

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

**FARKLI ORTAMLARIN TAVŞAN VÜCUT SIVILARINDA
EROİN METABOLİTLERİNİN POSTMORTEM DEĞİŞİMLERİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Aykut LALE

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA
2018**

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

**FARKLI ORTAMLARIN TAVŞAN VÜCUT SIVILARINDA
EROİN METABOLİTLERİNİN POSTMORTEM DEĞİŞİMLERİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Dr. Aykut LALE
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Ramazan AKÇAN**

**ANKARA
2018**

TEŞEKKÜR

- Tezde elinden gelen her aşamada yardımını esirgemeyen Şerif'e...
- Her basamakta önerilerini ve akademik tecrübesini paylaştan Ramazan Hocama...
- Tezin en sıkıntılı anlarındaki çözümleri ve umutsuzluk anlarında umut için yollar açan Ali Rıza Hocama...
- Moral ve motivasyonumun kaybolmamasını sağlayan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Aysun Hocama ve Mehmet Hocama...
- Laboratuvar aşamalarındaki değerli tecrübeleri ve yönlendirmeleri için Mukaddes Hocama...
- Anlayışları her zaman en üst düzeyde olan tüm asistan arkadaşlarıma...
- Gece mesailerime, olanca stresime katlanan ve istatistik değerlendirmeleri için biricik eşim Funda'ya...
- Uykum geldiğini hissederek beni uyandıran değerli kızım Ceyda'ya..

teşekkür ederim.

Dr. Aykut Lale

ÖZET

Postmortem toksikolojik örnekleme adli vakaların değerlendirilmesinde rutin olarak başvurulmaktadır. Fakat elde sonuçların değerlendirilmesi halen tam olarak netliğe kavuşturulamamıştır. Postmortem redistribüsyon kavramı ortaya çıkan karmaşıklığın temel sebebi olarak görünmektedir ve postmortem toksikolojinin sık araştırılan konularından biridir. Birçok faktörden etkilendiği bilinmesine rağmen etkenlerin ne kadarlık bir etkiye yol açtıkları aydınlatılması gereken önemli sorulardan biridir. Bu nedenle tatlı ve tuzlu ortamları kullanarak sık kullanılan ve araştırılan eroin metabolitlerinin postmortem redistribüsyonunun ortam ve süre ile etkileşimini araştırmayı amaçladık.

48 adet Yeni Zelanda tavşanı eroin infüzyonundan bir saat sonra antemortem kan örneklerinin alınmasının ardından sakrifiye edilerek tatlı su (n:15), tuzlu su(n:15) ve açık hava (n:15) ortamında 30 dk, 2, 6, 12, 24 saat bekletildi. Daha sonra otopsileri yapılarak santral ve periferik kan, göz içi ve safra sıvı örnekleri alındı ve 6-monoasetilmorfin, morfin ve morfin-3-beta-glukuronit ölçümleri LC-MS/MS ile yapıldı.

Analizler sonucunda ortam değişiminin santral ve periferik kanda morfin-3-beta-glukuronit değerleri üzerine önemli etkileri olduğu, eroin metabolitlerinin postmortem redistribüsyonundan büyük oranında postmortem intervalin sorumlu olduğu, morfinin kuvvetli postmortem redistribüsyona uğramadan ve daha stabil bir seyir izlediği ve postmortem toksikoloji için güvenilir bir metabolit olabileceği, göz içi sıvısının immersiyon durumundan etkilenerek daha az güvenilir sonuçlar verdiği, safra örneğinde yapılan metabolit analizleri ortam ve postmortem interval değişiminden etkilenmeyerek postmortem toksikoloji için değerli bulgular verebileceği saptandı.

Anahtar kelimeler: Postmortem redistribüsyon, Eroin, Morfin, 6-monoasetil-morfin, Morfin-3-beta-glukuronit, Postmortem interval, Tatlı su, Tuzlu su.

ABSTRACT

Postmortem toxicological sampling is routinely used in the evaluation of forensic cases. However, the assessment of the results has not yet been fully clarified. Postmortem redistribution appears to be the main reason for the complex results, and postmortem redistribution is one of the most frequently researched topics of postmortem toxicology. Although it is known that it is affected by many factors, one of the important questions is that how much effect the factors cause. Therefore, we aimed to investigate the interaction of heroin metabolites which is commonly used and investigated in literature with medium and time using fresh and salty water.

Forty-eight New Zealand rabbits were sacrificed one hour after the heroin infusion and antemortem blood samples were taken, they were left for 30 min, 2, 6, 12, 24 hours in fresh water (n: 15), salty water (n: 15), and air (n:15). Central and peripheral blood, vitreous humour and bile samples were then obtained by autopsy and measurements of 6-monoacetylmorphine, morphine and morphine-3-beta-glucuronide were performed by LC-MS / MS.

The results of the analyzes showed that the medium change had significant effects on central and peripheral morphine-3-beta-glucuronide concentrations, postmortem interval were responsible for the postmortem redistribution of heroin metabolites at a great rate, morphine was stable due to minimum postmortem redistribution and a reliable metabolite for postmortem toxicology, vitreous humour was affected by immersion and results in less reliable, bile specimens could be valuable for postmortem toxicology in heroine fatality cases without being influenced by environment and postmortem interval changes.

Key words: Postmortem redistribution, Heroin, Morphine, 6-monoacetyl-morphine, Morphine-3-beta-glucuronide, Postmortem interval, Fresh water, Salty water.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. POSTMORTEM TOKSİKOLOJİ	3
2.1.1. Antemortem Faktörler.....	3
2.1.2. Ölüm ve Postmortem Dönem	8
2.1.3. Örnekleme ve Örneklerin Özellikleri.....	17
2.2. EROİN VE POSTMORTEM REDİSTRİBÜSYON	20
2.2.1. Farmakolojik Özellikleri ile Eroin	20
2.2.2. Hayvan Çalışmaları	21
2.2.3. İnsan Çalışmaları	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. ÇALIŞMA PROTOKOLÜ	25
3.1.1. Ortam Özellikleri ve Deney Düzeni.....	25
3.2. TOKSİKOLOJİK ANALİZ	26
3.2.1. Kimyasallar ve Enstrumentasyon.....	26
3.2.2. Yöntem Validasyonu	27

3.2.3. Örneklerin Hazırlanması	28
3.3. İSTATİKSEL ANALİZ	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. AKCİĞER-KALP AĞIRLIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI	30
4.2. ANTEMORTEM, SANTRAL VE PERİFERİK KAN ÖRNEKLERİNİN ANALİZ SONUÇLARI.....	30
4.3. SAFRA VE GÖZ İÇİ SIVISI ÖRNEKLERİNİN ANALİZ SONUÇLARI	39
5. TARTIŞMA.....	42
5.1. AKCİĞER-KALP AĞIRLIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI	42
5.2. ANTEMORTEM, SANTRAL VE PERİFERİK KAN ÖRNEKLERİNİN ANALİZ SONUÇLARI.....	43
5.3. SAFRA VE GÖZ İÇİ SIVISI ÖRNEKLERİNİN ANALİZ SONUÇLARI	45
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	47
7. KAYNAKLAR	49

KISALTMALAR DİZİNİ

ADME : Absorbsiyon, dağılım, metabolizma, atılım

6-MAM : 6-monoasetil-morfin

M3BG : Morfin-3-beta-glukuronit

LC-MS/MS : Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi

LOD : Alt tespit limiti

LOQ : Alt tayin limiti

RSD: Rölatif standart sapma

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** Eroin metabolizması..... 20
- Şekil 2.** Morfin-3-beta-glukuronid (A), morfin (B) ve 6-MAM (C) değerlerinin ortamlar ve örneklem çeşidine göre değişimi.....32-33
- Şekil 3.** Morfin-3-beta-glukuronidin zamana ve ortama bağlı (Açık hava – A, Tatlı su – B, Tuzlu su - C) olarak santral kan örneklerindeki değişimi.....33
- Şekil 4.** Morfinin zamana ve ortama bağlı (Açık hava – A, Tatlı su – B, Tuzlu su – C) olarak santral kan örneklerindeki değişimi.....33
- Şekil 5.** 6-MAM'ın zamana ve ortama bağlı (Açık hava – A, Tatlı su – B, Tuzlu su - C) olarak santral kan örneklerindeki değişimi.....34
- Şekil 6.** Morfin-3-beta-glukuronidin zamana ve ortama bağlı (Açık hava – A, Tatlı su – B, Tuzlu su - C) olarak periferik kan örneklerindeki değişimi.....34
- Şekil 7.** Morfinin zamana ve ortama bağlı (Açık hava – A, Tatlı su – B, Tuzlu su - C) olarak periferik kan örneklerindeki değişimi.....34
- Şekil 8.** 6-MAM'ın zamana ve ortama bağlı (Açık hava – A, Tatlı su – B, Tuzlu su - C) olarak periferik kan örneklerindeki değişimi.....35
- Şekil 9.** Santral morfin-3-beta-glukuronitte ortam ve süre etkileşimi.....36
- Şekil 10.** Periferik morfin-3-beta-glukuronitte ortam ve süre etkileşimi.....37
- Şekil 11.** Santral (A) ve periferik (B) morfin ortam ve süre etkileşimi.....37
- Şekil 12.** Santral (A) ve periferik (B) 6-MAM ortam ve süre etkileşimi.....38
- Şekil 13.** Morfin-3-beta-glukuronit (A), morfin (B) ve 6-MAM (C) santral/perifer oranlarının süre ve ortam ile etkileşimi.....39
- Şekil 14.** Morfin-3-beta-glukuronit (A), morfin (B) düzeylerinin göz içi sıvısında süre ve ortam ile etkileşimi.....40

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Toksikokinetik varyasyonların oluşmasına neden olan faktörler.....	6
Tablo 2. Tatlı su içeriği.....	26
Tablo 3. Eroin metabolitlerinin kütle spektrometresinde analizi için kullanılan m/z değerleri	27
Tablo 4. Eroin metamolitlerinin alt tespit limiti, alt tayin limiti ve kalibrasyon eğrisinin doğrusallığı.....	27
Tablo 5. Tekrarlanabilirlik testleri sonucunda elde edilen doğruluk ve kesinlik verileri.....	28
Tablo 6. Tekrar üretilebilirlik testleri sonucunda elde edilen doğruluk ve kesinlik verileri.....	28
Tablo 7. Kan geri kazanım oranları.....	29
Tablo 8. Akciğer-Kalp ortalama ağırlıkları.....	30
Tablo 9. Antemortem kan eroin metabolitleri analizi.....	30
Tablo 10. Antemortem kan örnekleri ile postmortem elde edilen santral ve periferik kan örnekleri arasındaki korelasyon katsayıları ve istatistiki anlamlılık değerleri....	31
Tablo 11. Santral kan örneği analiz sonuçları	31
Tablo 12. Periferik kan örneği analiz sonuçları	31
Tablo 13. Santral / Perifer oranının ortamlara ve metabolitlere göre değişimi.....	38
Tablo 14. Safra örneği analiz ortalama.....	39
Tablo 15. Göz içi örneği analiz ortalama sonuçları.....	40
Tablo 16. Antemortem kan örnekleri ile postmortem elde edilen göz içi sıvısı ve safra örnekleri arasındaki korelasyon katsayıları ve istatistiki anlamlılık değerleri.....	41

1. GİRİŞ

Doğal olmayan, ani, beklenmedik ölüm vakalarında ya da travmatik ölümlerin değerlendirilmesinde adli tıp uzmanları dışarıdan alınan maddelerin ölüme direk veya dolaylı yoldan katkısının bulunup bulunmadığını araştırmak için cesetten alınan örneklerden toksikolojik inceleme yapılmasını talep etmektedirler. Alınan bu örnekler çeşitli basamaklardan geçerek analizlere tabi tutulmakta ve analizler sonucunda elde edilen değerlerin ölüme katkısı hakkında değerlendirme yaparak kesin ölüm nedeninin belirlenmesi adli tıp uzmanlarının görevleri arasında bulunmaktadır. Bu değerlendirme yapılırken birçok faktörün göz önüne alınması gerekmektedir ¹.

Ölüme etki eden bir madde varlığında madde üzerinde antemortem dönemde basit farmakokinetik süreçler etkili olarak emilim, dağılım, metabolizma ve atılım basamakları gerçekleşmeye başlamaktadır. Ölüm gerçekleştikten sonra emilim, dağılım, metabolizma ve atılım basamaklarının gerçekleşmesini sağlayan hücre kan akımı durmakta, hücrelerin canlılıkları, hücre zarı bütünlüğünün korunması ve metabolizmanın devamı için gerekli olan enerji üretimleri son bulmaktadır. Bu durum antemortem dönemde vücuda giren maddelerin vücuttaki döngülerini belirleyen süreçlerin durması ile sonuçlanmaktadır. Diğer taraftan ölüm sonrasında postmortem değişiklikler meydana gelmeye başlamaktadır. Postmortem değişikliklere ek olarak maddelerin kimyasal özelliklerine göre meydana gelen dağılımları tersine dönerek yeniden dağılıma uğramaktadır. Postmortem süreçlerde meydana gelen otoliz, yıkıcı enzimlerin salınması, bakteriyel kontaminasyon gibi olaylar madde üzerine etki etmektedir. Bu durum postmortem bulgulardan antemortem gerçeklere kestirim yapma sanatı olan adli tıp artefaktlar oluşturmaktadır. antemortem dönemde ölçülen ve letal olarak belirlenen dozun postmortem dönemde yapılan ölçümlerde farklı olarak ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Madde konsantrasyonunda postmortem dönemde artefakt olarak artış ya da azalışa neden olan tüm mekanizma ve süreçleri ifade etmek için postmortem redistribusyon terimi kullanılmaktadır ².

Uyuşturucu bağlantılı ölümler önlenabilir ve engellenebilir olmasına rağmen dünya çapında önemli bir sorun olarak dikkati çekmektedir. 2016 Avrupa Uyuşturucu Raporunda ülkemiz de dahil edildiğinde 2015 yılında yaklaşık 8500 uyuşturucu ilişkili ölüm olduğu tahmin edilmekte ve 2014 yılına göre %6 oranında artmış bulunmaktadır.

Raporda ülkemizdeki verilerde artış olduğu bildirilmekle beraber bu durumun daha çok veri toplama ve bildirim uygulamalarındaki gelişmelerden kaynaklandığı vurgulanmaktadır³.

Dünya 2016 yılı Uyuşturucu Raporunda uyuşturucuların ölümler ve maluliyetler dikkate alındığında 12 milyon yıllık yaşam kaybına neden olduğu bildirilmektedir. Bu durumun 8 milyonluk kısmı ise opioid kullanım bozukluklarından kaynaklanmaktadır. Diğer taraftan yeni psikoaktif maddelerin kullanımı, dolaylı etkileri ortaya çıkarmak için detaylı araştırma yapma gerekliliği, çoklu madde kullanımı gibi sebepler nedeni ile uyuşturucu ilişkili ölümlerin tahmin edilenden daha fazla olduğu, Fransa ve İtalya'dan çalışma örnekleri ile Fransa'da üçte bir oranında vakanın, İtalya'da %60 daha vakanın uyuşturucu ilişkili ölüm olarak değerlendirildiği belirtilmektedir⁴⁻⁶.

Bu ölümler arasında opioid ilişkili ölümler en geniş yeri kapsamaktadır. 2016 Avrupa Uyuşturucu Raporuna göre opioid ilişkili ölümler diğer uyuşturucu madde türevlerine oranla 5-10 kat daha fazla ortaya çıkmakta, önceki yıllara oranla giderek artan bir trend göstermektedir ve öncelikli olarak aşırı doz kullanımı ile ilişkili görülmektedir³. Özellikle Amerika Birleşik Devletlerinde 2000 ile 2014 yılları arasında giderek artan oranlara sahip olduğu, 2000 yılında yüz bin ölümden 0,7 olan eroin bağımlı ölümlerin 2014 yılında 3,4'e yükseldiği belirtilmektedir^{4,7}.

Literatürde toksikolojik kabus olarak belirtilen postmortem redistribusyon madde ilişkili ölümlerin değerlendirmesinde zorlukların yaşanmasına neden olmaktadır. Birçok faktörün sürece değişik etkileri olabileceği belirtilmesine rağmen etkilerinin nasıl olacağına ilişkin literatürde yapılmış bir araştırma bulunmamaktadır¹. Çalışmamızda değişik postmortem intervallerde farklı ortamlarda (tatlı su – tuzlu su ve açık hava) bulunan cesetler simule edilerek oluşturulmuş hayvan deneyi modellenmesi ile postmortem redistribusyonunun postmortem interval ve farklı ortamlardan nasıl etkilendiğinin araştırılması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. POSTMORTEM TOKSİKOLOJİ

Ölümün meydana gelmesinde toksik bir etkilendirme olup olmadığı konusunda postmortem dönemde cesetten yapılan örneklemeler ile yapılan analizler ve bu analiz sonuçlarının yorumlanması postmortem toksikolojinin inceleme alanını oluşturmaktadır. Zehirlenme durumundan şüphelenilen, cinayet, trafik kazası, iş kazaları, malpraktis vakaları ve ani beklenmedik ölüm durumları postmortem toksikolojik inceleme endikasyonu oluşturmaktadır. Buna ek olarak madde ve alkol bağımlılıklarında, intihar veya kaza olarak yüksek doza maruziyet oluşabilecek bilinen ilaç kullanım hikayesi varlığında, inceleme sonucu toksik değer altında bulunmasına rağmen vaka hakkında daha geniş bir bilgi sağlayacağı için çocuk ve genç erişkin ölümlerinde postmortem toksikolojik inceleme yapılması önerilmektedir ⁸.

Postmortem toksikoloji, ölüm nedeninin belirlenmesinin yanında özellikle ölümlerle sonuçlanan kaza ilişkili adli vakaların değerlendirilmesinde kişinin karar verme ve santral sinir sistemi motor kontrolünü etkileyebilecek psikoaktif madde varlığı durumlarının tespitini sağlamaktadır. Böylece, ikincil kişilere karşı ortaya çıkabilecek hak mahrumiyetlerinin önüne geçilmesi mümkün olabilmektedir.

Postmortem toksikoloji adli tıbbın birçok alanında olduğu gibi disiplinlerarası çalışma gerektiren bir alandır. Adli tabip, analitik toksikologlar ve gerektiğinde klinik toksikologların toksisite nedeni ölümler hakkında karar verilmesi sürecinde rolleri bulunmaktadır ⁹. Bu süreçte dikkatle yerine getirilmesi gereken birçok basamak bulunmaktadır. Bireysel farklılıklardan, örneklerin alınması, saklanması, analiz edilmesi ve yorumlanmasına kadar sonucu etkileyecek faktörler bulunmaktadır ve adli toksikolojinin en zorlu görevlerinden biri olarak kabul edilmektedir ².

2.1.1. Antemortem Faktörler

Antemortem dönemde toksik maddeler için temel farmakolojik prensipler geçerli olmaktadır. Toksik maddenin vücuda girişini takiben emilim (absorption), dağılım (distribution), metabolizma (metabolism) ve atılım (excretion) basamakları gerçekleşmeye başlamaktadır. Birçok kaynakta bu basamakların baş harfleri ile

oluşturulan ADME prensipleri olarak tariflenmektedir. Ancak bazı araştırmacılar tarafından bu terminolojiye toksik ajanın içinde bulunduğu matriksten salınımını ifade eden “liberation” kelimesi de eklenmektedir ^{2, 10}. Özellikle oral maruziyet sonrasında toksik ajanın etkisinin ortaya çıkması için vasküler sirkülasyona dahil olması gereklidir. Kostik ve iritan özellikte olan ajanlar dışında gastrointestinal kanaldan emilimi gerçekleşmeyen toksik ajanlar sistemik etki ortaya çıkarmazlar ¹¹. Emilim sırasında gastrointestinal kanal pH değeri ve toksik ajanın kimyasal özellikleri belirleyici olmaktadır. Zayıf asit özellikte olan maddeler mideden absorbe edilmeye başlanırken barsaklar pKa değerleri 3-8 arasında olan zayıf asit ve bazlar için en iyi absorpsiyon bölgesi olmaktadır. Duodenum ise alkalın pH değerleri ile daha bazik maddeler için absorpsiyon ortamı oluşturmaktadır ¹⁰. Absorpsiyon sırasında gastrointestinal kanal epitel hücre zarlarında bulunan ve koruyucu rol alan ABC (ATP-binding cassette) taşıyıcılar kimyasalların hücre dışına atılmasında rol oynamaktadır. Çoklu ilaç direnç (Multi Drug Resistance (MDR)) gen ürünü olan P-glikoproteini renal proksimal tübül, hepatositler, kan beyin bariyerini oluşturan kapiller endotelinde yüksek miktarda izlenmektedir ve mutasyonlar aracılığıyla artmış işlev kazanabilmekte ya da greyfurt alımı sonrasında maruz kalınan naringenin aracılığıyla inhibe olarak toksik ajan emilimlerinde değişiklikler oluşturabilmektedir ^{10, 11}. Absorpsiyon sırasında gastrointestinal sistem epitelinde ve sonrasında portal vene geçen, karaciğere taşınan birçok ksenobiyotik metabolize olmakta ve ilk geçiş eliminasyonu gerçekleşmektedir ¹⁰. Sistemik dolaşıma ulaşan ksenobiyotik dokulara olan affinitesine göre değişen oranlarda dağılıma uğramakta ve belli dokularda depolanmaktadır. Absorpsiyon sonrasında ksenobiyotik en yüksek oranda sistemik dolaşımda bulunmaktadır. Dağılım zamanına bağlı olarak ilk başta perfüzyon oranı yüksek olan karaciğer, böbrek, kalp ve beyin gibi organlarda görülmektedir. Perfüzyon oranı düşük olan kas, yağ ve periferik dokularda dağılım daha kısıtlı olmaktadır. Ksenobiyotiklerin dokulara penetrasyonunda pH gradienti, lipid ve intrasellüler yapılarla bağlanma özellikleri önemli rol oynamaktadır. Dokulara dağılımda plazma proteinlerine bağlanma durumu etkili olmaktadır. Doku ile sistemik dolaşım arasındaki denge ksenobiyotiğin plazma proteinlerine bağlı olmayan kısmı ile olmaktadır. Bu durum aynı zamanda ksenobiyotiğin metabolizmasını ve atılımını da etkilemektedir. Plazma proteinleri arasında albüminin özellikle asidik maddelere

afinitesi yüksek iken bazik maddeler ise sıklıkla betaglobulin ve asit glikoproteine bağlanmaktadır. Ortaya çıkan farmakolojik etkiden sorumlu olan serbest fraksiyon, plazma proteinlerinin bağlanma saturasyonuna ulaşıldığında doz artışından daha yüksek bir artışa uğramaktadır. Bu durum ise istenmeyen toksik etkilerin oluşmasına neden olabilmektedir. Plazma proteinlerine afinitesi daha yüksek olan alternatif bir maddeye maruz kalındığında ya da malnütre vakalarda düşük plazma protein düzeyleri nedeni ile serbest fraksiyon artmaktadır. Serbest fraksiyon artışları aynı zamanda dağılım hacimlerinin artması sonucunu da doğurmaktadır ^{10, 11}. Yağ dokuya penetrasyonu yüksek maddeler yağ doku perfüzyonunun az olmasının doğal bir sonucu olarak yavaş ve progresif olarak depolanmaktadır. Bu ajanlar kadın ve erkek cinsiyeti arasında yağ doku (kadın %8-12, erkek %3-5) oranlarındaki farklılık nedeni ile farklı oranlarda bulunmaktadır. Ek olarak obezite hastalarında %25 oranında daha fazla yağ doku bulunmaktadır ¹⁰. Absorbsiyon ve dağılım basamakları ile depolanan madde absorpsiyon oranı metabolizma ve atılım oranının altına düştüğü zaman depo dokulardan sistemik dolaşımda madde dengesini sağlayacak şekilde tekrar dolaşıma salınmaktadır ¹¹.

Vücuda giren birçok ksenobiyotik temel amacı suda çözünebilirliğin artırılması olan biyotransformasyon işlemlerine uğramaktadır. Metabolik olarak gerçekleştirilen bu işlemlerde başlıca iki basamağa ayrılmakta ve faz 1 reaksiyonları hidroliz, oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını, faz 2 ise glukuronidasyon, sülfatasyon, asetilasyon, metilasyon gibi konjugasyon reaksiyonlarını kapsamaktadır. Enzim aracılı gerçekleşen bu reaksiyonlarda faz 1 basamağı sitokrom P450 enzim sistemi ile faz 2 basamakları konjugasyon işlemlerine aracılık eden UDP glukuronil transferaz, sulfotransferaz gibi enzimler ile katalizlenmektedir. Sitokrom P450 enzim sistemi birçok alt birime sahip olup bu birimlerden özellikle CYP2D6 polimorfizmi yavaş metabolizer olmakla ilişkilidir. Ayrıca sitokrom enzimleri ilaç-ilaç etkileşimi yüksek olan enzimlerdir. Bu enzimler fenobarbital gibi ajanlarla indüklenerek hızlı biyotransformasyona, SSRI tipi antidepressanlar enzim inhibisyonu yaparak yavaş biyotransformasyona neden olmaktadır¹². Konjugasyon basamaklarında da polimorfizmler tanımlanmış olup klinik olarak yansıması en fazla olan ve Gilbert Sendromu adı ile tanınan UDP glukuronil transferaz enzimi UGT1A1 alt tipinin

nonfonksiyone olmasıdır. Ayrıca UDP glukuronil transferaz enzimi diğer alt tiplerinde ve sulfotransferaz enzim alt tiplerinde de polimorfizmler tanımlanmıştır ^{13, 14}.

Ksenobiyotiklerin atılımı en fazla renal ve hepatodeudonal yolla olmakla birlikte vücuttan dışarı salınan tükürük, ter, gözyaşı, süt gibi birçok vücut salgısı ile de atılımın gerçekleştiği bilinmektedir. Böbreklerde renal tübüler sistem ve karaciğerde safra atılımı sağlayan temel fonksiyonel birimlerdir. Glomeruler filtrasyon ile süzülen filtrat tübüler sistemde konsantre edilerek yüksek oranda ksenobiyetik atılımı sağlanmaktadır. Karaciğerde faz 2 reaksiyonları ile suda çözünür hale gelen ksenobiyotikler safra kanallarına transfer edilerek safraya taşınmakta ve koledok kanalı ile deudonuma atılmaktadır. Safra yoluyla atılımı gerçekleşen bu ksenobiyotikler gastrointestinal sistem florasının sahip olduğu glukuronidaz ve sulfataz gibi enzimler aracılığı ile tekrar serbestleştirilmekte ve tekrar absorbe edilmektedir. Bu süreç enterohepatik sirkülasyon olarak adlandırılmakta ve bazı maddeler için bu yol ile %20'ye kadar geri emilim sağlanabilmektedir ^{10, 11}.

Ksenobiyotiğin ADME süreçlerini etkileyen ve konsantrasyon-zaman profilinin değişmesine sebep olan faktörler Gisela Skopp tarafından düzenlenen tablonun uyarlaması olarak Tablo 1'de paylaşılmıştır ².

Preperat şekli, üretim aşamasındaki farklılıklar
Uygulama şekli, dozu, sıklığı
Tolerans gelişim durumu
Değişken ADME süreci
Uygulama zamanı ile örnekleme arasındaki süre farklılıkları
Yaş, cinsiyet, etnisite, genetik yapı
Ağırlık, fiziksel aktivite, beslenme durumu, hastalık varlığı, genel durum
Diyet içeriği, sigara ve alkol kullanımı, diğer ksenobiyotiklerle etkileşim

Tablo 1. Toksikokinetik varyasyonların oluşmasına neden olan faktörler

Akut toksisite sonrasında ölüm sıklıkla ksenobiyotik kararlı durumuna ulaşmadan gerçekleşmektedir ve arterial kan örneklerinde venöz örneklere göre daha yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır ¹⁵. Emilim ve dağılım fazının devam etmesi arterial konsantrasyonun baskın olması sonucunu eliminasyon fazının baskın durumu

geçtiği durumlarda venöz baskınlık izlenmektedir. Bu durum amitriptilin için 4 kat, eroin için 10 kat farklılık izlenmesine neden olabilmektedir ². Alkol için yaklaşık 90 dakikalık sürede arterial konsantrasyonun venöz konsantrasyonlardan fazla olduğu gösterilmiştir ¹⁶.

Preterminal dönemde veya agoni fazında ksenobiyotik metabolizmasında kardiyak outputun azalması, düşük doku perfüzyonları, hipoksi ve değişmiş pH gradientleri, renal ve hepatik yetmezlikler nedeni ile ciddi değişiklikler izlenebilmektedir. Yüksek miktarda kan kaybının eşlik ettiği travma, plazma kayıpları nedeni ile yanık vakaları ve doku perfüzyonlarının bozulduğu konjestif kalp yetmezliği, sepsis ve septik şok durumlarında dağılım hacimlerinde ve eliminasyonda ciddi değişiklikler izlenmektedir. Siroz, hepatik yetmezlik, portal hipertansiyon gibi karaciğer kan akımının bozulduğu durumlarda metabolizma ve hepatik atılım oranlarında azalma olmaktadır. Renal atılım renal yetmezliklerden ciddi oranda etkilenmekle birlikte immobilizasyon durumunda da normal fiziksel aktivite varlığına göre daha düşük oranlarda atılım izlenmektedir ¹.

Tolerans varlığı reseptör düzeyinde etkinlik azalması ya da metabolizma da enzim indüksiyonu nedeni ile artış sonucunda ortaya çıkmakta olup yüksek dozlarda dahi toksik etkilerin görülmemesini sağlayabilmektedir. Bu durumun aydınlatılmasında uzun dönemli kullanım profilinin incelenmesine olanak veren saç analizi yapılması önerilmektedir ¹⁷.

Bazı toksik maddelerin endojen oluşumları mümkün olabilmektedir. Örnek olarak isopropanol ve aseton fiziksel aktivite ile ve diabetes mellitus hastalarında oluşabilmektedir ¹. Ayrıca bir santral sinir sistemi depresanı olan, terapatik kullanımı olmakla birlikte istismar edilebilen ve sıklıkla ilaçla kolaylaştırılmış cinsel saldırılarda kullanılan gamahidroksibütirat bir nörotransmitter olan GABA'nın metabolizması sonucunda endojen olarak bulunmaktadır ¹⁸.

Toksik etkinin geç dönemli oluştuğu durumlarda toksisiteden sorumlu ksenobiyotiğin eliminasyonu tamamen gerçekleşmiş olabilmektedir. Parasetamol ilişkili hepatotoksisite ve paraquat ilişkili pulmoner fibrozis nedeni ile alımdan birkaç hafta sonra ölümlerin görülebilmektedir ¹⁹.

Geriatric popülasyon ksenobiyotik toksisitesi açısından en hassas popülasyonu oluşturmaktadır. Bu dönemdeki birçok insanın organ disfonksiyonlarına neden olan

ilerleyici hastalıkları bulunmakta ve çoklu ilaç tedavileri kullanmaktadırlar. Yaşla beraber gastrik pH'ta artma, mide boşalma zamanında uzama, splanknik kan akımında azalma, barsak villus atrofi, vücut yağ oranında artma, su yüzdesinde azalma, serum albumi düzeyinde azalma, alfa-1-asit glikoprotein düzeyinde artma, karaciğer kütlesinde ve kan akımında azalma, renal kan akımında ve glomeruler filtrasyon hızında azalma izlenmektedir. Bu durumların doğal sonucu olarak ksenobiyotiklerin ADME süreçlerinde ciddi değişiklikler oluşmaktadır. Atılımın ve metabolizmanın yavaşlaması, albumin düzeylerinde azalma, plazma konsantrasyonlarında artma ile sonuçlanmaktadır. Aynı zamanda homeostatik mekanizmaların yavaşlaması toksik etkiye direnci azaltmaktadır ²⁰.

Kardiopulmoner resusitasyon uygulanması sırasında uygulanan lidokain sol kalp boşluklarından alınan örneklerde yüksek konsantrasyonlarda izlenmektedir. İntravenöz sıvı replasmanı kan konsantrasyonlarında seyrelmeye hatta tespit sınırlarının altına düşmeye neden olabilmektedir. Sürekli ilaç infüzyonu yapan cihazlar ile verilen veya uzun salınımlı transdermal yamalar yoluyla uygulanan ilaçların postmortem dönemde de vücuda alımları devam edebilmektedir ¹.

2.1.2. Ölüm ve Postmortem Dönem

Ölüm ile kardiovasküler sirkülasyonun durması ile dokularda hipoksi meydana gelmektedir. Bu dönemde hücre ölümü tam gerçekleşmemekle birlikte oksijen perfüzyonun sağlanamaması nedeni ile depo glukoz oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP'ye dönüştürülememekte, anaerobik glikoliz ile laktik asite kadar parçalanmaktadır. Hücre içinde biriken laktat intrasellüler pH azalmasına neden olmaktadır. Bu durumun sonucu olarak bazik özellikteki ksenobiyotikler dokularda ekstrasellüler alandan intrasellüler alana geçerek akümülyasyona uğramaktadır ^{1, 21}.

Hücre içi iyon dengesi bozulması ve pH değişikliği hücre ve organel zarları için hasarlayıcı etki yapmaktadır. Lizozomal enzimler bu hasarlanmalar sonrasında serbestleşmekte ve hücre içi diğer yapıların hidrolize etmektedir. Bazik lipofilik karakterdeki ksenobiyotikler intrasellüler kompartmandan tekrar ekstrasellüler aralığı ve intravasküler alana transfer olmaktadır. Aynı zamanda anatomik ve fizyolojik bariyerlerin konformasyonel bozulmaları bu transfer süreçlerini kolaylaştırmaktadır ^{1, 21}. Skopp ve arkadaşlarının postmortem dönemde vasküler geçirgenlik üzerine

yaptıkları çalışmada 120 saatlik sürede vasküler geçirgenliğin postmortem interval ile ilişkili olarak sigmoidal şekilde arttığı saptanmıştır ²².

Erken postmortem dönemde hipostaz ve koagülasyon gelişmeye başlamaktadır. Hipostaz ve koagülasyon alanları yüksek oranda eritrosit bulundurmaktadır. Bu durum özellikle serum intrasellüler dağılımları arasında orantısızlık bulunan ve postmortem intrasellüler alana kayan zayıf bazik özellikteki ksenobiyotikler için ölçüm biaslarının oluşmasına neden olmaktadır ^{1, 21}. Postmortem sıvı kaybı ve sıvıların kompartmanlar arasında transferi aynı zamanda kandaki su oranlarında varyasyonlar oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar postmortem kan su oranlarının %59-89 arasında değiştiğini göstermektedir ¹.

Postmortem sirkülasyon antitesi terminolojik olarak tüm yazarlar tarafından kabul edilmemekle birlikte kan postmortem dönemde intravasküler alanda hareket etmektedir. Kalp kaslarında meydana gelen rigor mortis düşük miktarlarda da olsa kardiak kanın superior vena kava ve boyun venlerine doğru hareketlenmesini, artan intraabdominal basınç nedeni ile abdominal aortadan torasik aortaya, inferior vena kavadan sağ atrium ve superior vena kavaya, sol kalp boşluklarından pulmoner venlere doğru kan hareketi sağlanmaktadır ²¹.

Gastrointestinal kanaldan postmortem bakterial invazyon özellikle yüksek sıcaklıklarda hızla gerçekleşmektedir. Enfeksiyöz nedenler dışında meydana gelen ölümlerde postmortem kan örneklemeleri 6 saat sonrasında bakteriyel üreme saptanabildiği bildirilmektedir ¹. Diğer taraftan perikardial sıvı en geç bakterial üremenin gerçekleştiği sıvı kompartmanı olup bakterial translokasyonun 120 saate kadar sürdürdüğü belirtilmektedir ²³. Kalp kanı üzerinde yapılan kültür sonuçlarında ise 85 saatte üremenin negatif olduğu çalışma örnekleri bulunmaktadır ^{1, 24}. Postmortem toksikoloji için mikrobiyolojik translokasyonun en belirgin etkisi postmortem etanol üretimi şeklinde görülmektedir. Alkolik fermentasyon gerçekleştiren endojen flora üyesi birçok mikrobiyolojik tür bulunmasına rağmen etanol oluşumundan en fazla *Escherichia coli* ve *Candida albicans* türleri sorumlu tutulmaktadır. Özellikle yüksek glukoz depolama kapasitesi bulunan karaciğer, iskelet kası, kalp kası ve akciğer gibi organlar etanol üretimi için major kaynakları oluşturmaktadır ²⁵. Diğer taraftan etanol oksitadif fosforilasyon yeteneği bulunan mikrobiyolojik türler tarafından metabolize olmaktadır. Bakterial translokasyondaki

tür çeşitliliği ve üreme hızları postmortem etanol üretiminde farklılıkların izlenmesine neden olabilmektedir²¹. Bakterial enzimler tarafından ksenobiyotikler ve metabolitleri değişime uğrayabilmektedir. Konjuge metabolitlerin ve ester gruplarının hidrolizi (en sık olarak glukoronidaz enzimi ile E. Coli'nin glukoronid konjuge metabolitleri hidrolizi ve kokainin ekgonin metil estere dönüşümü), azo ve nitro gruplarının redüksiyonu (benzodiazepinlerde nitro gruplarının amino gruplarına dönüşümü), hidrosilasyon, n-asetilasyon, esterifikasyon gibi fonksiyonel grupların eklenmesi, deaminasyon, dekarboksilasyon, n-demetilasyon (methamfetaminin amfetamine dönüşümü) gibi reaksiyonlar bakterial enzimler tarafından gerçekleştirilebilmektedir²⁶.

Hücre ölümü ve enzimatik aktivitenin ölüm sonrasında hemen gerçekleşmemesi ksenobiyotiklerin yıkımının ve metabolit üretiminin devam etmesini sağlamaktadır. Kokain maddesi pH etkisi ile spontan olarak benzoil ekgonine dönüşürken plazmada serbest bulunan kolinesteraz enzimleri tarafından ekgonin metil estere dönüşümü gerçekleşmektedir. Postmortem dönemde de bu dönüşümleri devam ettiği, kokain düzeylerinin azalmasının pH'ın asidite yönünde hareketi nedeni ile sadece spontan hidroliz ile açıklanamayacağı gösterilmiştir²⁷. Bunun yanında enzimatik aktivite ile oluşan ekgonin metil ester ve etanol varlığında karaciğer tarafından oluşan kokoetilen dönüşümlerinin postmortem de gerçekleştiği izlenmiştir^{28,29}. Yamazaki ve Wakasugi tarafından yapılan çalışma³⁰ ile karaciğerde metabolizma enzim aktivitelerinin azalmakla birlikte 48. saate kadar devam ettiği bulunmuştur.

a) POSTMORTEM REDİSTRİBÜSYON KAVRAMI

Curry ve Sunshine'ın 1960 yılında yayımlanan çalışmasında periferik kan örnekleri ile vücut boşluklarından alınan kan örneklerinde barbiturat seviyelerinin farklılıklar olması, femoral ven barbiturat değeri 3 mg/100 ml saptanırken vücut boşluğundan alınan kan örneğinde 22 mg/100 ml bulunması ile bu durumun araştırılmaya değer bir konu olduğu vurgulanmıştır. Özellikle kalp kanının daha güvenilir olabileceği belirtilerek femoral ve kalp kanının sistemik olarak daha yüksek vaka sayılı çalışmalar ile analiz edilmesi tavsiye edilmiştir³¹. Barbiturat üzerine yapılan bir diğer çalışmada postmortem barbiturat seviyeleri kalp kanı ile femoral kan arasında kalp kanı lehine yüksek bulunmuştur. Bu duruma emilim tam gerçekleşmemiş midedeki barbituratın difüzyonunun neden olabileceği bildirilse de mide içeriği ile

kalp kanı arasındaki değerlerin uyumsuzluğu daha çok antemortem dağılımın tamamlanmamasından kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Diğer taraftan femoral kan değerleri uyumsuz bulunarak kalp kanı sonuçlarının daha gerçekçi olduğu sonucu vurgulanmıştır ³².

Terapötik indeksi dar olan ve daha çok kas dokuya dağılan digoksin üzerine yapılan araştırmalarda da kalp kanı konsantrasyonları femoral kan örneklerine göre yüksek saptanmıştır. Postmortem dönemde dokular arasında yeni bir denge oluşmaya başlaması, yüksek konsantrasyona sahip dokulardan kana madde geçişin olmasının bu duruma neden olabileceği belirtilmiştir ³³. Postmortem redistribüsyon terim olarak Koren ve Macleod tarafından kullanılmış olup sıçan kullanarak yaptıkları postmortem digoksin çalışmasında postmortem redistribüsyon nedeni ile kalp kası ve kan değerleri oranının antemortem ve postmortem karşılaştırılmasında 10,6'dan 0,9'a düştüğü gösterilmiştir ve sadece yüksek saptanan postmortem digoksin konsantrasyonlarını kullanarak antemortem digoksin intoksikasyonu hakkında yorum yapmanın güvenilir olmadığını vurgulamışlardır ³⁴.

Pounder ve Jones'un çalışmalarında postmortem redistribüsyonu toksikolojik bir kabus olarak niteleyerek 11 farklı ilaç etken maddesi analiz etmiş, postmortem kan örneklerinde ilaç konsantrasyonlarının örneklenme yapılan alana göre multifaktöriyel olarak ciddi değişiklik gösterdiği ve antemortem kan değerlerinin tahmini için kullanılamayacağı belirtilmiştir ³⁵.

Birçok çalışmaya konu olan postmortem redistribüsyon postmortem dönemde ilaç düzeylerinde sonradan oluşan artış ya da azalışı ifade eden tüm mekanizma ve süreçleri kapsayan genel bir terim olarak kullanılmaktadır ². Postmortem redistribüsyonda etkili olan birçok faktör olduğu yazarlar tarafından kabul edilirken özellikle çevresel şartlar ve ilacın fizyokimyasal ve farmakokinetik özellikleri iki başlık altında toplanmaktadır ². İlacın moleküler büyüklüğü, şekli, elektriksel yükü, pKa değeri, dağılım davranışı, lipofilikliği, dağılım hacmi, protein ya da eritrositlere bağlanma durumu, dokulara afinitesi, perimortem veya erken postmortem metabolik aktivite postmortem redistribüsyonu etkileyen ilacın fizyokimyasal ve farmakokinetik major özellikleri olarak belirtilirken major çevresel etkenler olarak başlangıç konsantrasyonu, pH, sıcaklık, postmortem interval, hipostaz ve koagülasyon, postmortem dolaşım, cesedin pozisyonu, bakterial translokasyon bildirilmektedir ².

Kalp kanı pH değerinin erken postmortem dönemde hızla azaldığı gözlenmiştir. Sıçan deneylerinde karbondioksit solunumu ile ötenazi uygulandığında ilk 5 dakikada pH değerinin 7,34'den 6,74'e gerilediği görülmüştür. 48. saat ve 96. saatlerde yapılan ölçümlerde sırasıyla 5,74 ve 5,55'e gerilediği izlenmiştir. Hayvanlara servikal dislokasyon ile ötenazi uygulandığında da benzer bir şekilde pH'ın düştüğü ve ötenazi yöntemleri arasında pH değişikliği açısından anlamlı farklılık olmadığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada postmortem insan vakalarında yapılan ölçümlerde ilk 20 saatde kalp kanı pH'ının 5,60' a kadar düşmektedir. Postmortem ilk 4 gün için devam eden pH düşüşünün 4. gün sonrasında tekrar yükselmeye başladığı belirtilmektedir ³⁶. Postmortem redistribüsyon için önemli değişkenlerden biri olarak belirtilen pH, bu önemine rağmen çalışmalarda çok sık değerlendirilmemektedir. Flekainid ve donepezil etken maddeleri ile yapılan çalışmalarda pH gradientinin postmortem redistribüsyon üzerine etkileri incelenmiştir. Flekainid bazik özellikte pKa değeri 9,36 olan bir etken madde olup tavşanlar üzerinde yapılan çalışmada kardiyopulmoner resüsitasyon ve postmortem perfüzyon ile sağ ve sol kalp boşlukları, akciğer, karaciğer, myokard ve antemortem periferik kan örnekleri karşılaştırılmıştır. Tüm organ analizlerinden elde edilen sonuçların antemortem periferik örnek kan değerinden yüksek olduğu, en yüksek organ depolamasının karaciğer ve akciğerlerde gözleendiği, kalp kanlarının pH değerlerindeki azalmanın kardiyak kan flekainid konsantrasyon artışı ile korele olduğu, uygulanan kardiyopulmoner resüsitasyon işleminin postmortem redistribüsyonu artırıcı ve pH değerlerini azaltıcı etkisinin olduğu, akciğerler üzerine yapılan perfüzyon çalışması ile akciğerde perfüze olan sıvının pH değeri değiştirilerek asidik pH'a doğru kaydırıldığında akciğerlerden redistribüsyona uğrayan madde miktarının arttığı, asidik pH'dan nötral pH'a doğru gidildiğinde ise redistribüsyonun azaldığı gösterilmiştir ³⁷. Donepezil ile yapılan sıçan çalışmasında pH değerlerinin erken postmortem dönemde (ilk 3 saat) periferik kanda ve kalp kanında benzer şekilde değiştiği, kalp kanının daha yüksek postmortem redistribüsyona maruz kaldığı, flekainid çalışmasına benzer şekilde yapılan perfüzyon çalışmasında pH asidik yönde kaydırıldığında benzer sonuçlar elde edildiği, fakat sabit tutulduğunda redistribüsyonun daha sınırlı düzeyde gerçekleştiği bulunmuştur ³⁸. İki etken maddenin de bazik özellikte olması, birbirine yakın pKa değerlerinin bulunması (donepezil pKa: 8,90, flekainid pKa: 9,36), dağılım hacimlerinin fazla olması ve

lipofilik karakterde olmaları pH değişimi ile ortaya çıkan bu sonuçların sebebi olarak belirtilmektedir ^{37, 38}. Bazik karakterli ilaçlar için benzer postmortem redistribüsyon karakteristiği öngörülmekte ve postmortem redistribüsyon tahmini için benzer çalışmalarla dağılım sabitleri ve çözünme katsayılarının hesaplanmasının faydalı olacağı düşünülmektedir ³⁸.

Postmortem interval ile postmortem redistribüsyonun etkilendiği birçok yazı da vurgulanmaktadır. Postmortem redistribüsyonun özellikle postmortem ilk 1 saat içinde büyük oranlarda depo dokulardan pasif difüzyonla ortaya çıktığı belirtilmektedir. İlerleyen postmortem interval ile difüzyonun devam ettiği, bakteriyel translokasyon ile maddenin bakteriyel metabolizması ya da yapısal degradasyon nedeni ile konsantrasyonlarda değişiklikler izlenebileceği bildirilmektedir ³⁹. Diğer taraftan postmortem interval ile postmortem redistribüsyon arasındaki ilişki sınırlı sayıda insan vakalarında yapılmış çalışma ile incelenmiştir. Gerostamoulos ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada morg kabulü ile otopsi sırasında alınan örnekler karşılaştırılarak 105 madde ve metaboliti analiz edilmiş ve örnekler arasında anlamlı farklılık gösteren sonuçlar elde edilmiştir. İki örnek alımı arasında geçen zaman ortalama 6,4 gün olarak belirtilmiş ve konsantrasyon değişiklikleri ile arasında açık ilişki bulunamamıştır ⁴⁰. Lemaire ve arkadaşlarının çalışmasında morfin, metadon, diazepam ve metabolitleri analiz edilmiş ve hesaplanan postmortem intervalin ve aynı vakadan yapılan aralarında en az 24 saat bulunan örneklemelerin, geçen zamandan etkilendiği gösterilmiştir ³⁹. Saar ve arkadaşlarının antipsikotik ilaçlar ile yaptıkları postmortem tekrarlı örneklemeler ile yaptıkları çalışmada antipsikotik ilaçların postmortem örneklemeler arasında tüm ilaçlar için en az %40 değişiklik izlendiği gösterilmiştir. Aynı kişilerden yapılan tekrarlı analizlerin kendi içerisinde anlamlı şekilde yüksek varyasyon gösterdiği, zamanla korelasyon göstermediği, farklı günlerde yapılan analizlerde aynı ilaç düşüşlerin bulunduğu belirtilmiştir ⁴¹.

Maddelerin dağılım hacimlerinin yüksek olmasının ve yüksek lipofilik karakter göstermesinin postmortem redistribüsyon için yatkınlık oluşturan faktörler olduğu belirtilmektedir ¹⁹. Dağılım hacmi aynı zamanda maddenin lipofilik karakterine, plazma proteinlerine bağlanma özelliklerine göre değişim gösterebilmektedir. Lipofilisitenin gösterilmesi için oktonal su ayrışma katsayısı kullanılmakta ve daha

yüksek değerler yüksek lipofilik karakter ile ilişkilidir. Sertralin, amitriptilin, klomipramin gibi oktonal su ayrışma katsayısı yüksek (195000, 87000, 158500 sırasıyla) olan maddelerin yüksek dağılım hacmi (20 l/kg, 14,5 l/kg, 14,5 l/kg sırasıyla) bulunmakta ve aynı zamanda postmortem redistribüsyona uğramaktadırlar. Diğer taraftan venlafaksin gibi düşük oktonal su ayrışma katsayısı bulunmasına (2,7) rağmen dağılım hacminin yüksek olması (7,5 l/kg) mümkün olabilmektedir. Maddelerin içerisinde buldukları sıvıların pH değerleri iyonize olma durumlarını etkileyerek lipofilik ve hidrofilik özellikler arasında geçişler yapmasına neden olmaktadır. İyonize olan ve olmayan formun eşit oranda bulunduğu pH değeri maddeler için pKa değerini oluşturmakta ve bu maddeler pKa üzerindeki pH değerlerindeki sıvı içerisinde iyonize hale dönüşmekte ve hidrofilik karakter kazanmaktadır. Fizyolojik pH'tan (7,34-7,44) yüksek pKa değerlerinde maddeler yüksek dağılım hacmine ve yüksek postmortem redistribüsyona sahip olma eğiliminde olması beklenmektedir ¹⁹. Birçok yazar dağılım hacminin 3 l/kg üzerinde olmasını postmortem redistribüsyonun gerçekleşeceğine dair işaretçi olarak belirtmektedir ⁴²⁻⁴⁴. Diğer taraftan dağılım hacmi 1 l/kg olan asitaminofenin postmortem redistribüsyona uğramasına rağmen dağılım hacmi 4,84 l/kg olan lipofilik özellikteki mirtazapin için belirgin bir postmortem redistribüsyon belirtilmemesi genel bir kural olarak kabul edilmemesi gerektiğini göstermektedir ²¹. Gerostamoulos ve arkadaşları dağılım hacmi ile tekrarlı ölçümlerde konsantrasyon değişikliğini incelediğinde yüksek dağılım hacmine sahip ilaçlar için ölçümler arasında beklenen yükselmelerin gözlenmediğini ve güvenilir bir indikatör olmadığını vurgulamışlardır ⁴⁰. Yazılım destekli olarak ilaçların moleküler büyüklüğü, içerdiği atom çeşitleri ve sayısı, moleküler yapısı, çözünürlük özellikleri gibi parametreler dikkate alınarak yapılan postmortem redistribüsyon modellemelerinde daha önce postmortem redistribüsyon paternleri araştırılmış 77 ilaçtan %77'sinde tutarlı tahminler yapılırken bu durum lipofilik karakterli dağılım hacimleri yüksek trisiklik antidepressan ve benzodiazepinler üzerine yapılan incelemede maprotilin hariç literatür ile uyumlu sonuçlar tahmin edilmiştir. Yazılım modellemeleri özellikle trisiklik antidepressan ve benzodiazepinler ile ayrı ayrı gerçekleştirildiğinde farklı moleküler özelliklerin postmortem redistribüsyon üzerine farklı katsayılarla etki gösterdikleri saptanmıştır ^{45, 46}.

Postmortem redistribüsyonun gerçekleşme mekanizması olarak iki temel yol üzerinde durulmaktadır. Bunlar organlardan direk çevre dokulara difüzyon ve damar yolları aracılığıyla difüzyondur ²¹. Emilimi ve dağılımı gerçekleşmiş, rezervuar organlarda depolanmış ya da emilimi tamamlanmamış ve gastrointestinal kanalda yüksek miktarlarda bulunan maddeler postmortem dönemde yoğun olarak buldukları dokulardan salınmaya başlanmaktadır. Midede absorbiyonu tamamlanmamış maddeler damar yolu aracılığı ile erken postmortem dönemde inferior vena cava ve kalp boşluklarına transfer olmaktadır. Hayvan deneylerinde bu sürenin 2 saat kadar kısa olabileceği bildirilmektedir ⁴⁷. Diğer taraftan supin pozisyonda olan bir ceset için pasif difüzyon ile karaciğer sol lobu, diyaframı geçerek akciğer sol alt lobu, perikardiyal sıvı ve miyokart dokusuna geçiş olabildiği belirtilmekte ve pasif difüzyon ile çift organlardan sol tarafta bulunanlar da daha yüksek konsantrasyonlar ölçülmektedir ⁴⁸. Postmortem redistribüsyonda emilimi tamamlanmamış mide içeriği ile ilgili diğer bir karıştırıcı faktör postmortem regürjitasyon ile ortaya çıkmaktadır. Regürjitasyon ile mediastene taşınma sonucunda hem buradan direk difüzyon ile çevre dokular özellikle aorta hem de hava yollarına geçen mide içeriği aracılığıyla akciğerler, pulmoner damarlar ve kalp kanı kontamine olabilmektedir ²¹.

Akciğerlerde dolaşımdaki kanın tümünün sirküle olması, dağılıma izin veren yoğun kapiller sistem varlığı nedeni ile zayıf bazik, $pK_a > 8$ olan ve lipofilik karakterdeki maddeler için akciğerler antemortem dönemde yoğun redistribüsyonun meydana geldiği organlardır. Postmortem redistribüsyon için akciğerler yüksek damarlanması, alveollerdeki geniş yüzey alanı ve ince difüzyon membranı varlığı nedeni ile en etkin odak olarak düşünülmektedir. Moriya ve Hashimoto çalışmalarında sol kalpte saptanan konsantrasyonların sağ kalpte saptananlara göre daha yüksek olmasının nedeni olarak akciğerlerden direk difüzyondan daha çok vasküler aracılı postmortem redistribüsyonun gerçekleştiği olarak belirtmiştir. Ayrıca pulmoner venlerin arterlerine oranla daha baskın olduğu, bu durumda venlerdeki damar yapısının arterlere göre daha ince olmasının etkili olabileceği düşünülmüştür ⁴⁹. Kalp kanında saptanan yükselmenin kaynağının tahmini için Hilberg ve arkadaşları myokardda saptanan konsantrasyon ile kalp kanında saptanan konsantrasyon karşılaştırılmasında kalp kanındaki daha yüksek konsantrasyonların pulmoner damarlar aracılığı ile gerçekleştiğine işaret ettiğini vurgularken perikardiyal ölçümler ile yapılan

karşılaştırma sonucuna göre perikardiyal sıvı>kalp kanı ise mideden difüzyonun baskın olduğu, kalp kanı>perikardiyal sıvı ise redistribüsyonun akciğerler kaynaklı olduğunun söylenebileceği belirtilmiştir ^{49, 50}. Akciğer kaynaklı diğer bir redistribüsyon mekanizması olarak karaciğerlere akciğerlerden olan difüzyon şeklinde tanımlanmıştır. Bu difüzyonun gerçekleşmesinde diafragma önemli bir bariyer olarak görülmekle beraber peritonel ve plevral sıvıların aracılığında bu durumun olabileceği gösterilmiştir ⁵¹.

Karaciğer postmortem redistribüsyonda hem salınım hem transfer için odak organ olabilmektedir. Karaciğerden salınım büyük oranda hepatik ven yoluyla inferior vena cava ve kalp boşluklarına olmaktadır. Diğer taraftan mide, proksimal duodenum ve safra kesesine difüzyon yoluyla salınım da gerçekleşebilmektedir fakat hepatik ven yoluyla salınım göre daha önemsiz görülmektedir. Redistribüsyon odağı olarak karaciğere özellikle sol loba mideden emilimi tamamlanmamış maddeler transfer olabilmektedir ²¹.

Miyokarttan salınım için en iyi örnek digoksin olup miyokart konsantrasyonları kalp kanından 30 kat daha fazla saptanmaktadır. Kalsiyum kanal blokörleri ve quinidin için de benzer dağılım özellikleri belirtilmektedir. Bu ilaçlar postmortem dönemde miyokarttan hızla kalp kanına diffüze olmaktadır. Kalp kanına redistribüsyon akciğer, karaciğer ve mideden de izlenmekte ve asıl dramatik yükselişten konsantrasyon artışından bu redistribüsyonlar sorumlu olup biventriküler konsantrasyon artışının gösterilmesi durumunda miyokarttan difüzyonun ön planda düşünülebileceği belirtilmektedir ^{21, 52}.

Yağ doku birçok lipofilik madde için depo görevi görmekle birlikte yağ dokunun kanlanmasının az olması antemortem distribüsyonun gerçekleşmesinin uzun süre almasına neden olmaktadır. Diğer taraftan tam gerçekleşmemiş distribüsyon postmortem kandan yağ dokuya difüzyon olabilmektedir. Ayrıca livor mortisin yağ dokuda konsantrasyon değişikliği oluşturup oluşturmadığı hakkında yapılan insan çalışmalarında amfetamin, metamfetamin ve benzoilekgonin için farklılık izlenmediği gösterilmiştir ^{21, 44}.

Kemik iliği yapısında yüksek oranda lipid içermesi ve vasküleriteden zengin olması nedeni ile birçok madde için depo görevi görebilmektedir. Kanda saptanan madde değerleri ile korelasyon göstermesi sebebiyle postmortem analizlerde

kullanılabileceğine yönelik literatürde tasiyeler bulunmaktadır ^{44, 53}. Ek olarak Winek ve arkadaşlarının nortriptilin üzerine yaptıkları çalışmada postmortem kemik iliği örneklerinin postmortem 24 saate kadar stabil kaldığı gösterilmiştir ⁵⁴. Diğer taraftan Maskell ve arkadaşlarının diasetilmorfinin postmortem redistribüsyonu üzerine yaptıkları çalışmada postmortem tavşan kemik iliği örneklerinde postmortem 24 saatte morfin ve morfin-3- β -glukoronid metabolitlerinde artış gözlenirken 6-MAM metabolitinde kayıplar olduğu dikkati çekmektedir ⁵⁵.

2.1.3. Örnekleme ve Örneklerin Özellikleri

Vakadan vakaya değişiklik göstermekle birlikte postmortem toksikolojik analizlerde örnekleme yapmak, vakanın tümü için güvenilir bir değerlendirme yapabilmek için kaynağı belli, örneklendiği dokunun tümünü yansıtabilecek parçalar elde etmeyi hedeflemektedir ve postmortem analizler için en önemli basamak olarak görülmektedir. Örneklerin alınımının özellikle kan, idrar, beyin omurilik sıvısı ve çürüme bülleri örneklenmesinin otopsi işlemlerine başlanmadan yapılması, disseksiyonlar yapıldıktan sonra alınması gereken örneklerin ise organ disseksiyonları yapılmadan alınmasının uygun olduğu vurgulanmaktadır. Her örnek için kontaminasyonun engellenmesi amacıyla örnekleme için tek kullanımlık uygun enjektörler ile yapılması önerilmektedir. Toplanan her örneğin en iyi örnek kabı olarak ayrı ayrı cam kaplarda muhafaza edilmesi tavsiye edilmekle birlikte örnek kabı kırılma riskinin yüksek olması nedeni ile sert plastik tüpler ve Nalgene şişelerde saklanması daha uygun olacağı belirtilmektedir. Uçucu madde analizi gereken durumlarda yapılacak örnekleme buharlaşma miktarının minimize etmek için örneklerin saklama kaplarını tama yakın derecede doldurması gerekliliği vurgulanmaktadır ⁴⁴.

Kan örneklerinin otopsiye başlanmadan önce femoral venden alınması tavsiye edilmektedir. Femoral venden alınan örneklerin postmortem redistribüsyondan daha az etkilendiği belirtilmektedir. Diğer taraftan kardiyak kan örnekleme yaparken intrakardiyak örnekleme yapmak ile kalp açıldıktan sonra perikardial aralıktan toplanmasının arasında ciddi farklılık olmadığı vurgulanmaktadır. Ayrıca hastane başvurusu sırasında alınan kan örneklerinin otopsi sırasında alınan kan örneklerinden daha değerli olduğu söylenmektedir ⁴⁴.

Kan örneklemesinin farklı damarlardan yapılmış olması ya da örnekleme yapılan damar proksimalinin klemplenmesinin kan örneklerinden elde edilen analiz

sonuçlarını etkilediği gösterilmiştir. Popliteal ven ve femoral venden yapılan örneklemeler arasında popliteal venden yapılan örneklemelerin analiz sonuçlarının daha düşük olduğu ve gövdede meydana gelen postmortem değişikliklerden ve redistribüsyondan daha az etkilendiği belirtilmektedir. Diğer taraftan örneklemeler sırasında damar proksimalinin klemplenerek muhtemel gövde damarlarından kan aspirasyonunun engellenmesinin de düşük analiz sonuçları ve daha gövde madde değişikliklerinden etkilenme sonuçlandığı gösterilmektedir. Benzodiazepinler gibi gövdede postmortem degradasyonu gerçekleşen maddeler istisna olarak tutulduğunda en yüksek madde analiz sonuçlarının kardiyak kan örneklerinden elde edildiği ve bunun en önemli sebebinin özellikle postmortem redistribüsyon olduğu vurgulanmaktadır. Aynı vakada farklı zaman dilimlerinde yapılan birden fazla örneklemeler ile popliteal, femoral ve subklavian örneklemelerde zamanla değişimler olduğu ve postmortem redistribüsyona periferik damarların daha dirençli olduğu saptanmaktadır ^{39, 56, 57}. Diğer taraftan Hargrove ve arkadaşları femoral örneklemeler sırasında yapılan klemplenmenin etkisini göstermek için sertralin, paroksetin, sitalopram, diazepam, alprazolam, difenhidramin, promethazin ve hidrokodon maddeleri ile yaptıkları çalışmada klempleyerek alınan örnekler ile körlemesine yapılan örneklemeler arasında anlamlı farklılık olmadığını göstermiştir ⁵⁸.

Periferik ve santral kan örneklemelerinden yapılan analiz sonuçlarının oranlaması postmortem redistribüsyon için gösterge olarak kabul edilmektedir. Han ve arkadaşları tarafından 76 sık karşılaşılan ajanın santral ve periferik örnek sonuçları oranları proksifilin, karbamezapin ve bromazepam gibi ajanlar hariç birçok ajanın postmortem redistribüsyon nedeni ile periferik ve santral kan örnek sonuçlarının birbirine uyumlu olmadığı gösterilmiştir ⁵⁹. Launiainen ve Ojanperä retrospektif olarak 11 yıllık postmortem femoral kan örneklerinde 50 ve daha fazla defa saptanan 129 ajan ile bu ajanların antemortem terapötik aralıklarını karşılaştırdığında %47'sinin antemortem terapötik aralık ile uyumlu olduğunu, %17'sinin terapötik aralıktan düşük, %35'inin yüksek saptanığını, düşük saptanan ajanların daha çok nötral, asidik ve suda çözünür özellik gösteren veya plazma proteinlerine sıklıkla bağlanan ajanlar olduğunu, bazik ve lipofilik karakterde olan ajanlarını ise terapötik aralıktan yüksek bulunduğunu, ayrıca bu durumun ajanların dağılım hacimleri ile korelasyon göstermediğini belirtmişlerdir ⁶⁰.

İdrar örneklemesinden elde edilen sonuçlar antemortem maruz kalınan maddeler hakkında bilgi verici olmakla birlikte sonuçların maddelerin farmakolojik etkileri ile korelasyon göstermemesi ve akut toksisite durumunda idrar örneklerinin negatif olması ihtimali en önemli dezavantajdır. Bu nedenle idrar örneği maddelerin böbrekler tarafından daha konsantre şekilde depo edildiği örnek olması da göz önünde bulundurularak postmortem toksikolojik analizler için daha çok tarama örneği olarak kabul edilmektedir ⁴⁴.

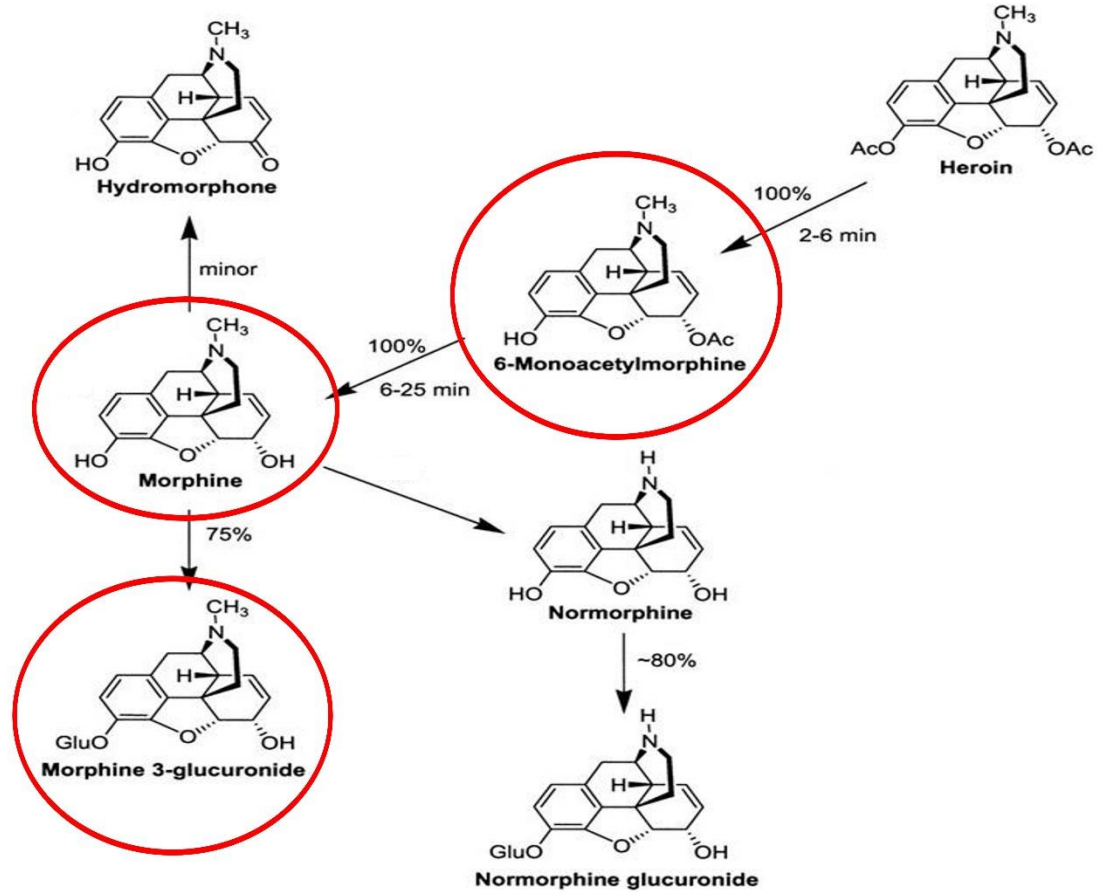
Safra örneği karaciğerde metabolize olan ve enterohepatik sirkülasyona uğrayan maddeler için ana depolanma alanını oluşturmaktadır. Saptanan maddeler kandan birkaç kat daha yüksek konsantrasyonda olması ve daha uzun süreli maruziyet göstermesi en önemli avantajıdır. Tominaga ve arkadaşlarının yaptığı çalışma sonucuna göre özellikle amfetamin, soğuk algınlığı ilaçları, fenobarbital ve fenotiazinin safra konsantrasyonları ile kan konsantrasyonları arasında korelasyon bulunurken korelasyonun santral kan örneklerine göre periferik kan sonuçları ile daha yüksek saptadığı belirtilmektedir. Diğer taraftan degradasyon ve konjugasyon metabolizmasındaki kişisel farmakokinetik ve genetik farklılıkların korelasyon saptanamayan diğer maddeler için önemli rol oynadığı vurgulanmaktadır ^{44, 61}.

Göz içi sıvısı travmadan etkilenmemesi, mikroorganizmadan fakir olması ve çürüme süreçlerinden uzakta olması nedeni ile postmortem toksikolojik incelemeleri için en değerli örneklerden biri olarak kabul edilmektedir. En önemli kullanım alanlarından biri postmortem endojen ve eksojen etanol ayırımıdır. Postmortem etanol üretimine neden olan bakteriyolojik kontaminasyondan etkilenmemesi nedeni ile en güvenilir sonuçların elde edilmesini sağlamaktadır ⁴⁴.

Kemik iliği yüksek vaskülerite ve lipid oranı ile madde depolanması için uygun doku özelliklerini taşımakla birlikte kemikle kapalı bir alanda bulunması, diğer dokularla temasının sınırlı olması ve bakteriyel translokasyondan korunması ile dikkat çeken bir alternatif matristir. Kemik iliği ile yapılan hayvan çalışmalarında tavşanlarda kan konsantrasyonları korelasyon bulunurken domuzlarla korelasyon saptanamamıştır ⁴⁴.

2.2. EROİN VE POSTMORTEM REDİSTRİBÜSYON

2.2.1. Farmakolojik Özellikleri ile Eroin



Şekil 1. Eroin metabolizması

Eroin vücuda girdikten sonra hızla 6-monoasetil morfine (6-MAM) ve morfine dönüşmektedir. Bu işlemlerin tamamı çok kısa bir sürede gerçekleşmekte ve plazma serbest esterazları bu dönüşümün hızını artırmaktadır. Vücuda alınan eroinin büyük bir kısmının ilk 1 saat içinde morfine dönüşmesi beklenmektedir. Morfin ise karaciğer UDP-glukronil-transferazları ile morfin-3-beta-glukuronit (M3BG), morfin-6-beta-glukuronit ve morfin-3-6-beta-glukuronite dönüşerek atılımı sağlanmaktadır. Glukuronit formasyonları arasında en fazla %75 oranında morfin-3-beta-glukuronit dönüşümü gerçekleşmektedir. Glukuronit formasyonlar ayrıca enterohepatik

sirkülasyona uğrayarak tekrar olarak emilim sağlanmaktadır. Normofin ve hidromorfin metabolitleri ise çok küçük (<5%) miktarlarda oluşmaktadır⁶².

Eroin yüksek lipofilitesi nedeni ile hızla dokulara dağılma eğilimindedir ve dağılım hacminin 60-100 litre kadar olduğu düşünülmektedir. Lipofilitesi sayesinde kan beyin bariyerini morfine göre daha kolay geçebilmektedir. 6-MAM'ın plazma yarı ömrü yaklaşık 30-40 dk olup plazmadan 2-3 saate kadar tespit edilebilmektedir. Morfine dönüşüm tamamlandıktan sonra enterohepatik sirkülasyonunda etkisi ile yarılanma ömrü 6 saate kadar uzayabilmektedir ve metabolitler kısa sürede denge konsantrasyonuna ulaşarak arteriovenöz farklılık izlenmemektedir^{62, 63}.

2.2.2. Hayvan Çalışmaları

Postmortem hayvan çalışmaları ilk olarak 1988 yılında Sawyer ve Forney tarafından başlatılmış olup ratlara 5mg/kg dozunda morfin intravenöz olarak verilmiştir. Postmortem 24, 48 ve 96. saatlerde örneklemeler yapılarak redistribüsyon değerlendirilmiştir. Antemortem 2 saat aralıklarla yapılan örneklem sonucunda kanda bölgesel değişimlerin izlenmediğini bildirmişlerdir. Ölüm sonrasında entemortem şüfzyon sonrasında değişik intervallerde (15, 30, 60, 120 ve 240 dk) erken postmortem dönemde (5 dk) yapılan örneklemelerde antemortem orbital sinüs kanı ile kalp kanı konsantrasyonları arasında belirgin farklılık izlenmiş ve kalp kanı konsantrasyonlarının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Yapılan pH çalışmalarında dokular pH değerleri ile dokulardaki morfin değişimleri arasında kuvvetli korelasyon saptanmıştır. Düşük pH değerlerine sahip dokularda daha yüksek oranda değişimler olduğu gözlemlenmiştir⁶⁴. 1992 yılında Koren ve Klein'in yaptığı çalışmada morfin 4 mg/kg dozunda intramuskuler olarak verilmiş ve kalpten yapılan tekrarlı örneklemeler yapıldığında bu örneklerdeki morfin konsantrasyonunun 2,7 – 5,6 kat kadar yükselme gösterdiği gözlenmiştir. 24. saatte alınan kalp kanlarındaki konsantrasyon değişikliği yükselme yönünde izlenirken 96. saat örneklerinde daha değişken bir seyir buunmuştur. Çalışmada periferik değer ölçümleri yapılmamıştır⁶⁵. Crandall ve arkadaşlarının yaptığı domuz çalışmasında sağ ventrikülden yapılan tekrarlı örneklemelerde morfin konsantrasyonlarının artma eğiliminde olduğu gözlenirken zamana bağlı olarak anlamlı olarak değiştiği ve çalışmanın sonucunda postmortem analiz sonuçlarından antemortem konsantrasyonları tahmin etmenin problemli olduğu

belirtilmiştir ⁶⁶. Maskell ve arkadaşları yaptıkları tavşan çalışmasında 1 mg/kg intravenöz eroin infüzyonu sonrasında yarım saat ve 24 saat örneklerinde doku konsantrasyonlarında femoral kan analizleri dahil belirgin değişiklikler gözlemlemiştir ⁵⁵.

2.2.3. İnsan Çalışmaları

Logan ve Smirnov tarafından 32 postmortem vaka üzerinde 2 farklı zamanda gerçekleştirilen tekrarlı örnekleme ile zamanla femoral ve ventriküler kan konsantrasyonları arasında anlamlı farklılık izlenmezken ventriküler kan konsantrasyonlarının femoral kan konsantrasyonlarına göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur. Eşleştirilen 30 adet ventriküler ve femoral kan konsantrasyonlarında ventriküler/femoral oranı 0,15 ile 9,21 arasında değişmekle birlikte ortalama 2,16 olarak saptanmıştır. İliak kan örnekleri ile femoral kan örnekleri arasında korelasyon daha çok düşük konsantrasyonlar için gözlenirken konsantrasyonunun 0,3 mg/L'yi geçtiği vakalarda iliak konsantrasyonların daha yüksek ölçüldüğü ve bu durumun zamandan daha çok yüksek konsantrasyonlar ile ilişkili olduğu belirtilmiştir ⁶⁷. Skopp ve arkadaşlarının dört morfin intoksikasyonu vakasından otopsi sırasında farklı bölgelerden yaptıkları kan örneklemleri ile en yüksek konsantrasyonların vena cava inferiordan ölçüldüğü ve bölgeler arasında konsantrasyonların aynı vakada belirgin farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. Çalışma sırasında kan örneklerinin su oranı ölçülerek düşük su oranına sahip örneklerde daha düşük konsantrasyonların bulunduğu belirtilmiştir. M3BG konsantrasyonları morfine oranla daha yüksek olup düşük dağılım hacmine sahip M3BG'in vasküler yapılardan pasif diffüzyonun morfine göre daha hızlı gerçekleştiği ve örneklem bölgeleri arasında konsantrasyon farklılıkları gözlenebildiği vurgulanmıştır ⁶⁸. Vasküler geçirgenlik postmortem dönemde daha büyük oranda damar içinden dışına doğru izlenirken sıcaklık, konsantrasyon, molekül büyüklüğü faktörlerinin geçişleri etkilemektedir. Morfin glukuronitlerinin morfine göre daha yavaş diffüze olduğu, difüzyonun 4° C'de 20° C'ye göre daha yavaş gerçekleştiği, damar duvarındaki otoliz miktarı arttıkça kolaylaştığı gösterilmiştir ⁶⁹. Gerostamoulos ve Drummer tarafından 40 vaka üzerinden subklavian, femoral ve kalp kanları pH, morfin ve metabolitleri yönünden incelenmiş ve bölgeler arasında anlamlı pH değişikliği ve subklavian konsantrasyonlar ile kalp kanları arasında belirgin konsantrasyon farklılığı saptanmamakla birlikte kalp

kanının %10-12 arasında daha yüksek sonuçlar verdiği görülmüştür. Sonuç olarak morfin ve metabolitlerinin belirgin postmortem redistribüsyon göstermediği belirtilmiştir⁷⁰. Levine ve arkadaşları 126 morfin ilişkili ölüm olgusunda kalp kanı ile santral kan konsantrasyonları oranını akut ölüm olguları için 1,40 (max - min; 0,4 - 6,9) olarak saptamıştır ve bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ifade etmiştir. Diğer taraftan akut olmayan ölümlerde bu oran 1,18 (max - min; 0,4 - 4,0) olarak bulunmuştur⁷¹. Crandall ve arkadaşlarının 44 olguluk serilerinde aynı olguda yapılan çoklu örneklem ile farklı bölgelerden alınan örnekler arasında yüksek varyasyon izlendiği, santral konsantrasyonların daha yüksek ölçülmesine rağmen yüksek varyasyon ve olgu sayısının azlığı nedeni ile istatistiksel anlamlılık saptanamadığı, femoral venden konsantrasyonlar diğer örnek konsantrasyonlarına oranlandığında FA/FV: 1,21, LV/FV: 1,88, RV/FV: 1,51 olarak bulunmuştur⁷². Tolliver ve arkadaşlarının antemortem kan sonuçları bilinen 7 vaka üzerinden yaptığı çalışmada postmortem kan konsantrasyonlarının antemortem konsantrasyonlara göre daha yüksek olduğu, postmortem interval arttıkça postmortem redistribüsyonun giderek arttığı, antemortem kullanımı takiben iki yarılama ömrü içerisinde toplanan örneklerden elde edilen değerlerin daha güvenilir olabileceği belirtilmiştir⁷³. Gerostamoulos ve arkadaşları morg girişi ve otopsi sırasında farklı iki zaman diliminde yaptıkları tekrarlı örneklemeler ile postmortem intervali ortalama yaklaşık 60 saat olan 11 vakada morfin oranlarının öncesi/sonrası şeklinde 0,97, 6-MAM oranlarının 0,47 olduğu bulunmuştur. 6-MAM değerlerindeki düşüşler maddenin yapısının instabil olması ve postmortem devam eden plazma esteraz aktivitesine bağlanırken 6-MAM dönüşümü ile oluşan morfinin morfin konsantrasyonlarında belirgin değişikliğe neden olmadığı bulunmuştur⁴⁰. Rees ve arkadaşlarının 70 vakalık çalışmasında postmortem interval bulguları bilinmemekle birlikte gecikmiş ölümlerde morfinin femoral kan ve vitröz sıvı oranının arttığı, akut ölüm vakalarında ise birin altında olduğu, 6-MAM için femoral kana oranla vitröz sıvıda daha yüksek miktarda tespit edilme eğiliminde olduğu bulunmuştur. Kullanım sonrası hayatta kalma süresi ya da tekrarlı kullanım gibi drumların vitröz sıvı konsantrasyonlarına etkisinin olduğu ve femoral kanla korelasyon bulunduğu belirtilen çalışmaların aksine vitröz sıvının kan değerlerini anlamlı olarak yansıtmadığı ve birlikte değerlendirilmelerinin uygun olduğu vurgulanmıştır⁷⁴. Pragst ve arkadaşları tarafından ise 29 eroin intoksikasyonu

vakasında morfin kanda vitröz sıvıya göre daha yüksek konsantrasyonlarda ölçülmüştür ⁷⁵. Hargrove ve Molina tarafından postmortem femoral venden klemlenerek ve klemlenmeden gerçekleştirilen 3 farklı zaman dilimindeki örneklemeler sonucunda yapılan tekrarlı ölçümler arasında ve klemlenme durumu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı gösterilmiştir. 3. örnekleme zamanında toplanan subklavian kan konsantrasyonları ile femoral konsantrasyonlar karşılaştırıldığında subklavian konsantrasyonların anlamlı olarak daha yüksek olduğu gösterilmiştir ⁷⁶.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma protokolü Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından değerlendirilerek 28/03/2017 tarihli 2017/22-2 numaralı kararı ile Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne uygun bulunarak onaylanmıştır. Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Projeler Birimi tarafından THD-2018-16806 proje kodu ile desteklenmiştir.

3.1. ÇALIŞMA PROTOKOLÜ

Çalışmada 48 adet 5-6 aylık 2-3 kg ağırlıklarında Yeni Zelanda Tavşanı kullanılmıştır. Mortalite oranları yüksek ve sıkça suiistimal edilen eroin 1 mg/kg dozunda lateral kulak venine uygulanmıştır. Bu aşamada postmortem koagülasyonun engellenmesi amacı ile her tavşana 1000 U/kg heparin uygulaması yapılmıştır. İnfüzyonu takiben 1 saat dağılımın metabolizmanın sağlanması için beklenmiştir. 1 saat sonunda tüm tavşanlardan kan örneği alınmış ve karbonsioksit inhalasyonu ile ötenazi işlemi uygulanmıştır. Ötenazi işleminden sonra 3 tavşan kontrol gurubu olarak belirlenmiş ve bekletilmeden otopsileri yapılarak örnekleri alınmıştır. Geriye kalan 45 tavşan 3 guruba ayrılarak açık hava, tatlı su, tuzlu su ortamlarında bekletilmiştir.

3.1.1. Ortam Özellikleri ve Deney Düzeni

15 tavşan açık hava şartlarında bekletilmiştir. Açık hava ortamı olarak bir iklimlendirme kabininden faydalanılarak çalışmanın olası değişkenleri olan sıcaklık ve nem koşullarının sabit olması sağlanmıştır. 15 tavşan postmortem dönemde 25 derece sıcaklık ve %40 nem sabiti ile 5 gruba ayrılarak deney düzeninden 30. dakikada, 2. saatte, 6. saatte, 12. saatte ve 24. saatte çıkarılarak otopsileri yapılmıştır.

15 tavşan içeriği Tablo.2'de paylaşılan tatlı su dolu 10 litre hacimli kaplar içerisinde 25 derecelik iklimlendirme kabininde bekletilmiş ve 30. dakikada, 2. saatte, 6. saatte, 12. saatte ve 24. saatte çıkarılarak otopsileri yapılmıştır.

Florür	0,04 mg/l
Bikarbonat	65,9 mg/l
Klorür	3,1 mg/l
Sülfat	6,7 mg/l
Kalsiyum	10,5 mg/l
Magnezyum	1,1 mg/l
Sodyum	14mg/l
Toplam Mineralizasyon	101,34 mg/l
pH	7,38

Tablo 2. Tatlı su içeriği

15 tavşan Akdeniz tuzluluğu taklit edilerek oluşturulan %3,5 tuz oranına sahip tuzlu su dolu 10 litre hacimli kaplar içerisinde 25 derecelik iklimlendirme kabinde bekletilmiş ve 30. dakikada, 2. saatte, 6. saatte, 12. saatte ve 24. saatte çıkarılarak otopsileri yapılmıştır.

Otopsi sırasında tavşanların akciğer ve kalbi blok olarak çıkarılarak tartılmış ve tatlı suda ve tuzlu suda bekletilmenin akciğer ağırlıkları üzerine etkisi gözlemlenmiştir. Otopside tavşanlardan her iki gözden göz içi sıvıları, kalp kanı, iliak damar klemplemesi yapılarak periferik kan ve safra örnekleri NaF içeren gri kapaklı tüplere alınarak -20 derecede saklanmıştır.

İdrar örnekleme kantitatif olarak anlamlı sonuç vermemesi, beyin omurilik sıvısı örnekleme kısa sürede sıvının kaybolması nedeni ile yapılmamıştır.

Safra sıvısı miktarı tavşanlar arasında ciddi değişkenlik göstermekte olup 44 tavşandan safra sıvısı toplanamıştır. Analiz için yetersiz olduğu değerlendirilen 2 örnekten analiz yapılmamıştır.

3.2. TOKSİKOLOJİK ANALİZ

3.2.1. Kimyasallar ve Enstrumentasyon

Eroin metabolitlerinin saf standartları 6-monoasetil morfin, morfin, morfin-3-beta-glukuronid ve internal standart olarak kullanılmak üzere nalorfin Lipomed (Weil am Rhein, Almanya) firmasından temin edilmiştir. LC grade asetinitril ve metanol, %98 formik asit, %85 fosforik asit, %25 amonyum hidroksit, amonyum asetat Merck

(Darmstadt, Almanya) firmasından alınmıştır. Ultrasaf su temini için Mes Mp Minipure su sistemi (MPMINIPURE, Turkey) kullanılmıştır.

Analizler Shimadzu 8030 + MS/MS sistemi ile birleştirilmiş Nexera XR LC-20 AD likit kromatografi cihazı ile yapılmış olup analizler sırasında Shimadzu tarafından üretilmiş olan Shim-Pack Column FC-ODS 150X2.0 kolonu kullanılmıştır.

3.2.2. Yöntem Validasyonu

Metot optimizasyonun sağlanması için LC-MS/MS cihazı MRM modda elektrosprey iyonizasyon ile negatif iyonizasyon sağlanarak çalıştırılmıştır. Kullanılan m/z değerleri ve voltajlar tablo 3'de paylaşılmıştır.

	Ana iyon	Produkt iyon
6-MAM	328,20	165,10 – 211,10
Morfin	286,20	165,00 -153,00
Morfin-3-beta-glukuronid	462,20	286,10 - 201,10

Tablo 3. Eroin metabolitlerinin kütle spektrometresinde analizi için kullanılan m/z değerleri

Optimizasyonun tamamlanmasının ardından 7 noktalı kalibrasyon grafiği için 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 75 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml ve 200 ng/ml konsantrasyonlarında metabolitleri içeren karışım çözeltileri hazırlanmıştır. Alt tayin limiti ve alt tespit limitlerinin belirlenmesi için 10 ng/ml konsantrasyonundaki çözelti cihazda 10 defa okutulmuştur. Tekrarlanabilirlik için ardışık 4 gün ve iki farklı konsantrasyonda, tekrar üretilebilirlik için birer hafta aralıkla iki farklı konsantrasyonda analizler tekrarlanmıştır. Yapılan tekrarlı analizler sonrasında elde edilen değerler ile yöntemin doğruluk ve kesinliği test edilmiştir. Metot validasyonuna ait veriler tablo 4, 5 ve 6'da paylaşılmıştır.

	Alt tespit limiti (LOD)	Alt tayin limiti (LOQ)	Doğrusallık (r^2)
6-MAM	0,66 ng/mL	2,21 ng/mL	0.9970
Morfin	1,07 ng/mL	3,59 ng/mL	0.9981
Morfin-3-beta-glukuronid	2,22 ng/mL	7,41 ng/mL	0.9942

Tablo 4. Eroin metamolitlerinin alt tespit limiti, alt tayin limiti ve kalibrasyon eğrisinin doğrusallığı

	Konsantrason 1 (40 ng/ml)		Konsantrason 2 (100 ng/ml)	
	RSD (%)	BIAS (%)	RSD (%)	BIAS (%)
6-MAM	3,33	1,07	1,71	0,54
Morfin	3,28	-0,77	1,69	0,04
Morfin-3-beta-glukuronid	9,57	6,9	6,37	-0,94

Tablo 5. Tekrarlanabilirlik testleri sonucunda elde edilen doğruluk ve kesinlik verileri

	Konsantrason 1 (40 ng/ml)		Konsantrason 2 (100 ng/ml)	
	RSD (%)	BIAS (%)	RSD (%)	BIAS (%)
6-MAM	3,39	2,69	1,48	1,07
Morfin	3,29	-0,20	2,11	-0,09
Morfin-3-beta-glukuronid	10,85	9,65	7,78	-3,36

Tablo 6. Tekrar üretilebilirlik testleri sonucunda elde edilen doğruluk ve kesinlik verileri

3.2.3. Örneklerin Hazırlanması

Kan örneklerinin hazırlanmasında protein presipitasyon ekstraksiyonu uygulanmıştır. 500 µl kan örneği 500 µl asetonitril ile birleştirilerek vortekslenmiştir. Vorteksleme işleminin sonrasında 12000 rpm hızda 20 dk süresinde santrifüj edilmiş ve 450 µl süpernatanta 50 µl internal standart eklenerek analize hazır hale getirilmiştir. Kan örnekleri için yapılan geri kazanım çalışmaları sonucu tablo 7’te paylaşılmıştır.

Göz içi ve safra sıvılarının hazırlanması katı faz ekstraksiyon yöntemi ile gerçekleştirilmiş olup; her iki örnek çeşidi için;

- 1:1 oranında %4 H₃PO₄ ile asidik dilüsyon

Vakum pompası altında Oasis MCX kartuş kullanılarak;

- Şartlandırma ve dengeleme 1 cc metanol – 1 cc ultrasaf su

- 1 cc örnek yükleme
- 1 cc %2 formik asit ve 1 cc metanol ile yıkama
- 900 µl %60-40 metanol ve %5 NaOH ile elüsyon
- 100 µl internal standart ekleme

işlemleri uygulanmış ve analiz edilmiştir.

	Kan
6-MAM	%85-95
Morfin	%92-96
Morfin-3-beta-glukuronid	%55-82

Tablo 7. Kan geri kazanım oranları

3.3. İSTATİKSEL ANALİZ

İstatiksel analizlerin gerçekleştirilmesi için “IBM SPSS Statistics 24” programı kullanılmıştır. Akciğer ağırlıkları ve metabolitlerin konsantrasyonları gibi bağımlı değişkenlerin üzerine ortam ve ortamda bekletilme sürelerinin etkisinin analizi iki yönlü ancova, tekrarlı ölçümlerde anova testleri ile gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. AKCİĞER-KALP AĞIRLIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Otopsi yapılan tavşanların akciğer ve kalbi blok olarak tartıldığı ortamlara göre ortalama ağırlıkları ve istatistik sonuçları tablo 8’de verilmiştir.

	Ortalama Akciğer-Kalp Ağırlığı	
Açık Hava	31,39 ± 8,52 g	
Tatlı Su	41,64 ± 11,59 g	p<0,05
Tuzlu Su	41,68 ± 9,44 g	p<0,05

Tablo 8. Akciğer-Kalp ortalama ağırlıkları

Akciğer-kalp ağırlıklarının ortamlar arasında istatistiksel karşılaştırılmasında tuzlu ve tatlı suda bekletilen tavşanlarda akciğer-kalp ağırlıklarının anlamlı şekilde artış gösterdiği (p<0,05) bulunmuştur. Tatlı ve tuzlu suda bekleyen tavşanların akciğer-kalp ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (p>0,05). Aynı zamanda bekletilme sürelerindeki değişim ile akciğer-kalp ağırlıklarında anlamlı farklılık oluşmamıştır (p>0,05).

4.2. ANTEMORTEM, SANTRAL VE PERİFERİK KAN ÖRNEKLERİNİN ANALİZ SONUÇLARI

Antemortem kan örneklerinden yapılan analiz sonuçları tablo 9’da paylaşılmıştır.

	Açık hava	Tatlı su	Tuzlu su	Genel
Morfin-3-BG	984,01±404,23	998,93±397,58	663,34±370,23	882,09 ± 414,12
Morfin	55,19±31,16	43,19±17,61	49,17±20,96	49,18 ± 24,00
6-MAM	33,61±30,30	31,72±27,06	26,23±23,46	30,52 ± 26,76

Tablo 9. Antemortem kan eroin metabolitleri analizi (sonuçlar ng/mL olarak verilmiştir)

Antemortem kan örnekleri ile postmortem elde edilen santral ve periferik kan örneklerinin bütün eroin metabolitlerinde korelasyon saptanmıştır. Korelasyon katsayıları ve istatistik anlamlılık değerleri tablo 10’da paylaşılmıştır. Kan örneklerinin analiz sonuçlarının ortalamaları tablo 11 ve 12’de, herbir metabolitin

örnek çeşidine göre ve zaman ve ortama bağlı değişimleri şekil 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 de gösterilmiştir.

	Santral kan örnekleri	Periferik kan örnekleri
Antemortem M3BG	Rho: ,460 – p<0,001	Rho: ,370 – p<0,005
Antemortem Morfin	Rho: ,796 – p<0,001	Rho: ,732 – p<0,001
Antemortem 6-MAM	Rho: ,442 – p<0,001	Rho: ,601 – p<0,001

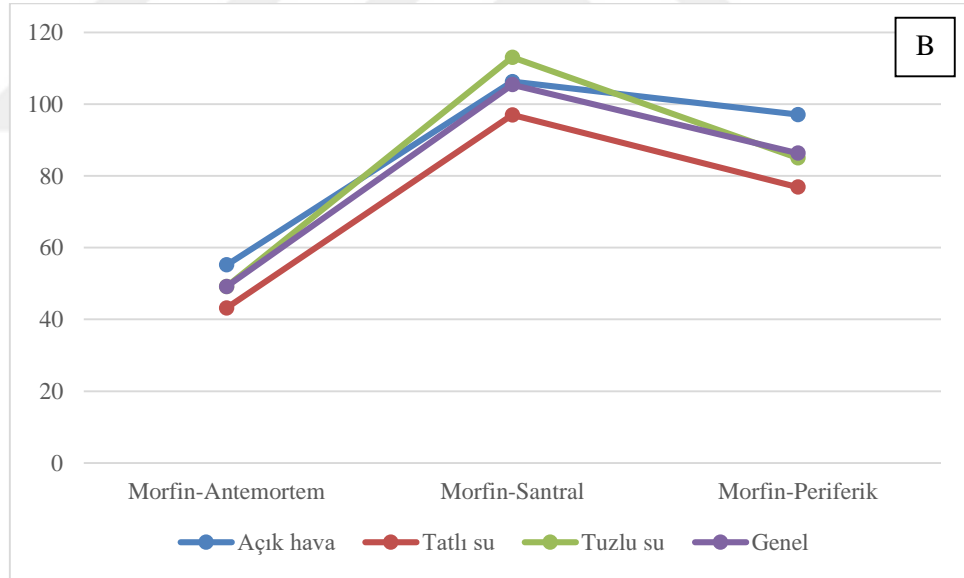
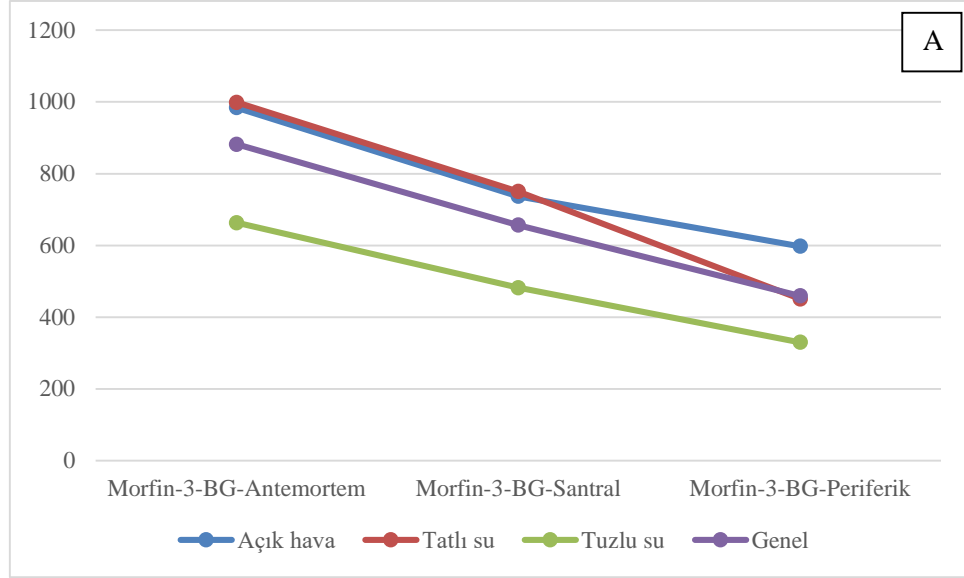
Tablo 10. Antemortem kan örnekleri ile postmortem elde edilen santral ve periferik kan örnekleri arasındaki korelasyon katsayıları ve istatistiki anlamlılık değerleri

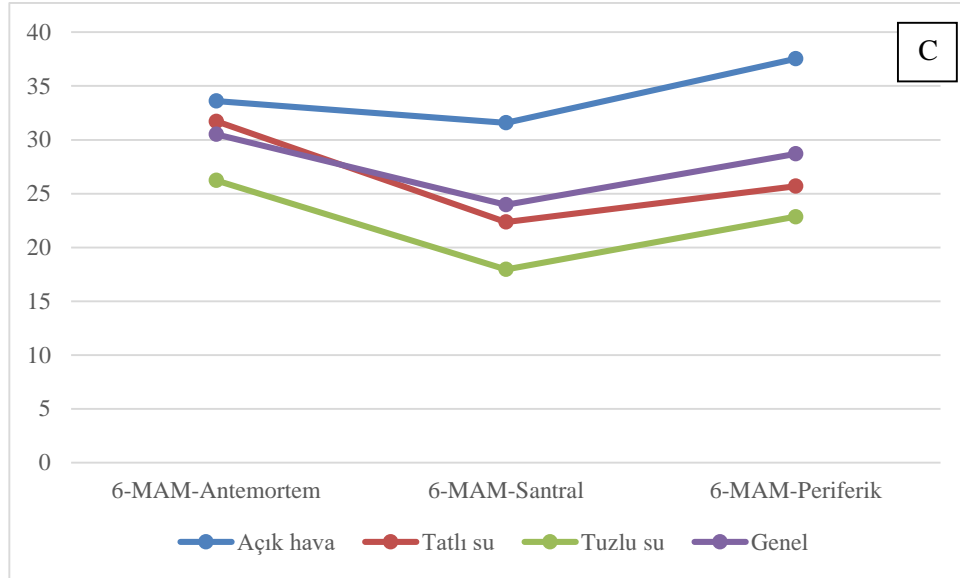
	Açık hava	Tatlı su	Tuzlu su	Genel
M3BG	736,96±489,51	750,13±407,40	481,96±347,40	656,35±429,33
Morfin	106,30±92,17	97,01±90,97	113,10±97,51	105,47±92,05
6-MAM	31,59±32,39	22,36±22,49	17,96±17,19	23,97±25,03

Tablo 11. Santral kan örneği analiz sonuçları (sonuçlar ng/mL olarak verilmiştir)

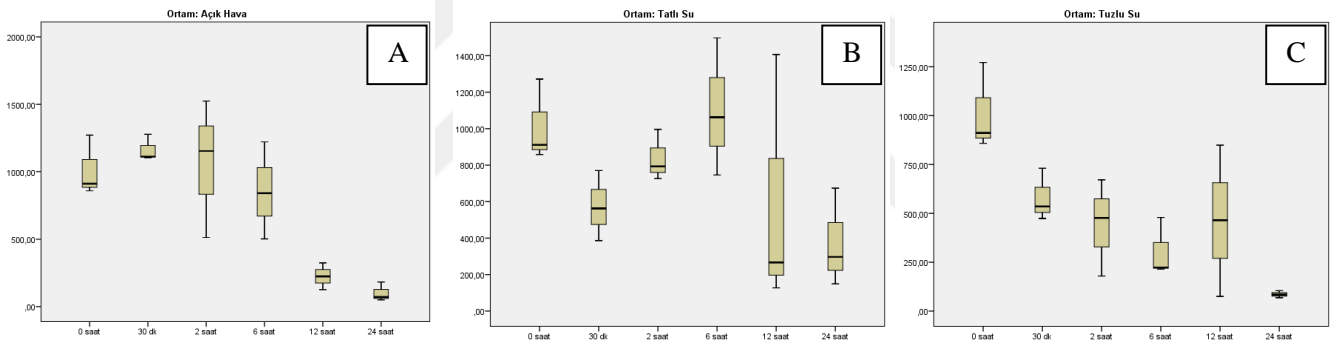
	Açık hava	Tatlı su	Tuzlu su	Genel
M3BG	597,65±419,10	450,90±287,15	329,87±264,89	459,48±342,79
Morfin	97,11±37,59	76,90±25,38	84,99±24,40	86,33±30,35
6-MAM	37,54±48,51	25,70±26,57	22,85±20,52	28,70±34,02

Tablo 12. Periferik kan örneği analiz sonuçları (sonuçlar ng/mL olarak verilmiştir)

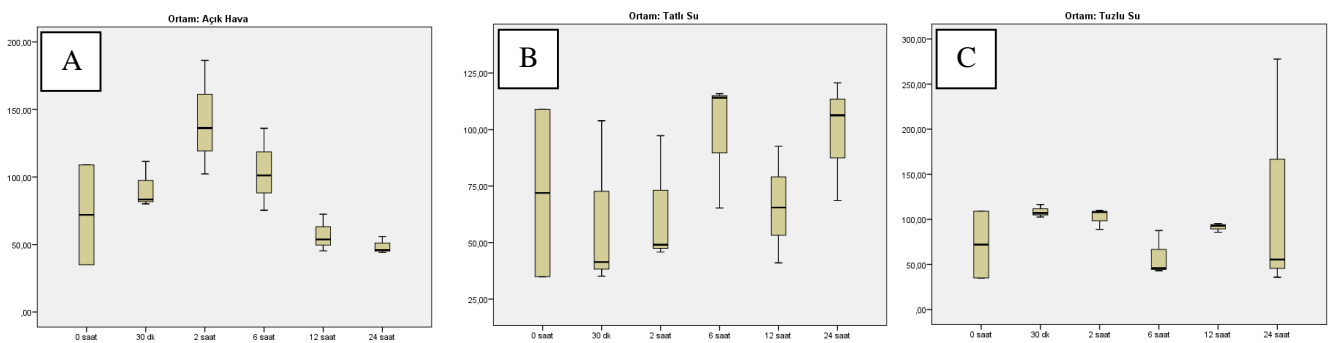




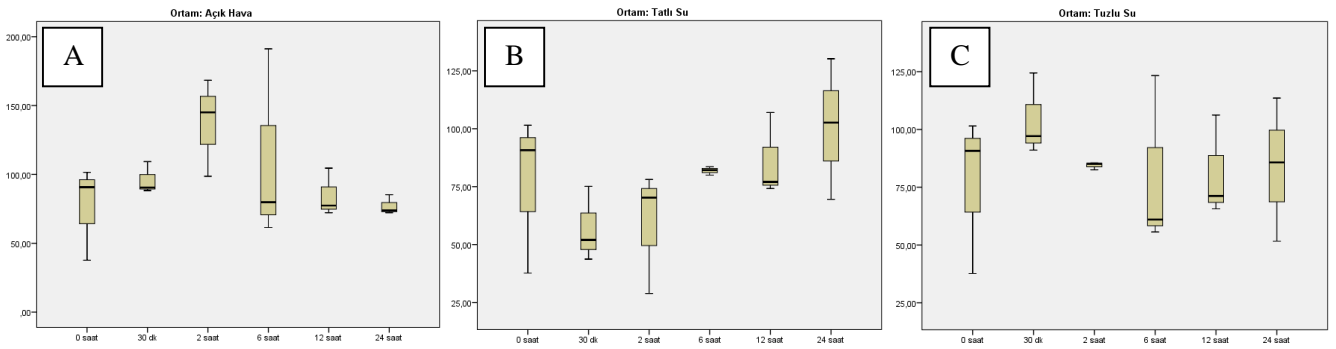
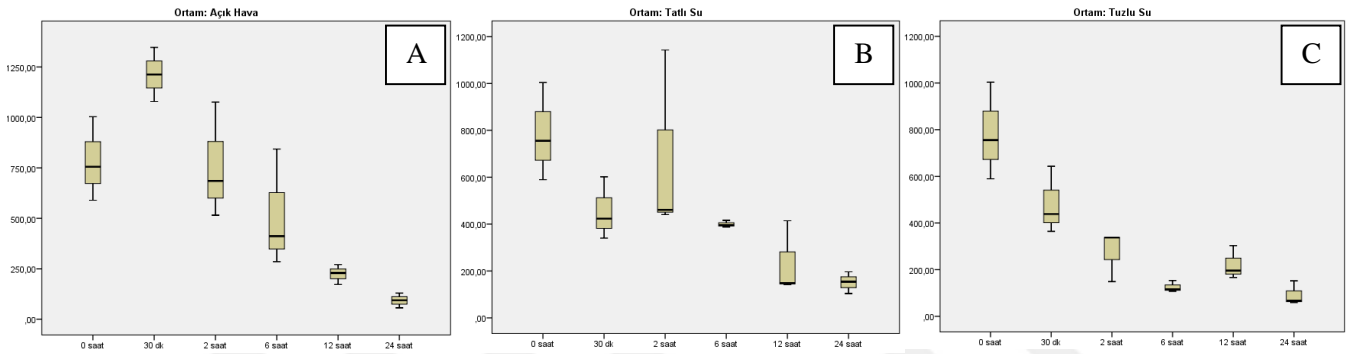
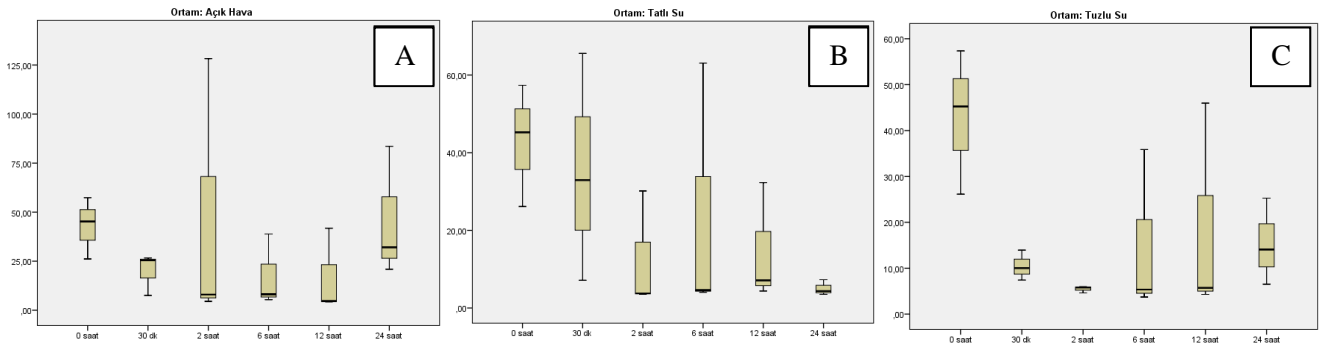
Şekil 2. Morfin-3-beta-glukuronid (A), morfin (B) ve 6-MAM (C) değerlerinin ortamlar ve örneklem çeşidine göre değişimi

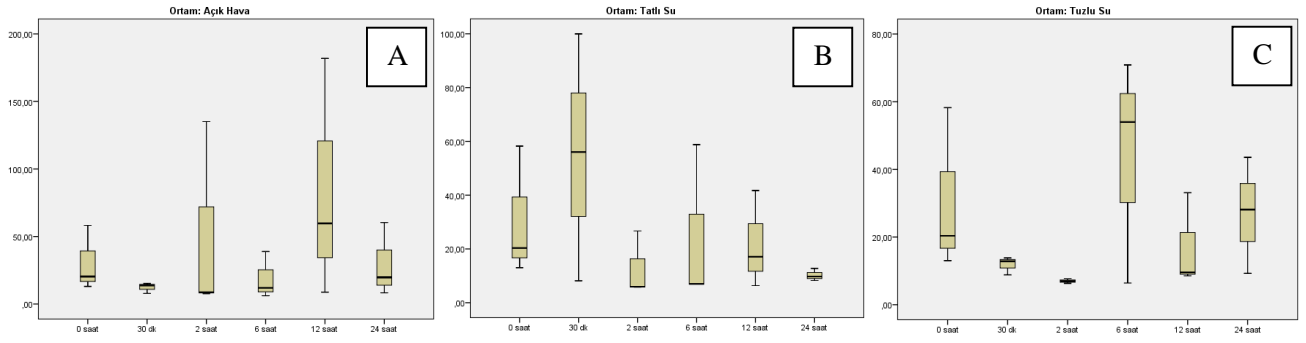


Şekil 3. Morfin-3-beta-glukuronidin zamana ve ortama bağlı (Açık hava – A, Tatlı su – B, Tuzlu su - C) olarak santral kan örneklerindeki değişimi



Şekil 4. Morfinin zamana ve ortama bağlı (Açık hava – A, Tatlı su – B, Tuzlu su – C) olarak santral kan örneklerindeki değişimi

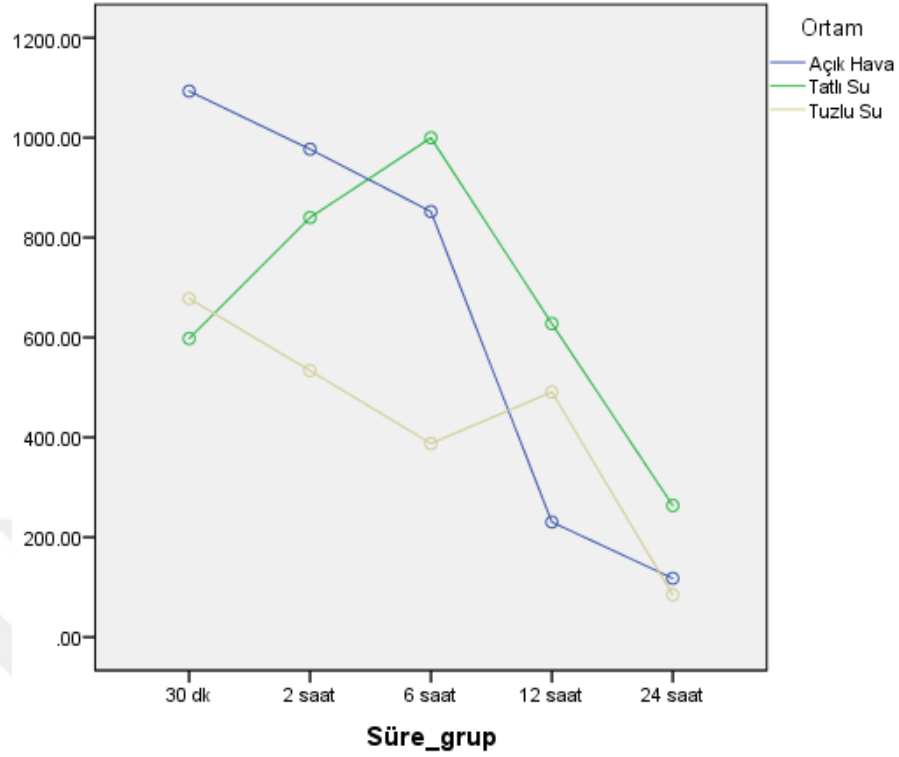




Şekil 8. 6-MAM'ın zamana ve ortama bağlı (Açık hava – A, Tatlı su – B, Tuzlu su - C) olarak periferik kan örneklerindeki değişimi

Eroin metabolitleri üzerine süre ve ortam değişkenlerinin ana etkileri ile etkileşimlerinin etkisinin incelenmesi amacıyla varyans analizleri kullanılmıştır. Antemortem örneklerdeki farklılıklar ve postmortem elde edilen santral ve periferik kan örneklerinde eroin metabolitlerinin birbiri ile korelasyon göstermesi göz önüne alınarak bu farklılıkların analizler üzerindeki etkisinin azaltılması için kovaryans analizleri uygulanmıştır.

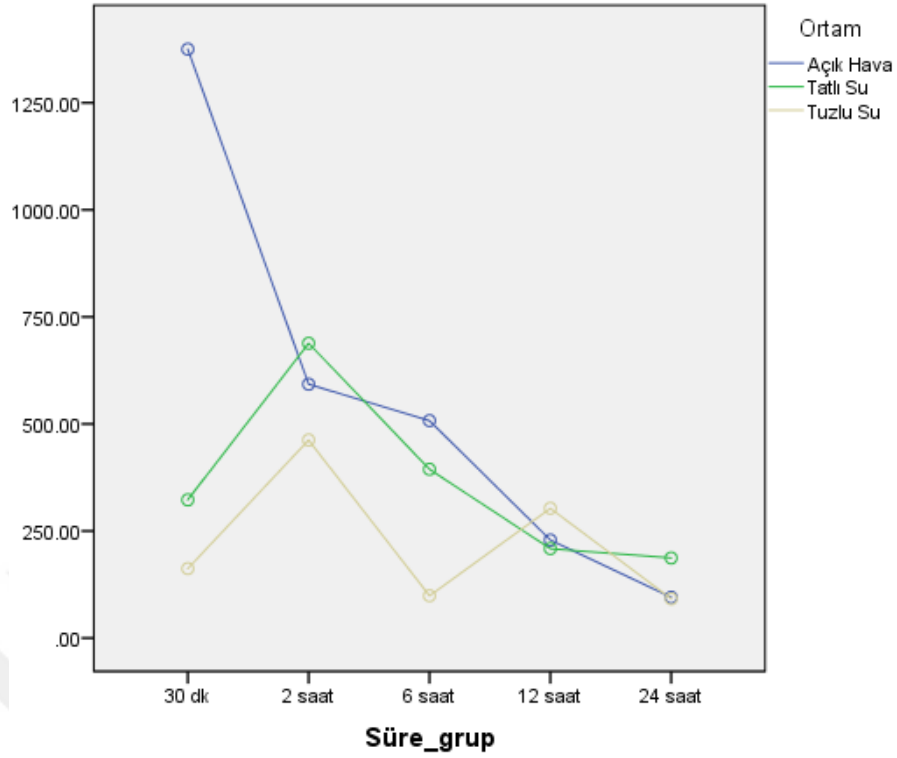
Morfin-3-beta-glukuronit metaboliti için santral kan örneklerinde ortam ve ortam süre etkileşiminin etkisinin anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p > 0,05$). Sürenin ana etkisi anlamlı olarak sonuçları etkilediği bulunmuştur [$F(4,29)=7.22$ $p < 0.01$], %55]. Bu etkinin sonuçlardaki %55'ini açıklayabildiği, ortam değişkeninin ise morfin-3-beta-glukuronitte saptanan değişimlerinde %9'unu açıklayabildiği görülmüştür. Santral morfin-3-beta-glukuronidin 24. saatteki değerleri 12 saat dışındaki tüm zamanlardan elde edilen santral kan örnekleri ile istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük bulunmuştur, bu düşüklük tüm ortamlarda benzer şekilde izlenmiştir (Şekil 9).



Covariates appearing in the model are evaluated at the following values: Baş_M3BG = 813.5

Şekil 9. Santral morfin-3-beta-glukuronitte ortam ve süre etkileşimi

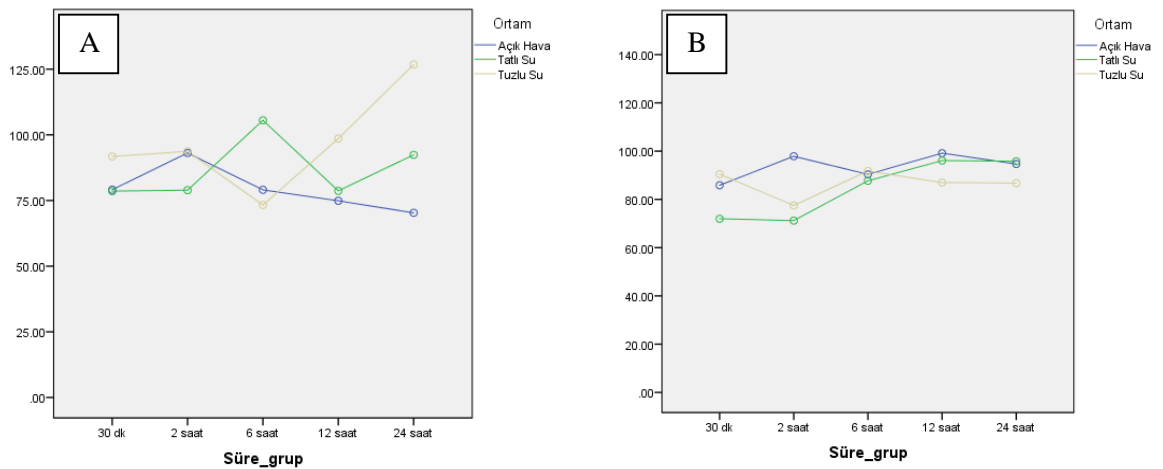
Perifer kandaki morfin-3-beta-glukuronit analizlerinde hem ortam ve süre etkileşimi [$F(8,29)=2.98$ $p=0.014$], %45] hem de ortam [$F(2,29)=7.88$ $p=0.002$], %35] ve sürenin [$F(4,29)=21.547$ $p<0.01$], %74] ana etkileri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ortamdaki ana etkinin kaynağı açık hava koşulundaki morfin-3-beta-glukuronit ortalamaların tatlı ve tuzlu suya göre istatistiksel olarak yüksek olmasından kaynaklanmaktadır ($p=0.016$ ve $p=0.004$). Morfin-3-beta-glukuronit düzeyine zamanın ana etkisine bakıldığında ise 30. dk değerleri ikinci saat ölçümü dışındaki tüm zamanlardan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur, 2. saat değerleri ise 12. ve 24. saat değerlerinden anlamlı olarak yüksek, 6 saat değerleri 24 saat değerlerinden anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (tüm p değerleri <0.05) (Şekil 10).



Covariates appearing in the model are evaluated at the following values: Baş_M3BG = 813.51

Şekil 10. Periferik morfin-3-beta-glukuronitte ortam ve süre etkileşimi

Santral ve periferik kan örneklerindeki morfin düzeyleri üzerine ortam ve sürenin ana etkisi ve etkileşim etkisi bulunmamıştır ($p>0.05$). Ortam değişiminin santral kanda meydana gelen değişimin %7'sini, süre değişiminin ise %3'ünü açıklayabildiği görülmüştür. Bu durum periferik kanda ortam değişkeni için %6, süre değişkeni için %9 oranında olmuştur (Şekil 11).

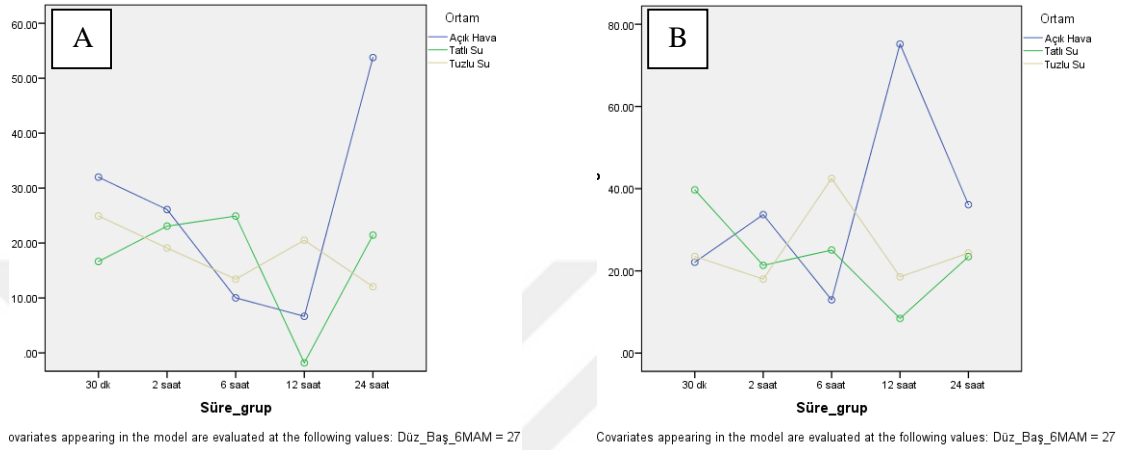


Covariates appearing in the model are evaluated at the following values: Baş_Morfin = 46.

Covariates appearing in the model are evaluated at the following values: Baş_Morfin = 46

Şekil 11. Santral (A) ve periferik (B) morfin ortam ve süre etkileşimi

Santral ve periferik kan örneklerindeki 6-MAM düzeyleri üzerine ortam ve sürenin ana etkisi ve etkileşim etkisi bulunmamıştır ($p>0.05$). Ortam değişiminin santral kanda meydana gelen değişimin %7'sini, süre değişiminin ise %20'sini açıklayabildiği görülmüştür. Bu durum periferik kanda ortam değişkeni için %4, süre değişkeni için %1 oranında olmuştur (Şekil 12).



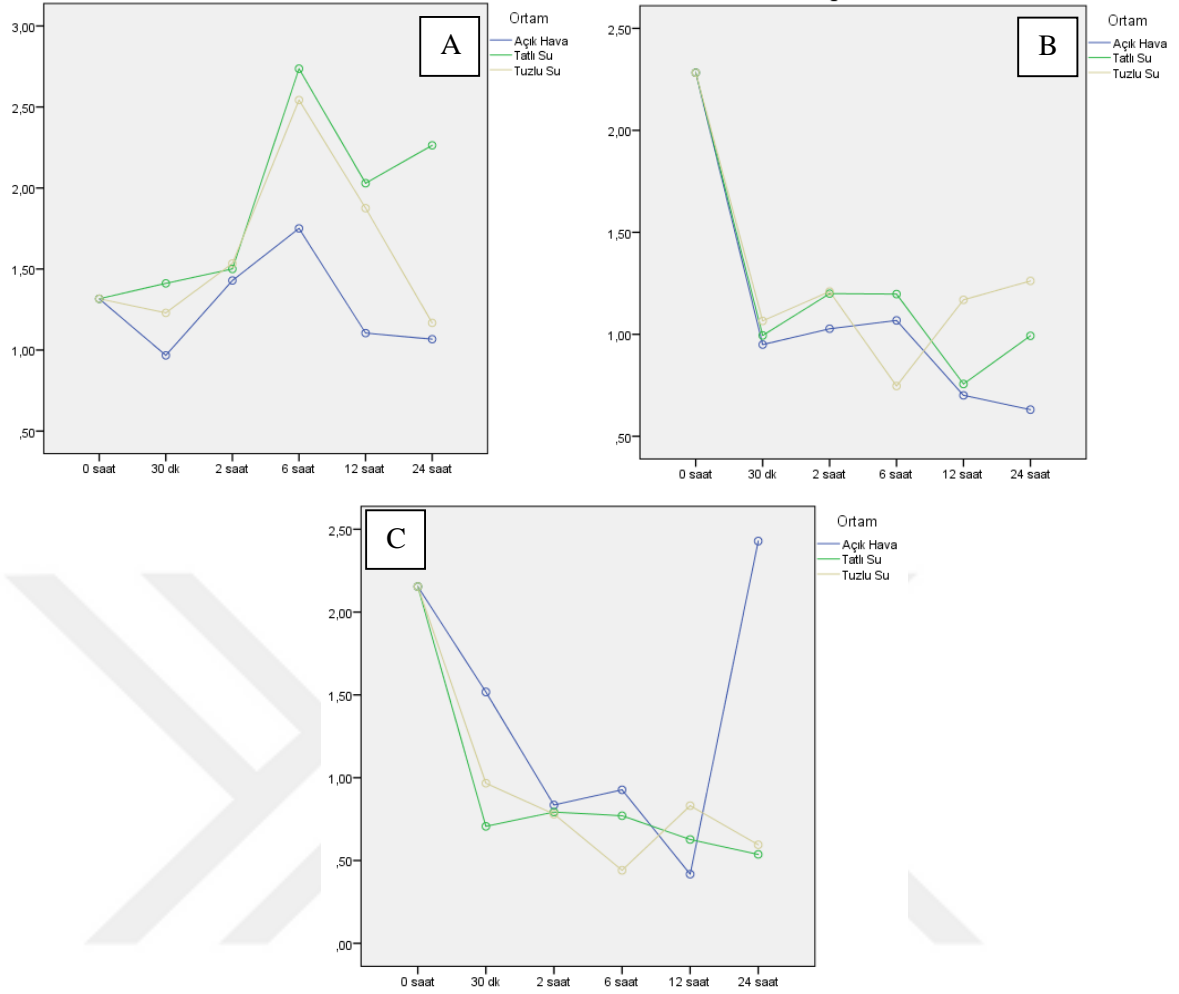
Şekil 12. Santral (A) ve periferik (B) 6-MAM ortam ve süre etkileşimi

Postmortem redistribüsyonun göstergesi olarak kabul edilen santral ile periferik kan örneklerinin birbirine oranlanması yapılarak incelendiğinde ortamlara göre ortaya çıkan oranlar tablo 13'de paylaşılmıştır.

	Açık hava	Tatlı su	Tuzlu su
Morfin-3-BG	1,27±0,48	1,87±0,90	1,61±0,86
Morfin	1,10±0,95	1,23±0,94	1,28±0,97
6-MAM	1,38±1,22	0,93±0,90	0,96±0,92

Tablo 13. Santral / Perifer oranının ortamlara ve metabolitlere göre değişimi

Varyans analizleri santral/perifer oranı için yapıldığında morfin-3-beta-glukuronit oranı üzerine sürenin anlamlı etkisi olduğu [$F(5,36=2.57$ $p=0.043$), %26], ortamın ise anlamlı etkisi olmamakla birlikte yakın anlamlılık gösterdiği [$F(2,36=2.88$ $p=0.069$), %14] görülmüştür. Morfin ve 6-MAM için santral/perifer oranında ise ortamın ana etkisi ve ortam-süre etkileşiminin etkisi bulunmazken süre etkeninin anlamlı olarak etkilediği, morfin için anlamlılık düzeyinin [$F(5,36=2.74$ $p=0.034$), %27], 6-MAM için [$F(5,36=2.85$ $p=0.020$), %30] olduğu saptanmıştır (Şekil 13).



Şekil 13. Morfin-3-betaglukuronit (A), morfin (B) ve 6-MAM (C) santral/perifer oranlarının süre ve ortam ile etkileşimi

4.3. SAFRA VE GÖZ İÇİ SIVISI ÖRNEKLERİNİN ANALİZ SONUÇLARI

Safra ve göz içi sıvılarında saptanan eroin metabolitlerinin düzeyleri tablo 14 ve 15'te paylaşılmıştır. Safra örneklerindeki kısıtlılıklar nedeni ile istatistik analizleri açık havada 15, tatlı suda 14, tuzlu suda 15 tavşan üzerinden gerçekleştirilmiştir.

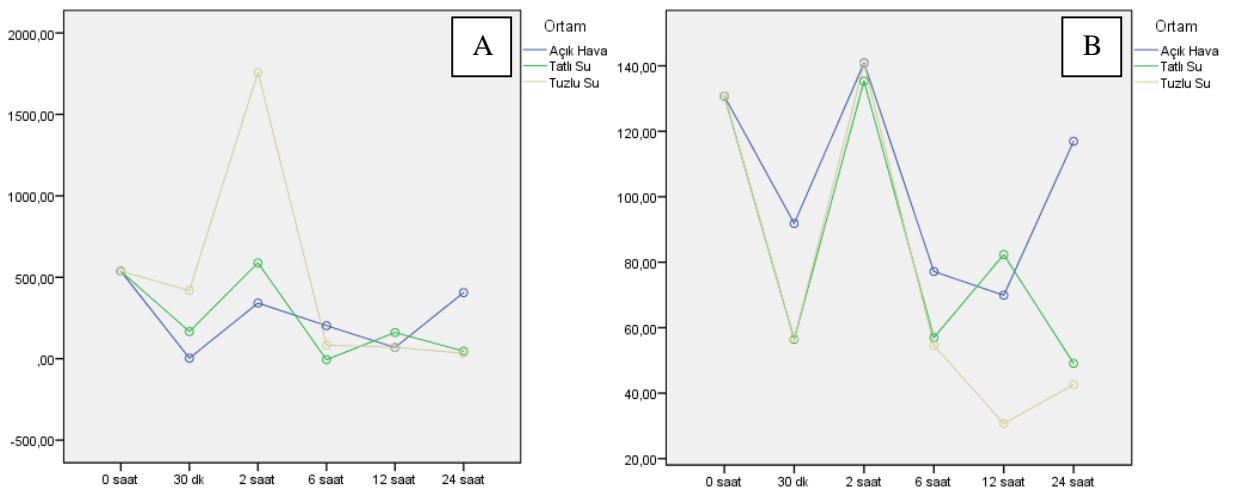
	Açık hava	Tatlı su	Tuzlu su	Genel
Morfin-3-BG	107404±138399	131073±167481	98295±134405	111830±138399
Morfin	476,01±201,66	511,93±360,69	342,26±252,36	441,84±280,67
6-MAM	39,81±56,34	25,53±30,72	53,69±60,45	40±51,40

Tablo 14. Safra örneği analiz ortalama sonuçları (sonuçlar ng/mL olarak verilmiştir)

	Açık hava	Tatlı su	Tuzlu su	Genel
Morfin-3-BG	275,18±281,40	266,53±273,67	450,46±713,71	330,72±469,18
Morfin	102,37±48,89	87,33±43,65	75,98±47,76	88,56±47,20
6-MAM	7,31±1,74	6,82±3,01	8,96±9,33	7,70±5,71

Tablo 15. Göz içi örneği analiz ortalama sonuçları (sonuçlar ng/mL olarak verilmiştir)

Göz içi sıvısında morfin-3-beta-glukuronit değerleri için varyans analizleri yapıldığında morfin-3-beta-glukuronit ve morfin düzeyleri üzerine sürenin anlamlı etkisi olduğu [F(5,35=9.73 p<0.001), %58], [F(5,35=7,40 p<0.001), %51] sırasıyla, ortamın ise anlamlı etkisi olmamakla birlikte yakın anlamlılık gösterdiği [F(2,35=2.55 p=0.092), %12], [F(2,35=2.75 p=0.077), %14] sırasıyla, görülmüştür. Süre ve ortam etkileşimine bakıldığında ortamlardaki zaman içinde izlenen morfin-3-beta-glukuronit değişimlerinin ortamlar arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde birbirinden farklılık gösterdiği izlenmiştir [F(5,36=2.74 p=0.034), %27]. Bu duruma tuzlu su düzeylerinin diğer ortamlarda saptanan düzeylere göre yüksek olması neden olmuştur. Diğer taraftan ortam ve süre etkileşiminin etkisinin morfin düzeylerinde anlamlılık göstermediği bulunmuştur. (Grafik 13). 6-MAM düzeyleri üzerine ortam ve sürenin ana etkisi ve etkileşim etkisi bulunmamıştır (p>0.05). Ortam farklılığının meydana gelen değişimin %1'sini, süre değişiminin ise %20'sini açıklayabildiği görülmüştür.



Şekil 14. Morfin-3-beta-glukuronit (A), morfin (B) düzeylerinin göz içi sıvısında süre ve ortam ile etkileşimi

Safra örneklerinde morfin-3-beta-glukuronit, morfin ve 6-MAM düzeyleri üzerine ortam ve sürenin ana etkisi ve etkileşim etkisi bulunmamıştır ($p>0.05$).

Safra ve göz içi sıvısı örnekleri eroin metabolitlerinin antemortem değerleri ile karşılaştırıldığında elde edilen korelasyon değerleri ve istatistiki anlamlılık düzeyleri tablo 16'da paylaşılmıştır.

	Göz içi sıvısı örnekleri	Safra örnekleri
Antemortem M3BG	$p>0,05$	Rho: ,418 – $p<0,05$
Antemortem Morfin	$p>0,05$	$p>0,05$
Antemortem 6-MAM	$p>0,05$	Rho: ,354 – $p<0,05$

Tablo 16. Antemortem kan örnekleri ile postmortem elde edilen göz içi sıvısı ve safra örnekleri arasındaki korelasyon katsayıları ve istatistiki anlamlılık değerleri

5. TARTIŞMA

Günlük adli tıp uygulamalarında farklı ortamlarda bulunmuş cesetler üzerinde postmortem incelemeler, otopsi ve laboratuvar analizleri uygulanmaktadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda farklı ortamlarda bulunmanın cesedi ve ölüm bulguları üzerinde etkili olabileceği bildirilmekle birlikte cesedin bulunduğu ortam özelliklerinin toksikolojik analiz sonuçları arasında farklılığa neden olup olmadığı hususunda aydınlatıcı bir çalışma bulunmamaktadır. Cesedin bulunduğu ortam ve bu ortamla etkileşme düzey ve şekli farklı olan organ-dokuların toksikolojik analizinde saptanan düzeylerin birbirleri arasındaki farkları, tutarlı olup olmadıkları ve maruz kalınan toksikolojik ajanın antemortem düzeyini ne ölçüde temsil edebileceği bilinmemektedir. Bu çalışmada herhangi bir toksik ajana maruz kalım esnasında veya sonrasında meydana gelen ölüm vakalarında cesedin farklı ortamda (açık hava, tatlı su, tuzlu su) bulunmasının doku ve organ bazında toksikolojik analiz sonuçlarını etkileyip etkilemediği ortaya konmaya çalışılmıştır.

5.1. AKCİĞER-KALP AĞIRLIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

İmmersiyon vakalarında toksikolojik araştırmalar yapılması ve psikoaktif maddelerin olası etkilerinin olabileceği yazarlar tarafından bildirilmekle birlikte ölüm meydana geldikten sonra suya düşme vakalarına rastlamanın olası olduğu belirtilmektedir⁷⁷. Suda boğulma dışında ölümün gerçekleştiği ve suda bulunan cesetler üzerinde yapılan çalışmalarda akciğer ağırlıklarının pasif diffüzyon nedeni ile arttığı belirtilmektedir⁷⁸. Çalışmamızda tatlı ve tuzlu suda bekletilen tavşanlarda akciğer ağırlıkları açısından anlamlı farklılık saptanmış ve tüm tavşanların 1 mg/kg eroin infüzyonu maruz bırakılması nedeni ile oluşan farklılık üzerine intoksikasyonun yol açtığı akciğer ödeminin karıştırıcı etkisi olmadığı düşünülmektedir.

Antemortem kan örnekleri arasında aynı dozda infüzyon yapılmasına rağmen eroin metabolitleri arasında konsantrasyon varyasyonları tespit edilmiştir. Bu durum daha önce yapılan hayvan çalışmalarında da benzer şekilde saptanmış olup, hayvanlar arasındaki biyolojik varyasyonlarından kaynaklandığı belirtilmiştir⁵⁵. Antemortem konsantrasyon farklılıklarının yol açtığı postmortem etkiyi kompanse etmek için birçok araştırma antemortem değerlere göre düzeltmeler uygulamaktadır⁵⁵.

5.2. ANTEMORTEM, SANTRAL VE PERİFERİK KAN ÖRNEKLERİNİN ANALİZ SONUÇLARI

Antemortem kanlarda saptanan metabolitlerin konsantrasyonları bakımından ilgili literatürle kıyaslandığında; M3BG konsantrasyonlarının, morfin ve 6-MAM konsantrasyonlarına göre, literatürle uyumlu olarak, daha yüksek şekilde izlenmektedir ^{68, 70}. Ayrıca metabolitlerin antemortem ile postmortem konsantrasyonlar karşılaştırıldığında, özellikle morfin değerleri arasında daha yüksek olmak üzere korelasyon saptanması verilerin tutarlılığını göstermektedir. Metabolit düzeyi korelasyon katsayıları arasındaki farklılıkların postmortem redistribüsyon ve ortam farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Postmortem ortalama morfin konsantrasyonları, antemortem konsantrasyonlara göre daha yüksek olmakla birlikte periferik ile santral kan konsantrasyonları arasındaki farklılığın belirgin olmaması literatür ile uyumlu olarak izlenmektedir. Diğer taraftan morfinin aksine; M3BG konsantrasyonları değerlendirildiğinde, antemortem konsantrasyonlar postmortem konsantrasyonlara oranla daha yüksek izlenmekte ve postmortem periferik konsantrasyonlar ile antemortem konsantrasyonlar birbirine en uzak değerleri oluşturmaktadır. Bu veri, literatürde yaygın olarak kabul gören postmortem periferik kan örneklerinin antemortem değerlere en yakın sonuçları verdiği önermesinin aksine bir durum ortaya koymakta ve postmortem M3BG analizi için postmortem periferik kan örneğinin güvenilirliğinin daha düşük olduğunu göstermektedir.

Literatürde analiz sonuçları arasındaki kaotik durumun giderilmesi ve interferan durumların dışlanması amacıyla matematiksel yöntemler kullanıldığı görülmektedir. Bununla uyumlu olarak bu çalışmada antemortem kan konsantrasyonlarının, postmortem konsantrasyonlar üzerindeki istatistiksel etkisini ortadan kaldırmak amacıyla kovaryans analizleri tercih edilmiştir. Buna ek olarak ortam ve süre değişkeninin etki büyüklüğü de saptanacak şekilde ANCOVA analizleri uygulanmıştır.

M3BG düzeyleri incelendiğinde santral kan örneklerinde, açık hava ve tuzlu su ortamlarında postmortem intervalin artması ile ters orantılı olarak yüksek konsantrasyonların düşme eğilimi gösterdiği, ancak tatlı su ortamında bekleyen tavşanların santral M3BG konsantrasyonlarının 6 saat bekleyen tavşanlarda en yüksek

değere ulaştıktan sonra düşüş eğilimine girdiği görülmektedir. Santral kan konsantrasyonları, üzerine ortam ve sürenin etki derecesi göz önüne alınarak değerlendirildiğinde; ortaya çıkan değişikliğe sürenin anlamlı olarak etkisi olduğu ve bu etkinin derecesinin %55 olduğu, diğer yandan ortamın etkisinin anlamlı olmayıp etki derecesinin %9 seviyesinde olduğu saptanmıştır. Santral kanların aksine periferik konsantrasyonlarda ortam farklılığının anlamlı olarak değişikliğe yol açtığı ve etki derecesinin %35 olduğu tespit edilmiştir. Postmortem interval süresi ile tatlı ve tuzlu su ortamındaki konsantrasyonların, açık hava grubundaki sürekli düşüşün aksine ilk etapta yükselme eğilimi gösterdiği daha sonra açık hava grubundaki konsantrasyonlara benzer şekilde düşüş gösterdiği izlenmektedir. Bu duruma pasif difüzyon ile akciğerlerden santral kana geçiş yapan ortam sıvılarının, M3BG'nin daha yüksek olduğu santral kandan periferik vasküler alana yer değiştirme durumunun neden olduğu düşünülmektedir. Tatlı ve tuzlu su gruplarında M3BG'nin kararlı konsantrasyonlara ulaşmasının ardından normal seyre geri dönerek açık hava grubu ile benzer şekilde değişimler olduğu gözlenmektedir. Bu değişimler üzerinde ortam ve süre etkisi kıyaslandığında konsantrasyon değişimi üzerine sürenin daha belirgin olarak (%74) değişime neden olduğu saptanmıştır. Postmortem redistribüsyonun göstergesi olarak santral/perifer M3BG konsantrasyonları oranı süre ile anlamlı olarak değişime uğramakla birlikte ortam etkisi anlamlılığa yakın şekilde değişime neden olmaktadır. Oranlar üzerindeki ortam ve süre değişkeninin etki derecelerinin sırasıyla %14 ve %26 olduğu görülmektedir. Süre ile meydana gelen değişim postmortem redistribüsyonun öncelikle belirgin hale gelmesine neden olmakla birlikte muhtemelen postmortem devam eden difüzyon nedeniyle periferik ile santral konsantrasyonlar arasında daha kararlı bir seviyeye yaklaşmaktadır. Diğer taraftan tuzlu su ve açık havada gruplarındaki santral/perifer M3BG oranı 24 saatlik interval sonunda 1'e iyice yaklaşırken, tatlı suda bekleyen tavşanlarda bu oran 24 saatte yaklaşık 2 olarak kalmaktadır. M3BG'in aksine santral ve periferik kan örneklerindeki morfin ve 6-MAM konsantrasyonları üzerinde süre ve ortam değişkenlerinin anlamlı etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

Morfin konsantrasyonlarına bakıldığında süre ve ortamın etkisinin değişimdeki payı %10'dan daha düşük seviyede kalmaktadır. Morfinin redistribüsyon göstergesi olarak santral/perifer konsantrasyon oranı ilk yarım saat sonunda 1'e yaklaşmaktadır

ve literatürde morfinin postmortem yeniden dağılıma uğramadığı bulgusuyla ilk yarım saat sonunda elde ettiğimiz veri uyumluluk göstermektedir. Bu bağlamda morfinin erken postmortem dönemde yeniden dağılım denge konsantrasyonuna hızla ulaştığı düşünülmektedir. Literatürdeki insan çalışmaları femoral kandan yapılan tekrarlı analizlerde morfin konsantrasyonlarında belirgin değişiklik gözlenmemesine rağmen bu çalışmamızda elde edilen bulgular ile daha erken dönemde zaten denge konsantrasyonuna ulaşmış olduğunu düşündürmektedir.

Santral 6-MAM konsantrasyonları üzerine postmortem intervalin etki derecesinin %20 olduğu, periferik 6-MAM konsantrasyonlarında ise bu derecenin %1 olduğu tespit edilmiştir. Santral/perifer 6-MAM konsantrasyon oranı ilk yarım saat sonrasında 1'in altına düşmekte ve bu durum üzerine ortamın etkisinden daha çok postmortem intervali etkisi olduğu izlenmektedir. 6-MAM konsantrasyonlarındaki varyasyon gözönüne alınarak elde edilen sonuçlar ışığında bu metabolitin daha çok akut maruziyetin saptanması için değerli bulgular verebileceği, instabil yapısı nedeniyle postmortem konsantrasyonlarının yüksek değişkenlik gösterdiği, kantitatif değerinden daha çok kalitatif bir gösterge olarak kullanılabilmesi düşünülmektedir.

5.3. SAFRA VE GÖZ İÇİ SIVISI ÖRNEKLERİNİN ANALİZ SONUÇLARI

Vitröz sıvı ile antemortem konsantrasyonlar arasında korelasyon izlenmemesi, vitröz sıvıya antemortem dağılımın tam gerçekleşmemiş olması ile ilişkili olabileceği gibi postmortem dönemde tavşanların vitröz sıvı konsantrasyonlarını doğrudan olarak etkileyebilecek tatlı ve tuzlu su ortamında bekletilmiş olmalarının etkisinin bulunabileceği düşünülmektedir. Cesedin farklı ortamlarda bulunmasının özellikle M3BG ve morfin düzeylerine istatistiksel olarak anlamlı etkisi olmasa da bu durumun konsantrasyon değişiminin %10-15'ini açıklayıcı nitelikte olduğu; diğer yandan süre değişiminin ise konsantrasyon değişikliğinin %50'sinden daha fazlasını açıklayabildiği görülmektedir. Bu bulgulara ek olarak farklı ortamlarda daha uzun süre bekleyen tavşanlarda konsantrasyon varyasyonlarının daha dramatik olduğu izlenmektedir.

Safra sıvısındaki metabolit konsantrasyonları üzerine ortam ve süre değişkenlerinin anlamlı etkisinin olmaması ve antemortem konsantrasyonlar ile postmortem konsantrasyonlar arasında korelasyon izlenmesi safranin eroin

metabolitlerinin analizi için güvenilir bir örnek olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgu literatürde safranın eroin metabolit analizinde güvenilir bir örnek olduğu bilgisine; safranın farklı ortamlarda bulunmuş cesetlerde de eroin metabolitlerinin analizi için güvenilir bir örnek olduğu bilgisi ile katkıda bulunmaktadır.

Geniş bir literatür taramasında farklı ortamlarda bulunan cesetlerden alınan vücut sıvılarının toksikolojik analizlerini ele alan çalışmaların yer almaması nedeniyle bu çalışmamızda elde ettiğimiz veriler sınırlı şekilde tartışılabilmiş ve temel postmortem toksikolojik bilgiler ışığında değerlendirilmiştir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Daha önce literatürde ortam değişkeninin postmortem redistribüsyon üzerine olası etkilerini inceleyen herhangi bir yazı bulunmamakta ve bu çalışmada elde edilen verilerimiz bu alandaki bir eksikliğin incelenmesine olanak sağlamaktadır.

Postmortem redistribüsyonun ortaya çıkmasında ve değişik derecelerde görülmesine neden olan çok fazla faktör olup en önemli değişkenin postmortem interval olduğu ortaya konmuştur. Tatlı su ve tuzlu su gibi direk olarak dış ortam ile vücudun etkileşimi olan durumlarda dahi ortam etkisinin postmortem intervalden daha fazla bir etkiye sahip olmadığı çalışmamızın en önemli bulgusu olarak görülmektedir.

Literatürde M3BG gibi morfinin major atılım yolunu oluşturan metabolit üzerine postmortem redistribüsyon araştırmaları hala sınırlı sayıda kalmaktadır. Ortam etkisinin özellikle metabolitler arasında en yüksek konsantrasyonda ölçülen M3BG’de izlenmesi konsantrasyon yüksekliğinin postmortem redistribüsyon değerlendirmesi için önemli etkenlerden biri olduğunu desteklemektedir.

Morfin düzeyleri ortam ve zaman değişiminden anlamlı olarak etkilenmemekte ve daha stabil bir seyir izlemektedir. Bu bağlamda morfinin postmortem toksikolojik değerlendirmelerde kantitatif analizler için güvenilir bir metabolit olduğu ortaya konmuştur.

Göz içi sıvısı immersiyon durumunda hem ortamla hem süre ile etkileşerek daha az güvenilir sonuçlar vermektedir. Özellikle ortamla etkileşimin kuvvetli olduğu immersiyon vakalarında antemortem konsantrasyonlar ile korelasyon göstermemekte ve değerlendirme için yanıltıcı olabilmektedir.

6-MAM konsantrasyonları örnek çeşidine göre ortam ve süre etkisiyle çok fazla değişkenlik göstermektedir. Diğer yandan 6-MAM’ın daha çok akut maruziyetin

saptanması için değerli bulgular verebileceği, postmortem konsantrasyonlarının yüksek değişiklik göstermesinin instabil yapısından kaynaklandığı, kantitatif değerinden çok kalitatif değerinin olduğu gözlenmektedir.

Safra örneğinden yapılan eroin metabolitleri analizlerinin ortam ve süre değişiminden etkilenmemesi ve antemortem konsantrasyonlar ile korelasyon göstermesi nedeni ile adli toksikolojik değerlendirmeler için anlamlı bulgular elde edilmesini sağlamaktadır. Literatüre safranın eroin metabolit analizinde güvenilir bir örnek olduğu bilgisine ek olarak safranın farklı ortamlarda bulunmuş cesetlerde de eroin metabolitlerinin analizi için güvenilir bir örnek olduğu bilgisi ile katkıda bulunmaktadır.



7. KAYNAKLAR

- [1] Skopp, G. A. (2009) Postmortem Toxicology: Artifacts, In *Wiley Encyclopedia of Forensic Science*, John Wiley & Sons, Ltd.
- [2] Skopp, G. (2010) Postmortem toxicology, *Forensic science, medicine, and pathology* 6, 314-325.
- [3] European Drug Report 2017: Trends and Developments, European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction.
- [4] World Drug Report 2016, United Nations Office on Drugs and Crime.
- [5] Janssen, E. (2011) Drug-related deaths in France in 2007: estimates and implications, *Substance use & misuse* 46, 1495-1501.
- [6] Grippo, F., Pappagallo, M., Burgio, A., and Crialesi, R. (2015) Drug induced mortality: a multiple cause approach on Italian causes of death Register, *Epidemiology, Biostatistics and Public Health* 12.
- [7] Compton, W. M., Jones, C. M., and Baldwin, G. T. (2016) Relationship between Nonmedical Prescription-Opioid Use and Heroin Use, *New England Journal of Medicine* 374, 154-163.
- [8] Ojanperä, I., and Vuori, E. (2014) Legal Aspects of Toxicology, In *Handbook of Forensic Medicine*, pp 827-839, John Wiley & Sons, Ltd.
- [9] Saukko, P., and Knight, B. (2015) Poisoning and the Pathologist, In *Knight's Forensic Pathology Fourth Edition*, pp 567-578, CRC press.
- [10] Meyer, M. R., and Maurer, H. H. (2014) Toxicokinetics and Toxicogenetics, In *Handbook of Forensic Medicine*, pp 889-899, John Wiley & Sons, Ltd.
- [11] Lehman-McKeeman, L. D. (2008) Absorption, distribution, and excretion of toxicants, In *Cassarett and Doull's Toxicology: The Basis Science of Poisons* (Klaassen, C., and Watkins III, J. B., Eds.), pp 131-159.
- [12] Parkinson, A., Ogilvie, B. W., Buckley, D. B., Kazmi, F., Czerwinski, M., and Parkinson, O. (2015) Biotransformation of Xenobiotics In *Cassarett and Doull's Toxicology: The Basis Science of Poisons* (Klaassen, C., and Watkins III, J. B., Eds.), pp 185-366, McGraw Hill Professional.

- [13] Glatt, H., Boeing, H., Engelke, C. E., Ma, L., Kuhlow, A., Pabel, U., Pomplun, D., Teubner, W., and Meinel, W. (2001) Human cytosolic sulphotransferases: genetics, characteristics, toxicological aspects, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 482, 27-40.
- [14] Miners, J. O., McKinnon, R. A., and Mackenzie, P. I. (2002) Genetic polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferases and their functional significance, *Toxicology* 181, 453-456.
- [15] Chiou, W. L. (1989) The Phenomenon and Rationale of Marked Dependence of Drug Concentration on Blood Sampling Site, *Clinical Pharmacokinetics* 17, 175-199.
- [16] Jones, A. W., Lindberg, L., and Olsson, S.-G. (2004) Magnitude and Time-Course of Arterio-Venous Differences in Blood-Alcohol Concentration in Healthy Men, *Clinical Pharmacokinetics* 43, 1157-1166.
- [17] Kintz, P. (2004) Value of hair analysis in postmortem toxicology, *Forensic Science International* 142, 127-134.
- [18] Busardò, F. P., Bertol, E., Vaiano, F., Baglio, G., Montana, A., Barbera, N., Zaami, S., and Romano, G. (2014) Post mortem concentrations of endogenous gamma hydroxybutyric acid (GHB) and in vitro formation in stored blood and urine samples, *Forensic Science International* 243, 144-148.
- [19] Ferner, R. E. (2008) Post-mortem clinical pharmacology, *British Journal of Clinical Pharmacology* 66, 430-443.
- [20] Byard, R. W. (2013) Post mortem toxicology in the elderly, *Forensic science, medicine, and pathology* 9, 254-255.
- [21] Pélissier-Alicot, A.-L., Gaulier, J.-M., Champsaur, P., and Marquet, P. (2003) Mechanisms Underlying Postmortem Redistribution of Drugs: A Review, *Journal of Analytical Toxicology* 27, 533-544.
- [22] Skopp, G., Lutz, R., Ouml, L., Gan, B., Klinder, K., Schmidt, A., Aderjan, R., and Mattern, R. (1997) An In Vitro Experiment for Postmortem Vascular Permeation. The Passage of Morphine and Morphine Glucuronides Across a Vascular Wall, *Journal of Forensic Sciences* 42, 486-491.

- [23] Yıldırım, M. Ş., Sevinç, S., Akçan, R., Odabaşı, A. B., and Tümer, A. R. (2015) Use of Microbiological Methods in Postmortem Interval Estimation, *The Bulletin of Legal Medicine* 20, 56-59.
- [24] Reinhardt, G., Zink, P., and Legler, F. (1972) Bacteriological findings in cardiac blood of a cadaver, *Beitrage zur gerichtlichen Medizin* 31, 311-314.
- [25] O'Neal, C. L., and Poklis, A. (1996) Postmortem Production of Ethanol and Factors that Influence Interpretation: A Critical Review, *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 17, 8-20.
- [26] Castle, J. W., Butzbach, D. M., Walker, G. S., Lenehan, C. E., Reith, F., and Kirkbride, K. P. (2017) Microbial impacts in postmortem toxicology, In *Forensic Microbiology*, pp 212-244, John Wiley & Sons, Ltd.
- [27] Hearn, W., Keran, E., Wei, H., and Hime, G. (1991) Site-Dependent Postmortem Changes in Blood Cocaine Concentrations, *Journal of Forensic Sciences* 36, 673-684.
- [28] McKinney, P., Phillips, S., Gomez, H., Brent, J., MacIntyre, M., and Watson, W. (1995) Vitreous Humor Cocaine and Metabolite Concentrations: Do Postmortem Specimens Reflect Blood Levels at the Time of Death?, *Journal of Forensic Sciences* 40, 102-107.
- [29] Moriya, F., and Hashimoto, Y. (1996) Postmortem Stability of Cocaine and Cocaethylene in Blood and Tissues of Humans and Rabbits, *Journal of Forensic Sciences* 41, 612-616.
- [30] Yamazaki, M., and Wakasugi, C. (1994) Postmortem changes in drug-metabolizing enzymes of rat liver microsome, *Forensic Science International* 67, 155-168.
- [31] Curry, A. S., and Sunshine, I. (1960) The liver: Blood ratio in cases of barbiturate poisoning, *Toxicology and Applied Pharmacology* 2, 602-606.
- [32] Gee, D. J., Dalley, R. A., Green, M. A., and Perkins, L. A. (1974) Postmortem diagnosis of barbiturate poisoning, In *Forensic Toxicology: Proceedings of a Symposium Held at the Chemical Defence Establishment, Porton Down, 29-30 June 1972* (Ballantyne, B., Ed.), pp 37-51, John Wright & Son Ltd.
- [33] Holt, D. W., and Benstead, J. G. (1975) Postmortem assay of digoxin by radioimmunoassay, *Journal of Clinical Pathology* 28, 483-486.

- [34] Koren, G., and MacLeod, S. (1985) Postmortem Redistribution of Digoxin in Rats, *Journal of Forensic Sciences* 30, 92-96.
- [35] Pounder, D. J., and Jones, G. R. (1990) Post-mortem drug redistribution — A toxicological nightmare, *Forensic Science International* 45, 253-263.
- [36] Sawyer, W., Steup, D., Martin, B., and Forney, R. (1988) Cardiac Blood pH as a Possible Indicator of Postmortem Interval, *Journal of Forensic Sciences* 33, 1439-1444.
- [37] Yoshitome, K., Ishizu, H., and Miyaishi, S. (2010) Postmortem Acidification of Blood/Organs Induces an Increase in Flecainide Concentration in Cardiac Blood and the Contribution of the Lungs to This Increase, *Journal of Analytical Toxicology* 34, 26-31.
- [38] Nagasawa, S., Katagiri, N., Nara, A., Chiba, F., Kubo, Y., Torimitsu, S., Yajima, D., Akutsu, M., and Iwase, H. (2016) Postmortem redistribution mechanism of donepezil in the rat, *Forensic Science International* 266, 1-7.
- [39] Lemaire, E., Schmidt, C., Dubois, N., Denooz, R., Charlier, C., and Boxho, P. (2017) Site-, Technique-, and Time-Related Aspects of the Postmortem Redistribution of Diazepam, Methadone, Morphine, and their Metabolites: Interest of Popliteal Vein Blood Sampling, *Journal of Forensic Sciences*.
- [40] Gerostamoulos, D., Beyer, J., Staikos, V., Tayler, P., Woodford, N., and Drummer, O. H. (2012) The effect of the postmortem interval on the redistribution of drugs: a comparison of mortuary admission and autopsy blood specimens, *Forensic Science, Medicine, and Pathology* 8, 373-379.
- [41] Saar, E., Beyer, J., Gerostamoulos, D., and Drummer, O. H. (2012) The time-dependant post-mortem redistribution of antipsychotic drugs, *Forensic Science International* 222, 223-227.
- [42] Hilberg, T., Ripel, Å., Slørdal, L., Bjørneboe, A., and Mørland, J. (1999) The extent of postmortem drug redistribution in a rat model, *Journal of Forensic Science* 44, 956-962.
- [43] Leikin, J. B., and Watson, W. A. (2003) Post-mortem Toxicology: What The Dead Can And Cannot Tell Us, *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 41, 47-56.

- [44] Skopp, G. (2004) Preanalytic aspects in postmortem toxicology, *Forensic Science International* 142, 75-100.
- [45] Giaginis, C., Tsantili-Kakoulidou, A., and Theocharis, S. (2014) Applying Quantitative Structure–Activity Relationship (QSAR) Methodology for Modeling Postmortem Redistribution of Benzodiazepines and Tricyclic Antidepressants, *Journal of Analytical Toxicology* 38, 242-248.
- [46] Giaginis, C., Tsantili-Kakoulidou, A., and Theocharis, S. (2009) Quantitative structure–activity relationship (QSAR) methodology in forensic toxicology: Modeling postmortem redistribution of structurally diverse drugs using multivariate statistics, *Forensic Science International* 190, 9-15.
- [47] Pohland, R., and Bernhard, N. (1997) Postmortem serum and tissue redistribution of fluoxetine and norfluoxetine in dogs following oral administration of fluoxetine hydrochloride (Prozac®), *Journal of Forensic Science* 42, 812-816.
- [48] Pounder, D. J., Fuke, C., Cox, D. E., Smith, D., and Kuroda, N. (1996) Postmortem Diffusion of Drugs from Gastric Residue: An Experimental Study, *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology* 17, 1-7.
- [49] Moriya, F., and Hashimoto, Y. (1997) Postmortem diffusion of tracheal lidocaine into heart blood following intubation for cardiopulmonary resuscitation, *Journal of Forensic Science* 42, 296-299.
- [50] Hilberg, T., Bugge, A., Beylich, K.-M., Mørland, J., and Bjørneboe, A. (1992) Diffusion as a mechanism of postmortem drug redistribution: an experimental study in rats, *International journal of legal medicine* 105, 87-91.
- [51] Hilberg, T., Mørland, J., and Bjørneboe, A. (1994) Postmortem release of amitriptyline from the lungs; a mechanism of postmortem drug redistribution, *Forensic Science International* 64, 47-55.
- [52] Moriya, F., and Hashimoto, Y. (1999) Redistribution of basic drugs into cardiac blood from surrounding tissues during early-stages postmortem, *Journal of Forensic Science* 44, 10-16.
- [53] Tominaga, M., Michiue, T., Ishikawa, T., Kawamoto, O., Oritani, S., Ikeda, K., Ogawa, M., and Maeda, H. (2013) Postmortem Analyses of Drugs in Pericardial Fluid and Bone Marrow Aspirate, *Journal of Analytical Toxicology* 37, 423-429.

- [54] Winek, C. L., Morris, E. M., and Wahba, W. W. (1993) The Use of Bone Marrow in the Study of Postmortem Redistribution of Nortriptyline, *Journal of Analytical Toxicology* 17, 93-98.
- [55] Maskell, P. D., Albeishy, M., De Paoli, G., Wilson, N. E., and Seetohul, L. N. (2016) Postmortem redistribution of the heroin metabolites morphine and morphine-3-glucuronide in rabbits over 24 h, *International Journal of Legal Medicine* 130, 519-531.
- [56] Lemaire, E., Schmidt, C., Denooz, R., Charlier, C., and Boxho, P. (2016) Postmortem Concentration and Redistribution of Diazepam, Methadone, and Morphine with Subclavian and Femoral Vein Dissection/Clamping, *Journal of Forensic Sciences* 61, 1596-1603.
- [57] Lemaire, E., Schmidt, C., Denooz, R., Charlier, C., and Boxho, P. (2016) Popliteal Vein Blood Sampling and the Postmortem Redistribution of Diazepam, Methadone, and Morphine, *Journal of Forensic Sciences* 61, 1017-1028.
- [58] Hargrove, V. M., and McCutcheon, J. R. (2008) Comparison of drug concentrations taken from clamped and unclamped femoral vessels, *Journal of Analytical Toxicology* 32, 621-625.
- [59] Han, E., Kim, E., Hong, H., Jeong, S., Kim, J., In, S., Chung, H., and Lee, S. (2012) Evaluation of postmortem redistribution phenomena for commonly encountered drugs, *Forensic Science International* 219, 265-271.
- [60] Launiainen, T., and Ojanperä, I. (2014) Drug concentrations in post-mortem femoral blood compared with therapeutic concentrations in plasma, *Drug Testing and Analysis* 6, 308-316.
- [61] Tominaga, M., Michiue, T., Oritani, S., Ishikawa, T., and Maeda, H. (2016) Evaluation of postmortem drug concentrations in bile compared with blood and urine in forensic autopsy cases, *Journal of Analytical Toxicology* 40, 367-373.
- [62] Rook, E. J., Huitema, A. D., Ree, J. M. v., and Beijnen, J. H. (2006) Pharmacokinetics and pharmacokinetic variability of heroin and its metabolites: review of the literature, *Current clinical pharmacology* 1, 109-118.
- [63] Rentsch, K. M., Kullak-Ublick, G. A., Reichel, C., Meier, P. J., and Fattinger, K. (2001) Arterial and venous pharmacokinetics of intravenous heroin in subjects

- who are addicted to narcotics, *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 70, 237-246.
- [64] Sawyer, W. R., and Forney, R. B. (1988) Postmortem disposition of morphine in rats, *Forensic Science International* 38, 259-273.
- [65] Koren, G., and Klein, J. (1992) Postmortem redistribution of morphine in rats, *Therapeutic drug monitoring* 14, 461-463.
- [66] Crandall, C. S., Kerrigan, S., Agüero, R. L., LaValley, J., and McKinney, P. E. (2006) The influence of collection site and methods on postmortem morphine concentrations in a porcine model, *Journal of analytical toxicology* 30, 651-658.
- [67] Logan, B., and Smirnow, D. (1996) Postmortem distribution and redistribution of morphine in man, *Journal of Forensic Science* 41, 37-46.
- [68] Skopp, G., Ganßmann, B., Mattern, R., and Aderjan, R. (1996) Postmortem distribution pattern of morphine and morphine glucuronides in heroin overdose, *International journal of legal medicine* 109, 118-124.
- [69] Skopp, G., Lutz, R., Pötsch, L., Ganßmann, B., Klinder, K., Schmidt, A., Aderjan, R., and Mattern, R. (1997) An in vitro experiment for postmortem vascular permeation. The passage of morphine and morphine glucuronides across a vascular wall, *Journal of Forensic Science* 42, 486-491.
- [70] Gerostamoulos, J., and Drummer, O. H. (2000) Postmortem redistribution of morphine and its metabolites, *Journal of Forensic Science* 45, 843-845.
- [71] Levine, B., Green-Johnson, D., Moore, K., Fowler, D., and Jenkins, A. (2002) Assessment of the acuteness of heroin deaths from the analysis of multiple blood specimens, *Science & justice: journal of the Forensic Science Society* 42, 17-20.
- [72] Crandall, C. S., Kerrigan, S., Agüero Blau, R. L., LaValley, J., Zumwalt, R., and McKinney, P. E. (2006) The influence of site of collection on postmortem morphine concentrations in heroin overdose victims, *Journal of forensic sciences* 51, 413-420.
- [73] Tolliver, S. S., Hearn, W. L., and Furton, K. G. (2010) Evaluating the relationship between postmortem and antemortem morphine and codeine concentrations in whole blood, *Journal of analytical toxicology* 34, 491-497.

- [74] Rees, K. A., Pounder, D. J., and Osselton, M. D. (2013) Distribution of opiates in femoral blood and vitreous humour in heroin/morphine-related deaths, *Forensic science international* 226, 152-159.
- [75] Pragst, F., Spiegel, K., Leuschner, U., and Hager, A. (1999) Detection of 6-acetylmorphine in vitreous humor and cerebrospinal fluid—comparison with urinary analysis for proving heroin administration in opiate fatalities, *Journal of analytical toxicology* 23, 168-172.
- [76] Hargrove, V. M., and Molina, D. K. (2014) Peripheral postmortem redistribution of morphine, *The American journal of forensic medicine and pathology* 35, 106-108.
- [77] Papadodima, S., Athanaselis, S., Skliros, E., and Spiliopoulou, C. (2010) Forensic investigation of submersion deaths, *International journal of clinical practice* 64, 75-83.
- [78] Azparren, J. E., Cubero, C., Perucha, E., Martínez, P., and Vallejo, G. (2007) Comparison between lung weight and blood strontium in bodies found in seawater, *Forensic Science International* 168, 128-132.