemler kimyasal, enzimatik, gaz kromatografik ve otomatik yöntemler olarak sınıflandırılabilir. Gaz kromatografisi yöntemi, kimyasal ve enzimatik yöntemlere göre daha hassas ve spesifiktir. Etil alkolün diğer alkol ve aldehitlerden ayırımı head space gaz kromatografi ile çok daha iyi yapılabilmektedir. Bu teknikle uçucu maddeler için farklı alıkonma zamanları elde edilebilinir (2, 8, 24).

ENDOJEN ALKOL OLUŞUM MEKANİZMALARI

Canlı kişilerden kan alınmadan önce derinin etil alkolle temizlenmesi analiz sonuçlarını etkilemektedir. Boyun veninden postmortem kan numunesi alındığında özafagusa kaçmış olan gastrik sıvıdan etil alkol kontaminasyonu olabilmektedir.

Hansman (1967), karın bölgesi, göğüs boşluğu veya kalpten alınan postmortem kan örneklerindeki alkol kontaminasyonunun mide sıvısının difüzyonundan kaynaklandığı görüşündedir (9).

Kimyasal ve biyokimyasal mekanizmalar: Glukoz, yaşayan kişilerde veya postmortem dokularda etil alkol konsantrasyonunu değiştirebilir. Ölüme sebebiyet veren çeşitli şoklar, kaza, adli olay, asfiksi karaciğerdeki glikojen rezervini harekete geçirerek glukoza çevirir ve kan sistemine dağıtır. Bogusz ve ark. (1970, 1972), kokuşmuş kandaki etil alkolün laktattan oluşabileceğini öne sürmüşlerdir. Laktat seviyesi 240-350 mg/dl gibi yüksek seviyelerde olduğunda, etil alkol seviyesi de yükselebilmektedir (9, 25).

Mikrobiyolojik mekanizma: Mikrobiyolojik mekanizma 1978'de Corry tarafından oldukça geniş bir şekilde araştırılmıştır. Yaşarken barsakta bulunan mikroflora kokuşmanın ilk safhalarını başlatır, sıcaklık ve dışarıdan oluşan kontaminasyonda önemlidir. Numune postmortem alındığında, kan ve idrarda etil alkol seviyelerinin mikropların kapasitesine göre 400 mg/dl'ye kadar yükselebildiği gösterilmiştir. Kokuşmuş dokularda etil alkol oluşumu sabit değildir, mikroorganizmanın varlığına, cinsine ve sayısına bağlıdır. Blume ve Lakatua (1973) tarafından yapılan bir araştırmada, çeşitli mikroorganizmaların saklama sırasında kan numunesindeki etil alkol seviyesini artırdığı gözlenmiştir. Sodyum florür'ün (%1 w/v) insanda genellikle ağız, hazım ve kadınlarda vajina bölgesinde bulunan Candida albicans tarafından kanda etil alkol oluşumunu engelleyemediği gösterilmiştir (9, 26). Yalnız saklama sırasındaki sıcaklık ta önemlidir. Chang ve ark. (1989) tarafından yapılan bir araştırmada NaF ile korunan kan numuneleri, 1 gün 37 °C'de, 2 gün 22°C'de, 35 gün 6°C'de bekletildiğinde etil alkol oluşmadığı gösterilmiştir. NaF (10 mg/ml) ile korunan kan numuneleri Candida albicans ile aşılanıp 69 saat 37 °C'de bekletildiğinde etil alkol oluşmadığı gözlenmiştir. Aşılanan ve koruyucu konmayan numunelerde oluşan en yüksek etil alkol konsantrasyonu 7 mg/dl olarak bulunmuştur (27).

ALKOL KAYBININ MEKANİZMALARI

Alkol kaybı üç temel mekanizma ile açıklanabilir.

1- Alkol kaybı numune kaplarının kapatılmasındaki kusurlardan oluşabilir.

Brown ve Neylan (1973), kan numunelerinin konduğu polipropilen kapların %5.6'sında difüzyonla alkol kaybı olduğunu saptamışlardır (9, 28).

2. Alkol kaybı koruyucu konmayan kanlarda mikroorganizmaların metabolizması ve büyümesi sonucu olabilir. Oldukça fazla sayıda mikroorganizma karbon ve enerji kaynağı olarak etil alkolü kullanma kapasitesindedir. Mikroorganizma sayısı arttıkça etil alkol seviyesi de bundan büyük ölçüde etkilenir. Sağlıklı kişilerden steril olarak kan alınıp, buzdolabında (+4°C) koruyucu ile muhafaza edildiğinde mikroorganizmalardan dolayı alkol kaybı önemsizdir. Numune kabında büyük bir hava boşluğu varsa bakterinin aerobik metabolizması olmaktadır. Dolu kaplarda mikrobiyal aktiviteden dolayı alkol kaybı daha azdır (9).

3. Alkol asetaldehite oksitlenerek kaybolabilir. Bunun üç temel özelliği vardır:

a) Alkol oksidasyonunda sıcaklık önemli bir faktördür. Uzun süreli beklemelerde -20°C, +4°C ve +22°C'yı doğru olarak kontrol etmek mümkün değildir, +37°C ve +62°C ise termostatiksel olarak ±1°C'de kontrol edilebilinir. Brown ve Neylan (1973) tarafından yapılan bir araştırmada alkol oksidasyonunun başlangıç hızında +22°C ile +37°C arasında 22 katlık bir artış bulunmuştur. Tam kanda oksidasyon oranı, etil alkol konsantrasyonundan bağımsız olarak buzdolabı koşulunda (+4°C) O, oda sıcaklığında (+22°C) %0.29 mg/gün, 62°C'de %43 mg/gün'dür. Kan numunesinin -20°C'de saklanması kan alkolünün sabit kalmasına olanak sağlamaktadır (9, 12, 28, 29).

b) Alkol oksidasyonu çalışılan bütün sıcaklıklarda %50-250 mg arasındaki alkol seviyelerinde konsantrasyonla doğru orantılı değildir (28).

c) Kapalı kaplarda kan numunesinin etil alkol

seviyesi eritrosit iştiraki ve sıcaklığa bağlı oksidasyondan dolayı azalabilir. Ortamdaki oksihemoglobin ve methemoglobin etil alkolün asetik asit veya asetaldehite oksidasyonuna yardım eder. Etil alkol oksitleme aktivitesi, oksihemoglobinin bozulmasında bilinmeyen ara oksitleme ajanının yardımıyla oluşur. Ara ürün (x) yavaşça oluşur ve hızla etil alkolle reaksiyona girerek asetaldehitin oluşumuna sebep olur. Methemoglobin saklama sırasında kan örneklerinde oluşabilir ve alifatik aldehitlerin varlığında memeli eritrositleri tarafından hemoglobine indirgenir. Hemoglobin de numune kabındaki havanın oksijeniyle oksihemoglobin oluşturur. Alkol kaybının derecesi numune kabındaki hava miktarına bağlıdır. Smaldon ve Brown (1973), oksihemoglobinin numune kabındaki hava boşluğundaki oksijenden oluşabileceğini ve etil alkolün oksidasyonunda kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Genelde, numune kabındaki hava boşluğunda numuneden %20-40 mg'lık kayıp olmaktadır ve saklama süresi uzadıkça kayıp artmaktadır. Oksijeni azaltmak için numune kabı kan örneğiyle tamamen doldurulmalıdır (9, 29).

Alkol oksidasyonunu önlemek için, çeşitli inhibitör maddelerin etkileri üzerine yapılan çalışmalarda sodyum azid, hidrojen sülfür, ditiyonit ve nitritin alkol oksidasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği gözlenmiştir (29).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Adli Tıp Kurumu Ankara Grup Başkanlığında yapılan otopsilerden alınan kalp kanları kullanılmıştır. Ölümle otopsi arasındaki zaman farkı, 24 saati aşmayan, çeşitli alkol seviyelerindeki postmortem kan numunelerinin koruyucu olmadan, sodyum florür'lü (%1 w/v) ve sodyum azid'li (%0.3w/v) olarak 7.,14., 21. ve 28. gün, +4°C ve +22°C'de bekletilerek analizleri yapılmıştır.

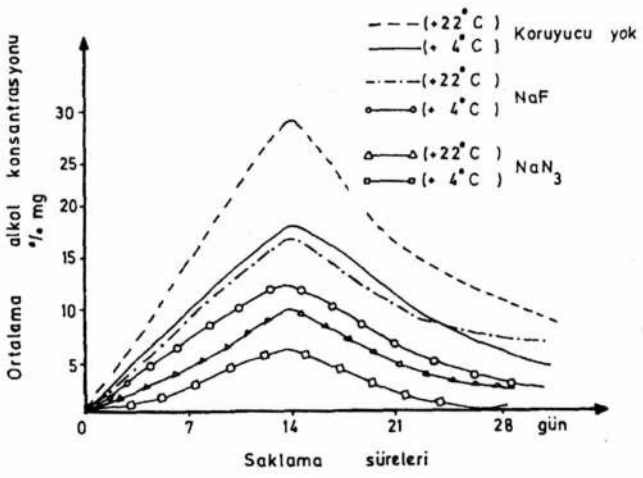
Kan etil alkol analizinde Conway-Mikrodifüzyon yöntemi kullanılmıştır. Conway-Mikrodifüzyon yönteminde, kapalı bir sistemde analizi yapılacak biyolojik materyalle (kan, idrar, ezilmiş organ) bundan uçucu zehiri açığa çıkan reaktif (doymuş potasyum karbonat) dış odacıkta, serbest hale geçen zehiri tutan çözücü (asit-dikromat) ise iç odacıkta bulunur. Oda sıcaklığı veya 37°C'de buhar veya gaz haline geçen uçucu zehir bu kapalı sistemde difüzyona uğrayarak iç odacıktaki çözücü içinde çözünür ve sıvı faza geçer. Kapiller pipet yardımıyla iç odacıktaki çözelti bir tüpe alınarak kantitatif analiz için 450 nm'de spektrofotometrede okunur (11, 30, 31).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Başlangıçta etil alkol içermeyen postmortem kan numunelerinde endojen alkol oluşumunu göstermek ve önlemek için yapılan çalışmalarda, 7. ve 14. günlerde bütün numunelerin alkol konsantrasyonlarında yükselme görülmüş, 21. günde alkol değerindeki bu yükselme düşmeye başlamış, 28. günde ise düşme devam ederek ilk değerine yaklaşmıştır. +22°C'de çalışılan numunelerde 7. ve 14. günlerdeki yükselme, +4°C'de çalışılan koruyucu olmayan numunelerden ortalama 1.6 kez, sodyum florürlü numunelerden ortalama 1.8 kez, sodyum azid'li numunelerden ortalama 2.4 kez daha yüksek bulunmuştur. Sonuçlar Tablo 1 ve Şekil 1'de görülmektedir.

Kan alkol konsantrasyonları 88-204 mg/dl (ortalama: 142.4±43.5 mg/dl) arasında olan postmortem kan numunelerinde alkol kaybını göstermek ve önlemek için yapılan çalışmalarda, bütün numunelerde 7. günde az fakat 14., 21. ve 28. günlerde belirli bir alkol kaybı görülmüştür. +22°C'de çalışılan numunelerde 7., 14., 21. ve 28. günlerdeki % alkol kaybı, +4°C'de çalışılan koruyucu olmayan numunelerden ortalama 1.5 kez, sodyum florür'lü numunelerden ortalama 1.5 kez, sodyum azid'li numunelerden ortalama 1.7 kez daha yüksek bulunmuştur. Sonuçlar Tablo 2 ve Şekil 2'de görülmektedir.

Bogusz ve ark. (1970) tarafından yapılan bir araştırmada, kan numunesi alındıktan sonra koruyucu madde konulmadığı zaman, başlangıçta etil alkol olmasa da zamanla kan numunesinde etil alkol oluşmaya başladığı ve 5.ve 15. günler arasında etil alkolün pik değerine ulaştığı gösterilmiştir. Metabolizmaya bağlı olarak etil alkol miktarı yükselirken kan glukoz seviyesinde düşme görülmüştür. Oda sıcaklığında (20°C) 5, 10, 15, 20, 25 ve 45 gün bekleyen kanlarda endojen glukoz seviyesi 3. gün 0'a inmiş, etil alkol seviyesi ise 5. günden 15. güne kadar hızla artmış, son-



Şekil 1: Tablo 1'deki postmortem kan örneklerinde saklama koşullarına göre endojen alkol oluşumu

Tablo 1. Başlangıçta etil alkol içermeyen postmortem kan örneklerinde saklama koşullarına göre endojen alkol oluşumu*

Kullanılan Koruyucu	Saklama Sıcaklığı	Saklama sürelerine göre kan alkol konsantrasyonlarının ortalama (%mg) ve standart sapma değerleri				
	°C	0. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
Koruyucu Yok	4	0±0	9.6±5.3	17.6±4.5	11.2±3.3	5.6±4.5
	22	0±0	14.4±8.3	28.0±6.3	16.0±2.8	10.4±3.6
NaF (%1w/v)	4	0±0	6.4±4.5	12.0±2.8	6.4±3.5	2.4±3.5
	22	0±0	8.8±6.5	16.8±1.8	10.4±3.6	6.4±3.6
NaN3 (%0.3w/v)	4	0±0	1.6±2.2	5.6±2.2	1.6±2.2	0±0
	22	0±0	4.0±4.0	9.6±2.2	4.8±1.8	2.4±2.2

** Her bir çalışma 5 postmortem kan örneğinin ortalamasıdır.*

raki günler yavaşça azalmıştır. 20°C ve 23°C saklama sıcaklıkları karşılaştırıldığında, 23°C'de endojen alkol artışının daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu çalışmalar sırasında kan pirüvat ve asetaldehit seviyesinin 10. günde azaldığı gözlenmiştir. 37°C saklama sıcaklığında kan numunelerine glukoz, pirüvat ve laktat eklendiğinde, 5. ve 15. günde etil alkol seviyesinde artış gözlenmiştir (32).

Brown ve Neylan (1973) tarafından kan numunesindeki alkol kaybına sodyum florür'ün etkisi üzerine yapılan çalışmada, %110 mg alkol içeren kan numunesi çeşitli NaF konsantrasyonlarında (% 0, 0.5, 1, 2, 4 w/v) 37°C'de 5 gün bekletilmiştir.

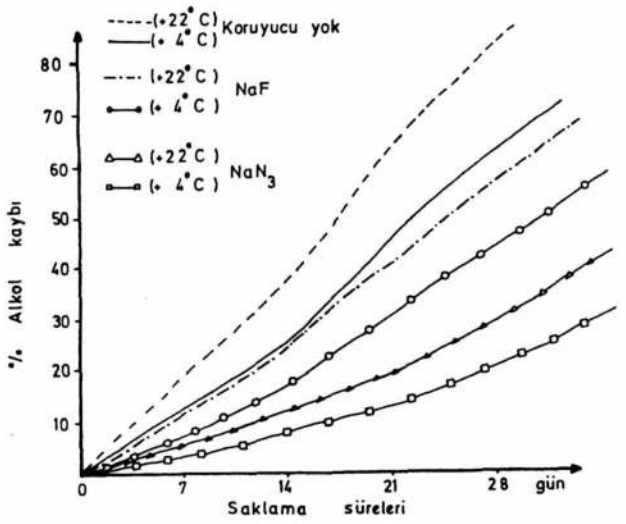
Bu çalışma sonunda, 5 gün sonra kan alkol oksidasyon kaybı %13 mg olarak bulunmuştur. Aynı araştırmacıların oda sıcaklığında (22°C), kan ve sulu solüsyonlardaki alkol kaybının zamanla ilişkisi üzerine yaptıkları çalışmada sulu solüsyonlarda alkol kaybı önemsizken, kan numunesindeki alkol kaybının zamanla doğru orantılı olarak arttığı gözlenmiştir (28).

Stone ve ark. (1982) tarafından, çeşitli sıcaklık ve farklı saklama sürelerinde sodyum florür ve sodyum azid ile korunan kan numunelerindeki etil alkol konsantrasyonlarında mikroorganizmalar ve oksidasyondan dolayı oluşan değişiklikleri görmek için yapılan çalışmalarda, çeşitli saklama sürelerinde, +4°C'de sodyum azid (%0.3w/v) ile korunan kan numunelerinde 1., 2., 3. aylarda oksidasyondan dolayı oluşan alkol

Tablo 2. Farklı alkol konsantrasyonlarındaki postmortem kan örneklerinde saklama koşullarına göre alkol kaybı*

Kullanılan Koruyucu	Saklama Sıcaklığı	Saklama sürelerine göre kan alkol konsantrasyonlarının ortalama (%mg) ve standart sapma değerleri					Saklama sürelerine göre kan alkol konsantrasyonlarındaki % alkol kaybı ve standart sapma değerleri				
	°C	0. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün	0. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
	4	142.4	125.6	108.8	76	51.2	-	12.5	24.3	45.7	62.1
Koruyucu		±43.5	±43.7	±42.5	±23.7	±19.3		±4.1	±8.4	±9.9	±16.1
Yok	22	142.4	116	90.4	49.2	22.8	-	19.7	37.3	63.6	82.9
		±43.5	±44.1	±42.0	±10.1	±9.7		±6.5	±12.9	±10.4	±11.8
	4	142.4	132.8	120	102.4	84	-	7.1	16.5	28.7	42.1
NaF		±43.5	±43.4	±43.3	±39.2	±44.8		±3.5	±5.7	±8.5	±18.7
(%1w/v)	22	142.4	126.4	108	84.8	62.4	-	12.3	25.3	40.9	56.6
		±43.5	±44.9	±43.9	±33.6	±34.7		±6.0	±8.8	±8.5	±15.2
	4	142.4	138.4	132	126.4	116	-	2.9	7.8	11.9	19.1
NaN3		±43.5	±43.1	±42.9	±41.6	±38.7		±2.0	±3.3	±3.6	±3.4
(%0.3w/v)	22	142.4	134.4	125.6	116	102.4	-	5.9	12.5	19.2	28.5
		±43.5	±43.1	±41.7	±39.1	±35.3		±2.5	±3.7	±2.6	±3.9

* Her bir çalışma 5 postmortem kan örneğinin ortalamasıdır.



Şekil 2: Tablo 2'deki postmortem kan örneklerinde saklama koşullarına göre % alkol kaybı

kaybının çok az olduğu, sodyum florünün alkol kaybını önlemede yetersiz kaldığı görülmüştür (23).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yukarıda da açıkladığımız gibi, Adli Tıp açısından alkol tayininin hassas ve doğru yapılması çok önemlidir. Bu nedenle, kanda alkol tayininde aşağıdaki önerilerin göz önüne alınması gerekmektedir:

1. Postmortem kan örneklerinin ölümden sonra hemen alınması gerekir. En uygun kan örneği kaynağı femoral damarlardır. Femoral damarlardan kan alma imkanı olmadığı zaman, kalp kanı alkol analizi için kullanılabilir.
2. Endojen alkol oluşumu veya alkol kaybını önlemek için, kan örnekleri NaF (%1 w/v) veya NaN3 (%0.3 w/v) içeren tüplere alınmalı ve tüplerin ağzı sıkıca kapatılarak analize kadar +4°C'de saklanmalıdır.
3. Koruyucu kullanılan kan örneklerinin alkol konsantrasyonları, +4°C'de en fazla iki hafta değişmeden kalmaktadır. Bu nedenle, kan örneği alındıktan sonra alkol analizinin hemen yapılması gerekir.
4. Alkol analizinde en hassas, kesin ve duyarlı sonuçlar almak için, kimyasal ve enzimatik yöntemler yerine, head space gaz kromatografisi yönteminin kullanılması daha uygundur.

KAYNAKLAR

1. Ege R., Öner O. Alkol ve Trafik Kazaları, Ankara, Emel Matbaası, 1986;15-92.
2. Vural N, Saygı Ş. Kan Alkolünün (MikroYöntemle) GLK ile Tayini ve Trafikte Uygulanması, A.Ü. Ecz. Fak. Mec., Ankara, Gökçe Ofset Matbaacılık, 1981;11 (2):190-9.
3. Öztürel A. Adli Tıp, Ankara, Olgaç Matbaası, 1983;387-402.
4. Vural N, Saygı Ş. The Effect of Alcohol on Traffic Accidents and Traffic Offence in Turkey, J. Traffic Med., 1984;12 (4):61-4.
5. Vural N, Saygı Ş. A Survey of Blood Alcohol Effect on Drivers in Ankara, International Workshop on Drugs and Driving by ICADTS/CBFT/ARFI, Padova, İtaly, 1991;64.
6. Vural N, Sayın H. Estimation of Blood Alcohol Leves of Drivers by Widmark Calculation in Traffic Accidents, Jacob, B., Bonte, W. eds, Advances in Forensic Sciences, 13 th Meeting of the International Association of Forensic Sciences, Düsseldorf, 1993; 2:171-5.
7. Vural N, Sayın H. Effect of Time Interval between the Traffic Case and Alcohol Test on the Legal Blood Alcohol Limit in Traffic Accidents, A.Ü. Ecz. Fak. Mec., Ankara, 1996 (baskıda).
8. Vural N. Toksikoloji, Ankara, A.ü. Basımevi, 1984;295-305.
9. Harper DR, Corry JEL. Collection and Storage of Specimens for Alcohol Analysis, Garriott, J.C. eds, Medicolegal Aspects of Alcohol Determination in Biological Specimens, Massochusetts, PSG Publishing Company, 1987;145-69.
10. Taberner PV. A Source of Error in Blood Alcohol Analysis, Alcohol and Alcoholism, 1989;24(5):489.
11. Güley M, Vural N. Toksikoloji Laboratuvar Kitabı, Ankara, A.Ü. Ecz. Fak. Yayınları, 1975;37:1-5.
12. Prouty RW, Anderson WH. A Comparison of Postmortem Heart Blood and Femoral Blood Ethyl Alcohol Concentrations, J. Analy. Toxico., 1987;11:191-7.
13. Marraccini JV, Carroll T, Grant S, Halleran S, Benz JA. Differences Between Multisite Postmortem Ethanol Concentrations as Related to Agonal Events, J. Forensic Sci., 1990;35(6): 1360-6.
14. Ertürk S, Ege B. Otopsilerde Kan Alkol Düzeyini Belirlemek üzere Kan Örneklerinin Alınabileceği Kaynakların Saptanması, Adli Tıp Dergisi, 1988,4(1-2):19-24.
15. Backer R.C, Pisona RV, Sopher IM. The Comparison of Alcohol Concentrations in Postmortem Fluids and Tissues, J. Forensic Sci., 1980; 25 (2):327-31.
16. Buchsbaum RM, Adelson L, Sunshine I. A Comparison of Postmortem Ethanol Levels Obtained from Blood and Subdural Specimens, Forensic Sci. Int., 1989;41:237-43.
17. Coe JI, Sherman RE. Comparative Study of Postmortem Vitreous Humour and Blood Alcohol, J. Forensic Sci., 1970; 15 (2): 185-90.
18. Fernandez P, Lopez-Rivadulla M, Linares JM, Tato F, Bermejo AM. A Comparative Pharmacokinetic Study of Ethanol in the Blood, Vitreous Humour and Aqueous Humour of Rabbits, Forensic Sci. Int., 1989; 41:61-5.
19. Scott W, Root I, Sanborn B. The Use of Vitreous Humour for Determination of Ethyl Alcohol in Previously Embalmed Bodies, J. Forensic Sci., 1974; 19 (4): 913-6.
20. Haeckel R, Bucklitsch I. The Comparability of Ethanol Concentrations in Peripheral Blood and

Saliva The Phenomenon of Variation in Saliva to Blood Concentration Ratios, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 1987; 25 (4): 199-204.
21. Toseland PA, Samples and Sampling, Moffat AC, Jackson JV, Moss MS; Widdop B eds, Clarke's Isolation and Identification of Drugs, London, The Pharmaceutical Press, 1986;115-6.
22. Senkowski CM, Thompson KA. The Accuracy of Blood Alcohol Analysis Using Headspace Gas Chromatography.when Performed on Clotted Samples, J. Forensic Sci., 1990; 35(1): 176-80.
23.Stone HM, Muirhead JM, Thompson HR. Preservation and Storage of Blood Samples Containing Alcohol, Stone, H.M. eds, Alcohol, Drugs and the New Zealand, New Zealand, Science Information Division Wellington, 1982; 29-36.
24. Vural N, Aksaç S. Postmortem Kanda Bazı Endojen Maddelerin (Alkollerin) Oluşumunun Adli Tıp Açısından Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 1996.
25. Bogusz M, Guminska M, Markiewicz J. Studies on the Formation of Ethanol and of Pyruvate as its Precursor from Some Di-and Tricarbonic Compounds in Putrefying Blood in Vitro, Forensic Sci., 1972;1: 229-37.
26. Blume P, Lakatua DJ. The Effect of Microbial Contamination of the Blood Sample on the Determination of Ethanol Levels in Serum, Am. J.Clin. Pathol., 1973; 60:700-2.
27. Chang J, Kollman SE. The Effect of Temperature on the Formation of Ethanol by Candida Albicans in Blood, J. Forensic Sci., 1989; 34(1): 105-9.
28. Brown GA, Neylan D, Reynolds WJ, Smalldon KW. The Stability of Ethanol in Stored Blood Part I. Important Variables and Interpretation of Results, Anal. Chim. Acta, 1973; 66:271-83.
29. Smalldon KW, Brown GA. The Stability of Ethanol in Stored Blood Part II. The Mechanism of Ethanol Oxidation, Anal. Chim. Acta, 1973; 66: 285-90.
30. Feldstein M, Klendshoj NC. Determination of Ethyl Alcohol and Volatile Reducing Substances, J. Forensic Sci., 1957; 2(1): 41-5.
31. Sunshine I eds. Handbook of Anaytical Toxicology, Application of Microdiffusion Technique, Cleveland, The Chemical Rubber Co., 1969; 1017-8.
32. Bogusz M, Guminska M, Markiewicz J. Studies on the Formation of Endogenous Ethanol in Blood Putrefying in Vitro, J. Forensic Med., 1970;17(4):156-68.

Yazışma Adresi:
Prof. Dr. Nevin Vural
A.Ü. Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji - Toksikoloji Anabilim Dalı
Ankara