

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

**ETANOL ALIMINI TAKİBEN ETİL GLUKURONİD VE ETİL
SÜLFAT'IN KAN VE İDRAR KONSANTRASYONLARI
KİNETİĞİNİN TÜRK TOPLUMUNDA GÖSTERİLMESİ**

Dr. Emre KARACAOĞLU
UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

ANKARA
2013

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

**ETANOL ALIMINI TAKİBEN ETİL GLUKURONİD VE ETİL
SÜLFAT'IN KAN VE İDRAR KONSANTRASYONLARI
KİNETİĞİNİN TÜRK TOPLUMUNDA GÖSTERİLMESİ**

Dr. Emre KARACAOĞLU
UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

Doç. Dr. Aysun BALSEVEN ODABAŞI
Tez Danışmanı

ANKARA
2013

TEŞEKKÜR

Gerek uzmanlık eğitimim sırasında ve gerekse tezimle ilgili çalışmanın yürütüldüğü esnada, benden katkı ve desteklerini esirgemeyen, uzmanlık tezimin oluşmasında en az benim kadar çaba gösteren danışmanım sayın Doç. Dr. Aysun Balseven Odabaşı'na ve saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Ali Rıza Tümer ile Doç. Dr. Ramazan Akçan'a; hatırası daima canlı kalacak olan beraber uyum ve dostluk içerisinde geçen mesai saatleri için değerli arkadaşlarım ve meslektaşlarım Dr. Özge Gülmez ve Dr. Eda Yılmaz'a en samimi teşekkürlerimi sunarım.

Birinin bitip diğerinin başladığı ve ömür boyu süreceğine kuşku duymadığım eğitim hayatımın en başından bugünlere dek, manen ve maddeten hep yanımda olan annem ve babama en derin sevgi ve şükranlarımı arz ederim.

ÖZET

Alkol, Adli tıp bilimi içerisinde zamanla önemi gittikçe artan bir maddedir. Özellikle trafik kazaları gibi adli olaylarda alkol alımının gösterilmesi gerekmektedir. Ancak, etil alkol değerinin kısa bir süre sonra kan ve idrarda tespit edilemeyecek düzeye inmesi nedeniyle, günümüzde etil alkol minor metabolitleri olan etil glukuronid (EtG) ve etil sülfatın (EtS) analizi önemli hale gelmiştir.

Çalışmamızda, 0,5 g/kg alkol alımı sonrasında kanda ve idrarda EtG ve EtS'nin kinetik değişimlerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Böylece, ilk kez Türk toplumunda bu metabolitlerin pik düzeyleri ve sıfırlanma süreleriyle ilgili bir deneysel çalışma gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamıza 17 (10 erkek, 7 kız) sağlıklı gönüllü katıldı. 0,5g/kg etanol alımını takiben 48 saatlik süre boyunca belirli aralıklarla kan ve idrar örnekleri toplandı. EtG ve EtS analizleri LC-MS/MS cihazında yapıldı.

Serum EtG ve EtS pik seviyeleri sırasıyla 0,13-0,389 mg/L (mean 0,240±0,075 mg/L SD) ve 0,211 – 0,5 mg/L (mean 0,334±0,091 mg/L SD) olarak tespit edildi. İdrar EtG pik değerleri 6,89-30,42 mg/L (mean 19,361±5,98 mg/L) bulunurken, EtS değerleri 10,5-58,17 mg/L (mean 30,0±14,06 mg/L) bulundu. Serumda 24. saatte, idrarda ise 48. saatte EtG ve EtS'nin tüm numunelerde tamamen sıfırlanmış olduğu görüldü. Serum EtG ve EtS değerleri arasında korelasyon saptandı.

Türk toplumunda gerçekleştirdiğimiz çalışma ile EtG ve EtS'nin tespit edilme süreleri ve 0,5 g/kg alkol alımından sonra ne kadarlık bir süre boyunca alkol alımının göstergesi olarak kullanılabileceği ortaya kondu ve çalışma sonuçlarının genel olarak literatürle uyumlu olduğu görüldü.

Anahtar Kelimeler: Etil glukuronid, Etil sülfat, Etanol, LC-MS/MS.

ABSTRACT

Alcohol is the substance whose importance is increasing gradually in forensic medical science. Alcohol intake needs to be shown especially in criminal cases. Because of reducing to under the limit of detection, ethyl alcohol does not be determined in a short time in both blood and urine. It has been recently important to analyze ethyl glucuronide (EtG) and ethyl sulfate (EtS), minor metabolites of ethanol.

In our study, it was aimed to show kinetics of EtG and EtS in blood and urine after taking 0.5 g/kg ethanol. Therefore, it was the first time that these metabolites' peak concentrations and time of vanishing were determined in Turkish people by an experimental study.

Seventeen (10 male, 7 female) healthy volunteers participated in the study. After taking 0.5 g/kg ethanol, blood and urine samples were collected during 48 hours. The samples were analyzed in LC-MS/MS.

Serum peak concentrations of EtG and EtS were found as 0.13-0.389 mg/L and 0.211 – 0.5 mg/L respectively. Levels of urine EtG peak concentrations was 6.89-30.42 mg/L and EtS was 10.5-58.17 mg/L. There was no EtG and EtS in all samples 24 hours later in blood and 48 hours later in urine. Additionally, correlation was found between serum EtG concentrations and serum EtS concentrations.

By this study conducted on Turkish population, determination times of EtG and EtS, and how long they can be used as a marker of alcohol intake after 0.5 g/kg ethanol intake were showed and results of the study were generally found parallel to the literature.

Key Words: Ethyl glucuronide, Ethyl sulfate, Ethanol, LC-MS/MS.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
GRAFİKLER DİZİNİ	viii
TABLOLAR DİZİNİ	ix
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	5
2.1. Alkolün Özellikleri ve Elde Edilişi.....	5
a) Fermantasyon Yolu	6
b) Distilasyon Yolu.....	8
2.2. Alkollü İçecekler	9
2.3. Alkol Metabolizması	10
2.4. Alkol İntoksikasyonu.....	12
2.5. Otopsi Bulguları.....	15
2.6. Alkol Düzeyi Tespiti.....	16
a) Canlılarda Alkol Düzeyi Tespiti.....	16
b) Postmortem Alkol Düzeyi Tespiti.....	17
2.7. Alkol Analizinde Yanıltıcı Durumlar	18

2.8. Alkol Analizinde Kullanılan Bazı Yöntemler	19
a) Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi	20
b) Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi.....	20
c) Sıvı Kromatografi-Kütle/Kütle Spektrometresi	21
d) Headspace Gaz Kromatografisi.....	21
2.9. Alkol Alımının Tespitinde Kullanılan Belirteçler	21
a) Akut Dönemde Kullanılan Belirteçler.....	22
b) Kronik ve Yoğun Alkol Alımını Gösteren Belirteçler	27
GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Çalışma Protokolü	30
3.2. Analitik Metot.....	31
BULGULAR	35
TARTIŞMA	43
SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALDH	Aldehid Dehidrogenaz
AST	Aspartat Aminotransferaz
ATP	Adenozin 3'-trifosfat
AUC	Areas under curve (Eğri altındaki alanlar)
BMI	Body Mass Index (Vücut Kitle İndeksi)
CDT	Carbonhidrat Deficient Transferrin (Karbonhidrattan yoksun transferrin)
CMK	Ceza Muhakemesi Kanunu
EtG	Etil Glukuronid
EtS	Etil Sülfat
G3P	Gliseraldehit-3-fosfat
GGT	Gamaglutamil Transferaz
HA	Hyalunurik Asit
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi
HSGC	Headspace Gaz Kromatografisi
İS	İnternal Standart
LOD	Limit of Detection
LOQ	Limit of Quantation
MCV	Mean Corpuscular Volume (Ortalama Korpuskuler Hacim)
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
PEth	Fosfotidiletanol
TCK	Türk Ceza Kanunu
TMK	Türk Medeni Kanunu

YAEE	Yağ Asiti Etil Esterleri
-OH	Hidroksil
5-HIAA	5-Hidroksiindolasetikasit
5-HIAL	5-Hidroksiindolasetaldehite
5-HTOL	5-Hidroksitriptofol

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: Kan EtG Değerleri.....	36
Grafik 2: Kan EtS Değerleri.....	37
Grafik 3: Ortalama Kan EtG ve EtS Değerleri.....	38
Grafik 4: İdrar EtG Değerleri.....	40
Grafik 5: İdrar EtG Değerleri.....	41
Grafik 6: Ortalama İdrar EtG ve EtS Değerleri.....	42

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Alkollü İçeceklerdeki Etanol Konsantrasyonları.....	9
Tablo 2: Alkollü İçeceklerin Alımıyla Ortaya Çıkacak Yaklaşık Kan Etanol Düzeyi.....	9
Tablo 3: Kan Alkol Düzeyi ve Davranış Değişiklikleri.....	13
Tablo 4: Alkol Alımının Tespitinde Kullanılan Belirteçler.....	22
Tablo 5: EtG ve EtS'nin Kan ve İdrar Konsantrasyonları Kinetiğinin İncelendiği Diğer Çalışmalarla Karşılaştırma.....	48

GİRİŞ

Akut ve kronik etkileriyle önemli bir sağlık sorunu olmasının yanı sıra alkol tüketimi, göz ardı edilmez toplumsal sonuçları olan ve gerek mortalite, gerekse de morbidite açısından dikkate alınması gereken sosyal bir olgudur (1). Ayrıca, toksisitesi ve bağımlılık yapıcı etkisiyle önemli tıbbi, psikolojik ve toplumsal zararlara yol açan bir madde olması nedeniyle alkol, sıradan bir içecek ya da tüketilen sıradan bir ürün olarak değerlendirilemez (1). Bu nedenden ötürü sosyoloji, psikiyatri, psikoloji, dâhili tıp gibi pek çok bilim dalının ilgi alanına girmekle birlikte, adli tıp içerisinde de kayda değer bir yere sahiptir. Son zamanlarda adli tıp sahasında alkol ve metabolitleri üzerine, gerek kan ve idrar başta olmak üzere vücut sıvılarında ve gerekse de çeşitli vücut dokularında yürütülmekte olan çalışmalar konunun ne denli ciddiye alındığını ve adli tıp alanında işgal ettiği yeri gösterir mahiyettedir. Her tür ölüm olgusunda, kaza, intihar ve cinayet gibi doğal olmayan ölüm olgularının büyük kısmında kanda alkole rastlanmaktadır. Hatta birçok ölüm olayında alkolün yardımcı faktör olarak ortaya çıktığı bilinmektedir (2, 3).

Ölüm olguları dışında çeşitli küçük ve büyük boyutlu suçlarda da, Amerika ve birçok Avrupa ülkesinde alkolün etkisi araştırılmıştır. Bu bağlamda; ciddi alkol alımı ile işlenen suçları inceleyen önceki çalışmalarda cinsel suç saldırganlarının %80'inin alkollü olduğu tespit edilmiştir ki bu yüzdeyle cinsel suç saldırganları başı çekmektedir. Ardından, %60'lık alkol oranıyla trafik kazasına sebep olanlar gelmekte; yangına sebebiyet verenler ise %16'lık bir alkol alım oranına sahip görünmektedir. Ayrıca, trafik kazasında ölenlerin %50'sinin, düşerek ölenlerin %45'inin, cinayet işleyenlerin %50-70'inin alkollü oldukları saptanmıştır (3). Alkol alımıyla ilişkili olan tüm bu durumlarla alakalı olarak yasalarımızda (TCK, TMK)

çeşitli düzenlemeler yapılmış; hem trafik suçları ve hem de alkolizmin getirdiği sorunlar dikkate alınmış ve bazı yaptırımların uygulanması kararlaştırılmıştır (4, 5). Hatta çok yakın bir zamanda, 11.06.2013 tarih ve 28674 sayılı Resmî Gazete’de yayınlanan 6487 sayılı kanunla Kefalet Kanunu’na bazı eklemeler yapılmıştır. Buna göre; içki tüketiminin teşvik ve özendirilmesinin önüne geçmek maksadıyla alkollü içkilerin herhangi bir şekilde tanıtım ve reklamının yapılması yasaklanmış, 22:00 ile 06:00 arasında perakende satışı engellenmiş, tüketiminin alkollü içki sunum izni verilen yerlerde yapılabileceği belirtilerek daha bir dizi düzenleme ve eklemeler karara bağlanmıştır.

Alkol alımının tespiti için uygulanmakta olan testler; akut dönemde alkol alım iddiasını reddeden olgularda hekime yol göstermek, kronik içicilerde görülen sağlık sorunlarını erken dönemde yakalamak, alkol bağımlılarında tedavinin takibini sağlayabilmek gibi sağlık taraması amacına hizmet etmekle birlikte; cezai yaptırımlar nedeniyle de alkol alımının gösterilmesi önem kazandığından, daha hassas ve özgül ölçümler için adli tıp sahasında çalışmalar yürütülmektedir.

Etil alkol, suda çözünbilme özelliği sayesinde hemen tüm vücut sıvılarında kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Ancak, eliminasyonunun gayet hızlı olması ve kişiden kişiye farklılık gösterebilen metabolizma hızı gibi nedenlerden dolayı, alkol alımının tespitinde sadece kanda etanolün gösterilmesinin yeterli olmadığı ortaya çıkmış, böylece başka testlerin kullanılması gerekmiştir (6, 7).

Alımdan sonra hızla absorbe olmaya başlayan etil alkol, yine hızla eliminasyon sürecine girmekte, dolayısıyla ölçümlerde kısa bir süre sonra düzeyinin azaldığı görülmektedir. Elbette, kişisel faktörler bu metabolizasyon sürecine oldukça yoğun şekilde etki etmekte ve bu etanol seviyesinin düşüşünde kişisel farklılıklar öne çıkmaktadır. Bu nedenle, alkolün sadece vücut sıvılarındaki anlık ölçümlerle elde

edilen düzeyi değil, kişinin alkole verdiği yanıt da mutlaka değerlendirilmelidir. Tüm faktörlerin eşitlendiği durumlarda bile her kişinin alkole verdiği yanıt farklı olabilmektedir (8). Hatta bunun da ötesinde, aynı kişinin farklı zamanlarda veya farklı koşullarda farklı yanıtlar vermesi mümkün olabilmekte, bu nedenle açlık-tokluk durumu, günün hangi saatinde alkol alındığı, sigara ya da çeşitli ilaçlarla birlikte alımı gibi uzun bir listeyi kolaylıkla doldurabilecek sayıda etkenin hesaba katılması gerektiği anlaşılmaktadır.

Etil alkol tespitinde –özellikle adli tıbbi incelemelerde önem kazanan- bir zorluk da, ölüm sonrası tespit edilen etil alkolün ne derece güvenilir olduğu sorunudur. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki ölü bedende üreyen ve bu esnada metabolik faaliyetlerini sürdüren çeşitli mikroorganizmalar etil alkol üretebilmektedir. Dolayısıyla, postmortem vücut sıvılarında tespit edilen etanolün mikrobiyal kontaminasyon ve fermentasyon ile mi oluştuğu, yoksa kişinin antemortem dönemde aldığı alkol mü olduğu sorusunun aydınlatılması gerekmektedir. Bu karışıklığın giderilmesine yönelik adli bilimler sahasında bazı çalışmalar yürütülmektedir (3). Sonuçta etil alkolün kendisiyle çözilemeyen bu sorun, tıpkı uzun saatler sonunda artık ölçülemez düzeye inen etanol nedeniyle alkol alımının tespiti için etanolün metabolitlerine bakılması gerektiğine benzer şekilde, bilimsel araştırmaları yine etil alkolün minor metabolitlerine kaydırmıştır.

Alkol alımının tespitine yönelik olarak; başlıca iki ana grupta incelenebilecek olan kronik ve yoğun alkol alımını gösteren testler ile akut alkol alımını gösteren testler uygulanmaktadır. Günümüzde kronik ve yoğun alkol alımını gösteren testlere gama glutamiltransferaz (GGT), ortalama korpusküler hacim (MCV) ve carbonhydrate deficient transferin (CDT) gibi göstergeler örnek verilebilir. Aslında bunların -PEth hariç tutulursa- başka amaçlarla da rutinde bakılan kan parametreleri olduğu görülmektedir. Alkol alımıyla kronik dönemde vücutta ortaya çıkma ihtimali

olan çeşitli hastalıklar ve metabolik bozukluklar GGT, MCV ve CDT’de normal dışı değerlerin bulunmasına neden olduğundan, etanolün kendisi ya da metabolitlerinin tespitinden ziyade, kronik alkol alımı dolaylı bir şekilde alkole bağlı vücuttaki hasarın gösterilmesi prensibine dayanmaktadır. Bunların aksine PEth ise, etanolün minor metabolitlerindendir ve ancak uzun süre ve yoğun şekilde alkol alımı gerçekleşirse eritrosit membranında sentezlenebilmekte olduğundan, kronik alkol alımının bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Akut alkol alımı, doğrudan etanolün yıkım ürünlerinin tespitine dayanmaktadır. Bu bağlamda; etil glukronid (EtG), etil sülfat (EtS), yağ asit etil esterleri(YAEE) gibi alkol metabolizmasının minor non-oksidatif metabolitleri örnek verilebilir. Bunların dışında, alkol alımının gösterilmesi yönünde serotonin metabolitleri üzerinde de çalışmalar sürdürülmektedir (9-11).

Türk popülasyonunda canlı bireylerde yürütülen bu çalışma ile belirli aralıklarla yapılan ölçümler sayesinde etil alkol minor metabolitlerinden EtG ve EtS’nin kanda ve idrarda tespit edilme süreleri, pik konsantrasyon değerleri ve zamanı gibi değişim özelliklerinin gösterilmesi; böylece, popülasyonumuzda EtG ve EtS’nin 0,5g/kg alkol alımını takiben ortalama ne kadar süre zarfında alkol alımının göstergesi olarak kullanılabileceğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Alkolün Özellikleri ve Elde Edilişi

Alkol, karbon atomuna doğrudan hidroksil (-OH) grubu bağlanmış organik bileşiklerin genel adıdır ve çok sayıda alt tipi bulunmaktadır. Ancak, yaygın olarak alkol denildiğinde kast edilen ve en çok kullanılanları, sanayi alanında çözücülüklerinden de faydalanılan etil alkol ve metil alkoldür (12).

İnsanlar için gayet toksik bir madde olan metil alkol (metanol), bu özelliğinden dolayı sadece sanayi ve kimya alanlarında çözücü olarak kullanılmakta, alkollü içecekler içerisinde bulunmamaktadır. Metanol'ün lethal dozuyla ilgili değişik değerler verilse de, genel olarak 100 mL civarında olduğu kabul edilmektedir. Bununla birlikte 15 mL %40'lık metanol alımına bağlı ölüm olguları bildirilmiştir. Metanole bağlı en sık görülen ve çok küçük dozlarda alımdan sonra bile ortaya çıktığı bildirilen bulgu ise optik sinir hasarıdır. Literatürde 4 mL gibi oldukça düşük dozda metanol tüketimini takiben körlük gelişen olgular rapor edilmiştir.

Kimyasal formülü CH_3OH olan metanol, CH_4O şeklinde de gösterilebilir ve en basit alkol bileşiği olarak kabul edilmektedir. Uçucu, hafif, renksiz ve yanıcı olması yanısıra kokusu etanole benzer bir özelliktedir. Kaynama noktası $64,7\text{ }^\circ\text{C}$, erime noktası ise $-97,6\text{ }^\circ\text{C}$ olup, dansitesi ise $0,791\text{ g/cm}^3$ değerindedir.

Vücutta metabolize edilmeye uygun tek alkol türü olan etil alkol (etanol); berrak, renksiz, kendine özgü hafif bir kokusu olan bir sıvı olmakla birlikte akıcılık ve uçuculuk niteliklerine de sahip olan hidroskopik bir maddedir. Normal ışık altında pek seçilemeyen dumansız mavi bir alev çıkararak yanar. Yanıcı özellik taşıyan sıvılar içerdikleri yanıcı maddenin oranına bağlı olarak, belli derecedeki sıcaklıklara

gelene kadar ısıtıldıklarında kendiliğinden alevlenmektedir ve bu noktaya alevlenme noktası denir. Yüzde 10'luk etanol için alevlenme noktası 49 C°, %20'lik için 36 C° ve %30'luk için 29 C° iken; etanol oranı %96'ya çıkarıldığında alevlenme noktası 17 C°'ye kadar düşmektedir. Bu değerler, etanolün ne kadar yanıcı bir madde olduğunu açıklıkla ortaya koymaktadır. Etanol, kimyasal formülü C₂H₅OH ya da C₂H₆O şeklinde yazılabilen, nötr özellikte bir bileşiktir. Kaynama noktası 78,37 C° olup, sudan epeyce aşağıda bir değerdedir. Erime noktası ise -114 C° değerinde ve dansitesi 0,789 g/cm³'tür (20 C° de) (12, 13).

Etil alkol yerine hububat alkolü, şarap ruhu ya da kolonya ruhu da denilmektedir. Etanolden özellikle sanayide çözücü özelliğinin yanı sıra, diğer kimyasalların hazırlanmasında da yararlanılmaktadır. Bununla birlikte; alkollü içkiler alkol türü olarak sadece etanol içermektedir. Alkollü içkilerdeki alkol miktarı, içkinin nasıl hazırlandığına bağlı olarak, hacmen %4-6 (bira) ile %40-55 (votka, rakı, viski, cin) arasında geniş bir yelpazede dağılım göstermektedir (14).

Etil alkolün elde edilişinde başlıca iki yol vardır. Bunlar fermantasyon yolu ve distilasyon yoludur.

a) Fermantasyon Yolu

Meyve, bal ve tahılların (arpa, buğday vb.) içinde bulunan şekerlerle polisakkaritlerin maya mantarları tarafından fermantasyonu sonucunda elde edilir. Ancak, fermantasyon ortamında alkol konsantrasyonu %15-17'ye eriştiğinde, maya mantarlarının metabolizması bu alkol konsantrasyonundan etkilendiği için fermantasyon durur. Dolayısıyla, bu yol ile alkol üretimi yapıldığında yüksek konsantrasyonda etanol elde edilemez.

Fermentasyon reaksiyonları glikolizde bir molekül glikozun ($C_6H_{12}O_6$) parçalanıp, böylece ortamda pirüvat ($C_3H_4O_3$) oluşmasıyla başlar. Bu sürecin devamında bir adet glikozdan toplam olarak iki adet gliseraldehit-3-fosfat (G3P) molekülü elde edilir. Sonrasında bir adet nikotinamid adenin dinükleotit (NAD^+) molekülü G3P'den bir hidrojen atomu çıkararak G3P'yi 3-bifosfogliserata ve NAD^+ 'ı da NADH'ye dönüştürür. Oksijenli ortamda NADH'deki hidrojen başka moleküllere aktarılacak sonunda oksijenle reaksiyona girer ve su (H_2O) oluşturur ve sonuç olarak bu yolla Adenozin 3'-trifosfat (ATP) üretilir. NADH tekrar NAD^+ 'ya dönüşür ve tekrar kullanılabilir.

Yeterince oksijen olmadığı durumlarda ise hücredeki tüm NAD^+ , NADH'ye dönüşür ve nihayet G3P daha fazla 3-bifosfogliserata dönüşemez. NADH'deki hidrojeni alacak başka bir bileşik olmazsa daha fazla ATP de üretilemez.

İşte bu noktada fermentasyon, reaksiyonun devam ettirilmesini sağlamaktadır. Etil alkol fermentasyonunda pirüvatteki iyonlaşmış karboksil grubu (COO^-) bağlı olduğu yerden ayrılıp bir molekül karbon dioksit (CO_2) olarak ortama salınır. Artan kalan molekül asetaldehit (C_2H_4O) molekülüdür ve NADH'nin hidrojenini alarak ortamda bulunmayan oksijenin işlevini görür. Bu hidrojen, glikolizin önceki aşamasında açığa çıkan bir H^+ iyonu ile beraber, asetaldehide eklenir ve böylece etanol (C_2H_6O) sentezlenmiş olur.

Alkol şekerinin fermentasyonu birçok basamağı olan reaksiyonlar zinciri şeklinde olup, kısaca;

$C_6H_{12}O_6$ (Glikoz) $\rightarrow$ 2 C_2H_5OH (Etanol) + 2 CO_2 + 2 ATP olarak gösterilebilir. Bira ve şarap bu şekilde elde edilmektedir.

b) Distilasyon Yolu

Yüksek konsantrasyonda alkol içeriğine sahip içecekleri üretebilmek amacıyla, fermentasyon yoluyla elde edilen ve %15 civarında etanol konsantrasyonuna sahip olan sıvıdan etanolün ayrıştırılması gerekmektedir. Bu noktada, etanolün sudan daha düşük sıcaklıkta kaynaması ve uçuculuk özelliği ile birlikte daha kolay buharlaşmasından faydalanılır. Isıtılan düşük etanol konsantrasyonuna sahip sıvıdan kolayca buharlaşarak ayrılan etanol, ayrı bir yerde toplanır. Böylece yüksek miktarda etanol konsantrasyonuna sahip içkiler üretilir. Rakı, votka, cin, viski ve konyak distilasyon yolu ile elde edilen içkilere örnek verilebilir.

Her ne kadar alkollü içecekler içerisinde alkol bileşiklerinden sadece etanolün bulunması istenir ve buna yönelik işlemlerden geçirilir ise de; fermentasyon sırasında etil alkolden başka az miktarda 3-8 karbonlu alifatik alkoller, çeşitli aldehit türevleri, organik asitler, esterler, ketonlar ve metil alkol de oluşmaktadır. Çoğu tıpkı etanol gibi uçucu madde olan bu bileşikler, distilasyon işlemi uygulanmış içkilere de geçebilmektedir. Dolayısıyla etil alkol içeren her içkide eser miktarda da olsa bu tür maddelere rastlanabilmektedir (3). Ancak bu nedenle herhangi bir intoksikasyon olgusu bildirilmemiştir.

Fermentasyon yolu ile genel olarak meyve ve tahıllardan düşük konsantrasyonda alkollü içkiler üretilmesi, Amerika ve pek çok Avrupa ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de evde belirli bir miktarda ve kişisel tüketim amaçlı fermente alkollü içki üretilmesinin yasal olmasını beraberinde getirmiştir. Buna karşılık, distile içki üretimi ancak uygun tesislerde ve gerekli izin sağlandığında mümkün olabilmektedir.

2.2. Alkollü İçecekler

Fermantasyon ya da distilasyon yoluyla meyve ya da tahıllardan üretilen alkollü içecekler üretim şekline ve üretim yerine göre değişen konsantrasyonlarda etanol içermektedir. Bazı alkollü içeceklerdeki etanol konsantrasyonları Tablo 1’de gösterilmiştir (15).

Tablo 1: Alkollü İçeceklerdeki Etanol Konsantrasyonları

İçecek Türü	Bira	Şarap	Cin	Kanyak	Rakı	Votka	Viski	Rom
Etanol İçeriği (%)	3-7	4-12	34-45	40-55	40-50	40-50	45-60	40-60

Kan etil alkol düzeyi mg/dL ya da promil cinsinden belirtilir. Promil, kan etil alkol düzeyinin g/L cinsinden değeri olup, buna göre 0,01 promil = 1 mg/dL’dir. Bazı alkollü içeceklerin belli miktarlardaki alımlarında ortaya çıkacak kan etanol düzeyinin yaklaşık promil değerleri Tablo 2’de gösterilmiştir (16).

Tablo 2: Alkollü İçeceklerin Alımıyla Ortaya Çıkacak Yaklaşık Kan Etanol Düzeyi

Alkollü İçecek	Hacim (mL)	Promil Değeri
1 double rakı	74 mL	0,5 promil
1 double kanyak	74 mL	0,5 promil
1 double votka	74 mL	0,5 promil
1 double viski	50 mL	0,5 promil
1 double cin	50 mL	0,5 promil
2 kadeh şarap	200 mL	0,5 promil
2 şişe (küçük) bira	800 mL	0,5 promil

2.3. Alkol Metabolizması

Hemen her zaman oral yoldan vücuda alınan etil alkolün esas olarak (%80) emiliminin gerçekleştiği yer ince barsaklardır. İnce barsaklardan yaklaşık olarak suyun emildiği hızda ve içerdiği alkol konsantrasyonuyla orantılı olarak kısa sürede emilir. Bununla birlikte, ağız mukozası ve özofagustan emilimi ihmal edilecek kadar azdır. Mideden ise %20 oranında emilim gerçekleşmektedir. Daha sonra sıvı kompartmanlara oldukça yakın alanlara dağılır (17, 18). Mideden emilim, ince barsaklara oranla az olsa da, midenin boş olması emilim hızını yükseltir. Beraberinde karbonhidrat, protein ve özellikle de yağlı gıdaların alınışı mideden emilimi ve alkol emiliminin daha yüksek oranda gerçekleştiği ince barsaklara geçişi geciktirmektedir. Bu bağlamda, yağlı yiyecekler sindirim sırasında midenin boşalmasını geciktirerek, yüksek alkol konsantrasyonlu içkiler ise pilor spazmı ve gastrik atoni yaparak alkolün emilimini geciktirirler. Kişisel özellikler de emilime etki etmektedir. Örnek olarak, içki alışkanlığı olan kişiler alkolü çok daha çabuk absorbe eder. Kişinin emosyonel durumu da mide kontraksiyonlarını etkiler ve midenin boşalma zamanını uzatabilir (18-20).

Alkol polar bir maddedir ve vücuttaki dokular içerdikleri su miktarı ile doğru orantılı olarak alkol tutmaktadır. Bu nedenle kemik ve yağ dokusu gibi hidrofobik dokularda alkol konsantrasyonu çok düşüktür. Aynı vücut ağırlığına sahip kişilerden yağ dokusu daha az olanlar, yağ dokusu daha fazla olanlara oranla daha düşük kan alkol düzeyine sahip olurlar. Bu özellik kadınlar için de geçerlidir. Aynı ağırlıktaki erkeğe göre, aynı miktarda alkol alan kadında –daha fazla yağ dokusuna sahip olduğundan- kan alkol konsantrasyonu yaklaşık olarak %25 daha yüksektir. Etil alkol tüm vücut sıvılarına geçer ve kandakine yakın konsantrasyonda bulunur (18, 19).

Kan alkol seviyesi, alınan alkolün miktarı, cinsi, alınma hızı, alkol konsantrasyonu, kişinin alkol metabolizmasını etkileyen ilaç ya da madde kullanma durumu, midenin boş veya dolu olması ve kişiye ait faktörlere bağlı olarak farklılıklar gösterir. Tolerans başta olmak üzere cinsiyet, ağırlık, fiziksel yapı, diabet, psikojenik faktörler de etkilidir. Kan alkol düzeyi alkol alımından sonra yaklaşık 40-50 dakikada pik değerine ulaşır ve alımından 60-90 dakika sonra da emilim tamamlanır (3, 19).

Emilime uğrayan alkolün %90'ı, midenin ihmal edilebilecek düzeydeki katkısı göz ardı edildiğinde, karaciğerde metabolize olmaktadır (21). Kalan %10'dan az kısım ise idrar, ter ve solunum havasıyla atılmaktadır. Karaciğerdeki alkol metabolizasyonu oksijenli ve oksijensiz yıkım olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Oksijenli yıkım etanolün, alkol dehidrogenaz (ADH) enzimi sayesinde asetaldehite; asetaldehidin de aldehid dehidrogenaz enzimi aracılığıyla asetata dönüşmesinden ibaret olup, esas alkol metabolizasyon yolu burasıdır (22). Bunun dışında mikrozomal enzimler ve katalaz yoluyla da alkol yıkımı gerçekleşmekte olup metabolizasyona katkıları düşüktür. Ancak mikrozomal enzimlerin bir önemli özelliği; çeşitli polimorfizmler nedeniyle kişilerdeki alkol tolerans farklılığına ve bazı ilaç metabolizmalarından da sorumlu olmaları nedeniyle alkol-ilac etkileşimlerinin görülmesine neden olmalarıdır (22). Karaciğerde gerçekleşen oksijensiz yıkım ise etil glukuronid, etil sülfat, fosfatil etanol ve yağ asidi etil esterleri gibi etanol minör metabolitlerinin oluşmasını sağlamaktadır (23).

Ağızdan alınan alkol; çok az miktarda olmakla birlikte midede ve daha sonra barsaklardan emilerek karaciğere ilk ulaştığı anda bir metabolizasyona uğramakta ve kan alkol düzeyinde azalma süreci böylece başlamaktadır. Bu ilk metabolizasyona "ilk geçiş etkisi" denilmektedir. Esas olarak midedeki metabolizasyon küçük olsa da, yaygın olarak gastrik ADH enzimi eksiliğine sahip Japon toplumunda ilk geçiş

etkisinin olmaması ya da daha hafif olmasının; alkol toleranslarını azalttığı kabul edilmektedir (22).

Alımından sonra hızla emilime uğrayan alkol, metabolizasyon sürecine girdiğinde kan alkol düzeyi azalmaya başlar. Kan alkol düzeyinin saatte ortalama %12-20 mg/dL azaldığı kabul edilmektedir (24).

2.4. Alkol İntoksikasyonu

Etil alkol merkezi sinir sisteminde önemli etkiler ortaya çıkarmaktadır. Alkol alımı sonrasında görülen rahatlama ya da uyarılma gibi stimulan etkileri nedeniyle alkolün stimulan bir madde olduğu izlenimi açığa çıksa da; aslında bu işlevini merkezi sinir sisteminde inhibitör sinirleri inhibe etmesine borçludur. Dolayısıyla, merkezi sinir sistemi depresanı olarak etki eder (25). Kan alkol düzeyi arttıkça ortaya çıkan belirtilerde de değişiklikler dikkati çeker. 10-50 mg/dL düzeyinde iken çoğu kişi tamamen normal görünmekle birlikte, düşüncede açıklık, kendine güven, öfori, atılganlık, konuşkanlık ve rahatlık ön plandadır.

Kan alkol seviyesinin artmasına bağlı olarak başlangıçta muhakeme gibi yüksek fonksiyonlar etkilenir; ardından vejetatif fonksiyonlara doğru yayılan ilerleyici bir depresyon gelişir. Kas koordinasyonunda bozulma ve otonomik fonksiyonların etkilenmesi bunu takip eder. Tüm bu etkilerin belirli kan alkol değerlerinde ortaya çıktığı belirlenmiş olsa da; kişinin alkol kullanımıyla alakalı olarak kazandığı tolerans kabiliyeti, belirtilerin olması gerekenden daha yüksek seviyelerde görülmesine neden olur (2, 26).

Kan alkol düzeyi arttıkça ortaya çıkan belirtiler Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3: Kan Alkol Düzeyi ve Davranış Değişiklikleri (27, 28).

Kan Alkol Düzeyi (mg/dL)	Belirtiler
< 30	Araç kullanma gibi karmaşık becerilerde zorlanma
30-50	Düşünme ve motor koordinasyonda hafif bozulma Konuşkanlık Rahatlık
50-100	Duygudurum değişikliği (neşeli ya da mutsuz) Fazla konuşma, gülme Yoğunlaşma ve muhakeme gücünde bozulma Seksüel disinhibisyon
100-150	Hareketlerde uyumsuzluk Yürüme bozukluğu Konuşmada bozukluk Olası mide bulantısı
150-200	Belirgin sarhoşluk Amaca yönelik koordine hareketlerde bariz bozulma Ataksi Mide bulantısı Çift görme
200-300	Stupor Kusma Olası koma
300-350	Uyku hali Amnezi Stupor / koma Kusmaya bağlı gıda aspirasyonu tehlikesi
>350	Solunum merkezi depresyonuna bağlı ölüm tehlikesi

Literatürde özellikle 300 mg/dL'nin üzerinde ölümün ortaya çıktığı belirtilmekle birlikte; kan alkol değerleri 500 mg/dL üzerinde olduğu halde hayatını devam ettiren, kronik alkoliklere rastlandığı belirtilmektedir (3, 28). Bununla birlikte, merkezi sinir sistemine etil alkol ile aynı yönde etki yapan maddeler birlikte alındığında (hipnotik, sedatif ilaçlar gibi) düşük miktarlardaki kan alkol seviyelerinde de ölüm meydana gelebilir.

Akut alkol entoksikasyonu sonucu letal doza bağlı ölümlerde rol alan mekanizmalar:

1. Solunum depresyonu
2. Myokard depresyonu
3. Alkolik ketoasidoz
4. Hipoglisemik konvülsiyonlar ve koma
5. Hipotermi'dir.

Alkol letal dozuna bağlı olarak ölüme yol açan esas mekanizma solunum merkezinin depresyonudur. Etanol metabolizması sırasında ADH enzimi sayesinde sonucu oluşan asetaldehit, yüksek miktarlarda oluştuğunda solunum depresyonuna yol açar.

Aç karnına alkol alınması durumunda ya da çocuklarda hipoglisemik konvülsiyonlar ve koma ortaya çıkabilir. Bunların dışında hipotermi, akut akciğer ödemi, bradipne, apne, kollaps, şok tablosunun gelişmesine ve sonuçta ölüme yol açabilir.

Başta kardiyovasküler hastalıklar ve KOAH olmak üzere kişide mevcut dahili hastalıklar etkilerin ortaya çıkmasını kolaylaştırarak, ölümün daha çabuk görülmesine sebep olabilir (3).

Bazen sekonder durumlar ölüme yol açabilir. Örnek olarak, aşırı gıda alımından sonra gelişen aspirasyona bağlı asfiksi sonucu ölüm görülebilir. Cafe coronary olarak isimlendirilen bu durum, alkol alımı sonrasında görülen sekonder patoloji sonucu ölümün meydana geldiği duruma örnektir (29). Benzer olarak, alkol intoksikasyonuna bağlı gelişen ağır akciğer ödemi, pnömoni ve beyin ödemi gibi yan patolojiler nedeniyle ölüm görülebilir. Ayrıca, travmalar da alkol intoksikasyonunda görülebilen ölüm nedenleri arasındadır. Entoksike kişilerde trafik kazaları, yüksekten düşme, saldırı olayları, suda boğulma, elektrik çarpması ve yanıklar gibi ölümcül olaylar sık görülür. Ayrıca, cinayet ve intihar olaylarında da alkolün tartışılmaz bir rolü vardır (3).

2.5. Otopsi Bulguları

Akut alkol entoksikasyonlarında; iç organlarda, akciğer ve beyinde ödem, konjesyon, hiperemi gibi spesifik olmayan otopsi bulgularına rastlanmaktadır. Bunların dışında; mide mukozasında kanamalar veya akut gastrit görünümü ile karşılaşılabilir. Ölümün, akut alkol alımına bağlı olarak merkezi solunum depresyonuna, diğer ölüm mekanizmalarına ya da gıda aspirasyonuna bağlı olup olmadığına karar verilebilmesi için otopsi bulguları önem taşımaktadır. Özellikle gıda aspirasyonu yönünden dikkatlice inceleme yapılmalıdır. Kronik alkoliklerde, alkolün uzun süreli olumsuz etkileri karaciğer başta olmak üzere iç organlarda kayda değer patolojik bulguların saptanmasını sağlamaktadır. Ancak, tüm bunlara rağmen kesin

tanı kan, idrar, göziçi sıvısı ya da diğ er vücut sıvılarından alınan numunelerde alkol ya da metabolitlerinin tespiti sayesinde konulabilmektedir (3, 27).

2.6. Alkol Düzeyi Tespiti

a) Canlılarda Alkol Düzeyi Tespiti

Alkol ve metabolitleri pek çok vücut sıvısından  alışılabilmekle beraber genel olarak, düzey tespiti için solunum havası ya da kan  rneği kullanılmaktadır.

Solunum Havasında Alkol Tespiti

Alkol kan dolaşımı sayesinde akciğerlere geldiğinde bir kısmı alveollere geçerek havaya karışır. Alveol havası içindeki alkol yoğunluğu, kandaki alkol yoğunluğuyla orantılıdır ve alkolmetre ile ölçülen şey, alveol havasındaki bu havaya karışmış olan alkoldür. Solunum havasındaki alkolün kan alkol ne oranı 2100:1 ya da 2300:1 olarak kabul edilir. Yani 2100–2300 mililitre alveol havası, 1 mililitre kan ile aynı alkol oranını taşımaktadır. Günümüzde uluslararası kabul gören oran 1:2300'd r (30).

Kullanım kolaylığı ve hızlı sonuç elde etme avantajlarına sahip olan solunum havasında alkol ölçüm yöntemi için alkolmetre cihazlarından faydalanılmaktadır. Özellikle trafik denetlemelerinde ve diğ er adli olaylarda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Sonuç promil cinsinden ifade edilmektedir. Ancak alkolmetreye üflemeden önce akciğerki  l  boşlukların havası dışarı atılmalıdır ve bu nedenle zorlu bir ekspirasyon gerekmektedir. Alkol alımından 15 dakika sonra yapılan ölçümlerin doğru sonuçlar verdiği gösterilmiştir (31).

Alkolmetrenin portatif olmasından kaynaklanan bazı kullanım kolaylıkları olmasının yanı sıra; sürüşü etkileyen alkol haricinde bir madde varsa o maddenin bulunamaması, aynı sonucun daha sonra tekrar edilemez olması, gaz spektrometresine göre daha az spesifik olması, alkometrenin nemden, kirden, sigara dumanından etkilenebilmesi ve eğer alkol alan kişi kusmuşsa, ağzında kan varsa, ya da alkol almayıp ağzını sadece alkolle çalkalamışsa bile normalden daha yüksek bir değerde solunum havasında alkol tespit edilebilmesi gibi bir takım kısıtlılıklarının olduğu bilinmektedir. (32)

Kandan Alkol Tespiti

Solunum havası dışında, kan ya da diğer vücut sıvılarında alkol düzeyi ölçümüne; alkolmetre bulunmadığında, bilinç kaybı, koma gibi zorunlu durumlarda ya da solunum alkol düzeyine itiraz edilmesi durumunda veya bilimsel araştırmalarda başvurulmaktadır. Kandan yapılan ölçümlerin en güvenilir ölçümler olduğu bilinmektedir.

Vücut sıvılarından yapılacak analizlerde; numunelerin temini, muhafazası, analiz yapılacak laboratuara ulaştırılması büyük önem taşımaktadır. Kan örneklerinin periferik venlerden alınmasına dikkat edilmelidir (33). Alınan örneklerle, özellikle hemen çalışılmayacaksa, alkol kaybını önlemek amacıyla NaF veya NaN₃ ilave edilmeli ve analiz aşamasına değin +4 C° de saklanmalıdır. Bu şekilde saklanan kan örneklerinde alkol değerinin en az 2 hafta değişmeden kaldığı bildirilmektedir (34).

b) Postmortem Alkol Düzeyi Tespiti

Postmortem alkol analizinde kan, idrar, göz içi sıvısı başta olmak üzere diğer dokular ya da vücut sıvıları çalışılabilmektedir. Yapılan çalışmalarda postmortem

dönemde alınan örneklerde %20–50 dolaylarında alkol varlığının gösterildiği bildirilmektedir (35). Ancak, örneğin alındığı yer, postmortem kaçınıcı saatte alındığı, nasıl saklandığı ve laboratuara nakledildiği gibi bir takım faktörlerin bu oranı değiştirebileceği ifade edilmektedir (36).

Kan ve idrar örneklerine nispetle daha korunaklı bir yerde olması nedeniyle daha az kontaminasyon riski taşıyan göz içi sıvısı alkol tayininde önemli bir vücut sıvısıdır. Skleradan göz içine girilerek örnek alınır. Ayrıca ölümden sonra bekleyen cesetler için uygun bir yöntemdir (37, 38).

2.7. Alkol Analizinde Yanıltıcı Durumlar

Alkol analizinde dikkat edilmesi gereken şeylerin başında, sadece bazı durumlarda ve kısa süreli de olsa, yalancı pozitiflik gelmektedir. Bununla birlikte, bazı yaygın kanaatlerin de bilimsel temelini olmadığı ispatlanmıştır. Yapılan çalışmalarda her ne kadar, deodorant, sprey ya da kolonya kullanımının sonuçları yanılttığına dair yaygın bir kanaat bulunsa da; deodorant ve spreylerin cihazları en çok 30-60 saniye ve düşük oranlarda etkilediği, yüze kolonya sürülmesiyle 1-2 dakika içinde cihazın 0,2-0,3 promil alkol gösterdiği ve 3-4 dakika içinde etkisinin kaybolduğu tespit edilmiştir. Hatta ağız %70’lik alkolle çalkalansa bile, cihazın 15 dakika sonra sıfırlandığı gösterilmiştir. Bu nedenle, bu tür durumlarda bir süre beklenerek tekrar ölçüm yapılması önerilmektedir. Bununla birlikte formaldehit’in de kolonya gibi kullanılması durumunda cihazda kısa süreli de olsa yüksek rakamlar görülmesine neden olduğu belirlenmiştir (39, 40).

Postmortem alkol analizleri için kanın periferik venlerden ve bilhassa femoral venden alınması tavsiye edilmektedir. Çünkü kalp gibi mideye yakın bir bölgeden kan alınması durumunda, kişinin ölmeden önce almış olduğu ve o sırada midede bulunan

alkolün etraf dokuyu etkileyebileceği bilinmektedir (18). Periferik venlerden alkol alınmadığı durumlarda; kafa ya da boyun venlerinden yararlanılabilir. Mecbur kalındığında ise göğüs ve karın boşluğundan ya da diğer damarlardan kan alınabilir, ancak bakteriyal kontaminasyon riski mutlaka hatırdan tutulmalıdır.

Bakteriyal kontaminasyonun alkol analizini yanılttığı üzerinde önemle durulmaktadır. Özellikle çürümeye başlamış cesetlerde mikroorganizmalar kana karışır ve glikoz başta olmak üzere çok daha az oranlarda laktat, gliserol ve aminoasitleri yıkarak etanol oluştururlar. Anaerob ve aerob bakterilerin, candida, nocardia, alternaria gibi mantar türlerinin bu şekilde alkol ürettiği gösterilmiştir (18). Bu nedenle, postmortem dönemde kontaminasyonun yol açtığı yalancı pozitif alkolü dışlayabilmek amacıyla, alkol minor metabolitlerinin tespiti gereklilik arz etmektedir (41).

2.8. Alkol Analizinde Kullanılan Bazı Yöntemler

Kütle spektrometreleri, serbest iyonların manyetik ya da elektriksel bir alandan geçerken diğer yüklü partiküllerden kütle/yük oranlarına göre ayrılmaları prensibiyle çalışmaktadır (42).

Kütle spektrumu sayesinde kimyasal yapı hakkında önemli bilgilere ulaşılabilmektedir. Bu açıdan spektral veriler infrared ve NMR spektrallardan daha kolay tanımlanabilmektedir; çünkü bilgiler, bir örneğin, yapısal bileşiminin moleküler kütlesi cinsinden ifade edilir. Bunu dışında, kütle spektrası kompleks karışımların kantitatif analizlerinde de kullanılır. Burada, değişik kütlelerdeki iyon akımlarının konsantrasyonla olan ilişkisinden yararlanılır.

İyonizasyon işlemine sonucunda her bir iyonun kendine özgü moleküler kütlesi ve yükü oluşmaktadır. Bu iyonlar kütle/yük değerlerinin yoğunluğuna (intensite) karşı gösterildiği bir spektrum ile beraber tanımlanır. İyonların yoğunlukları detektöre ulaşan miktarlarına göre değişiklik göstermektedir. Her bileşiğin spektrumu kendine özgüdür. Herhangi bir ölçüm sonucunda elde edilen spektrum referans spektrumu ile mukayese edilerek tanımlanır (43, 44). Kütle spektrometreleri, numune girişi, iyon kaynağı, kütle ölçer ve data sistemi kısımlarından oluşmaktadır (44, 45).

a) Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)

GC-MS yüksek hassasiyetle, hızlı analiz yapabilmesi ve çok yönlü olması açısından çok iyi sonuçlar veren bir yöntemdir. Özellikle uyutucu-uyarıcı madde, çevresel atık ya da bilinmeyen örneklerin analizinde adli atıp açısından altın standart olarak kabul edilmektedir. Ayrıca, eser elementlerin tespitinde de kullanılabilir. Ayırıştırma işlemi kapiller kolonlar aracılığı ile yapılarak, kütle spektrometresinde tanımlanır (18).

b) Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS)

Uçucu olmayan ve ısıya duyarlı bileşiklerin ayrıştırılması için kullanılan bir sıvı kromatografisidir. Gaz kromatografisine çalışma yöntemi olarak benzetmekle birlikte, taşıyıcı faz olarak sıvı kullanılmaktadır. Analiz sırasında ayrıştırılan maddenin bozulmadan son derece saf olarak elde edilmesi ve yüksek ısı gerekmemesi en büyük avantajdır. Bu nedenle, özellikle nükleik asitlerin, proteinlerin, peptidlerin ve aminoasitlerin analizi ya da farmakokinetik çalışmalar gibi bioanalizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır (46).

c) Sıvı Kromatografi–Kütle/Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)

LC-MS ile çok hızlı bir sürede bileşimin molekül ağırlığı belirlenebilmektedir. MS/MS ise kantitatif uygulamalar için yüksek bir duyarlılık ve kesinlik sağlamaktadır. Bu analiz sayesinde numune içerisinde bulunan bileşenlerin miktarı, moleküler yapısı ve molekül ağırlığı hakkında bilgi edinmek mümkün olabilmektedir. Küçük farmosötik bileşiklerden büyük proteinlerin tayinine kadar, polar iyonik, termal kararsız ve uçucu olmayan bileşiklerin analizleri gibi çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. Farmosötik, gıda ve çevre analizlerinde oldukça yüksek performans ile çalışabilmektedir.

d) Headspace Gaz Kromatografisi (HSGC)

Uçucu organik bileşiklerin konsantrasyonlarını belirlemede kullanılan bir kromatografi tekniğidir. Görece daha kolay kullanımlı ve tuzaklama analizine benzer özellikler taşımaktadır. Özellikle kanda alkol ya da çözünür maddelerin analizinde ve farmasötik araştırmalarda tercih edilmektedir. Endüstriyel incelemeler amacıyla da gıda, plastik polimerlerin yapısındaki monomerler ya da kozmetik ürünlerin analizinde kullanıldığı bilinmektedir.

2.9. Alkol Alımının Tespitinde Kullanılan Belirteçler

Alkol tespitinde kullanılan belirteçleri kronik ve yoğun alkol alımını gösterenler ile akut alkol alımını gösterenler olmak üzere iki başlık altında incelemek mümkündür (Tablo 4).

Tablo 4: Alkol Alımının Tespitinde Kullanılan Belirteçler

Akut Dönemde	Kronik Dönemde / Yoğun Alkol Alımında
Etil Glukuronid (EtG)	Gama Glutamil Transferaz (GGT)
Etil sülfat (EtS)	Ortalama Korpuskuler Hacim (Mean Corpuscular Volume) (MCV)
Yağ asit etil esterleri (YAEE)	Karbonhidrattan yoksun transferin (Carbohydrate-deficient transferin) (CDT)
5-Hidroksitriptofol (5-HTOL)	Dolikol
Fosfatidiletanol (PEth)	Hyaluronik asit (HA)

a) Akut Dönemde Kullanılan Belirteçler

Akut dönemde; etil glukuronid, etil sülfat, yağ asit etil esterleri, 5-hidroksitriptofal, fosfatidiletanol kullanılmaktadır.

Etil Glukuronid ve Etil sülfat

EtG ve EtS etanolün non-oksidatif minör metabolitlerindendir (47). Etil alkolün epey az bir kısmı non oksidatif metabolizmaya uğrayarak minör metabolitlerine dönüşür; bu oran EtG için %0,6-1,5 iken, EtS içinse %0,010-0,016 civarındadır (48, 49). Etil alkolün glukuronidasyon yoluyla metabolizasyonu ilk defa 1901 yılında Neubauer tarafından gösterilmiş ve EtG analizi ise 1952 yılında Kamil

ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir. EtS ise 1959 yılında Vestermark ve Boström tarafından sıçan karaciğerinde tespit edilmiştir (24, 50).

EtG, UDP-glukuronosiltransferaz enziminin etanole bir glukuronik asit eklemesi sayesinde sentezlenmektedir. Moleküler ağırlığı 222,193 g/mol olan EtG'nin kimyasal formülü $C_8H_{14}O_7$ olarak gösterilmektedir. EtS ise sülfotransferaz enziminin etanole sülfat grubu eklemesiyle oluşur. Kimyasal formülü $C_2H_6O_4S$ ve moleküler ağırlığı 126,13 g/mol'dür.

EtG'nin alkol alımının muhtemel bir göstergesi olduğu ilk kez Schmitt ve ark. tarafından gösterilmiştir (51). EtG ve EtS, kanda ve özellikle de idrarda alkol alımından sonra etanole nispetle daha uzun süre tespit edilebilir düzeyde bulunmaları sayesinde alkol bağımlılarının tedavisinin takibinde, sporcular, cerrahlar, şoförler, pilotlar gibi alkol alımının önemli sonuçlar doğuracağı meslek gruplarında yapılan alkol taramalarında kullanılabilir. Bunun dışında, postmortem dönemde tespit edilen alkol varlığının, antemortem dönemde alınan alkolden mi kaynaklandığını ya da bakteriyel kontaminasyonun sonucu mu oluştuğunu ortaya koymak açısından faydalıdır (36, 52). Wurst ve ark. yürüttüğü bir çalışmada EtG'nin alkolizm tedavisinde belirli aralıklarla yapılan alkol taramalarında rahatlıkla kullanılabileceğine işaret edilmiştir (10).

EtG'nin alkol alımından 30-45 dakika sonra kanda, 1 saat sonra ise idrarda gösterilebilir seviyeye, kanda 2-3 saat sonra ise maksimum düzeyine ulaştığı bilinmektedir (48, 53). Orta derecede bir alkol alımından sonra yaklaşık 36 saat sonra bile hala idrarda gösterilebilir düzeyde kalabilen EtS'nin 1-2 saat civarında kanda maksimum düzeyine ulaştığı gösterilmiştir (47).

Literatürde hem EtG ve hem de EtS ile ilgili çeşitli çalışmaların yapıldığı görülmektedir. On sağlıklı gönüllü ile yapılan bir çalışmada, bir süre alkol perhizinde tutulan katılımcılara 0,5 g/kg alkol verilmiş ve daha sonra belirli aralıklarla alınan kan ve idrar örneklerinde etanol ve EtG düzeylerini ölçülmüştür. Etanol 3-4 saat sonra kanda tespit edilemez düzeylere indiği halde, EtG'nin kanda 16 saat, idrarda ise 35 saat boyunca hala tespit edilebilir düzeyde olduğu gösterilmiştir (53).

Bu metabolitler hakkında postmortem çalışmalar da yapılmış ve otopsi vakalarından elde edilmiş kan ve idrar numunelerinden yapılan ölçümler sonucunda EtG'nin postmortem dönemde de kullanılabileceği belirtilmiştir (54).

Kronik alkol kullanımına bağlı olarak EtG'nin yüksek değerlerde tespit edilebileceği gösterilmiştir (53). Ayrıca ölümünden 27 yıl sonra bir cesetten alınan saçta; bunun dışında, hatta diğer vücut kıllarında da EtG varlığı tespit edilmiştir (56, 57).

EtG'nin diğer çalışmalarda alkol alımının uzun dönem takibinde yağ asit etil esterleri (YAEE) ile EtG'nin beraber kullanılabileceği bildirilmiştir (58). Pichini ve ark. mekonyumda alkol minör metabolitlerini gösterdikleri çalışmalarında mekonyumda EtG göstermeyi başarmışlar ve hamilelerin alkol takibinde YAEE ile beraber EtG'nin çalışılmasını önermişlerdir (59).

EtG'nin yalancı pozitif ve yalancı negatifliğini gösteren çalışmalar da yapılmış ve beta-glukorinidaz enzim aktivitesi olan *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides vulgatus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii*, *Escherichia coli* gibi bakterilerin EtG degradasyonu nedeniyle yalancı negatiflik oluşturabileceği ortaya konmuştur (60). Bir diğer çalışmada ise chloral hydrate kullanımının yalancı pozitiflik oluşturduğu belirlenmiştir (61).

EtG'nin yanlış pozitif ya da negatif olabilmesi nedeniyle tek başına EtG ölçümlerinde dikkat edilmesi gerektiği bildirilmektedir. Bu nedenle, araştırmalarda EtS ölçümlerinde yalancı pozitif ya da negatif sonuçların gözlenmeyeceği, EtG ölçümlerinin EtS ile desteklenmesi gerektiği belirtilmektedir (62).

Yağ asit etil esterleri (YAEE)

Yağ asit etil esterleri etanolün nonoksitatif metabolizasyon ürünlerinden biridir. YAEE, pankreas ve karaciğerde, endojen yağ asitlerinin alkol ile esterleşmesi sonucunda oluşmaktadır. Bu reaksiyonlarda YAEE sentaz ve açıl-Koa/etanol O transferaz olmak üzere iki değişik enzimatik aktivite rol almaktadır. YAEE'ler, lipoprotein ve albumine bağlı olarak kanda taşınarak yağ dokuya iletilmektedir (63-66). YAEE'lerin etanol bağımlı hücre hasarında mediatör olduğu düşünülmüş ve kan, yağ dokusu, saç, sebum ve mekonyum gibi pek çok biyolojik örnekte tespit edilmiştir (67-69).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda YAEE'nin mekonyumda tespit edilmesinin, gebelik süresince alkol alımının önemli bir işareti sayılabileceği vurgulanmaktadır (70-72).

5-Hidroksitriptofol (5-HTOL)

Vücutta esansiyel bir aminoasit olan triptofandan oluşan serotonin (5-HT), oksidatif deaminasyon ile 5-hidroksiindolasetaldehite (5-HIAL), daha sonra aldehit dehidrogenaz (ALDH) enzimi ile 5-hidroksiindolasetikasite (5-HIAA) veya alkol redüktaz ve alkol dehidrogenaz enzimleri ile 5-hidroksitriptofola (5-HTOL) dönüşmektedir. 5-HTOL ise glukronik asit veya sülfatla konjuge edilerek idrara geçer. Alkol alımından sonra etanolün oluşturduğu yüksek asetaldehit düzeyi veya

artmış NADH oranı nedeniyle, ALDH enzimi kompetitif olarak inhibe olur ve sonuç olarak idrarda 5-HTOL artar. 5-HTOL'un kreatinin veya 5-hidroksi-3-asetik asite (5-HIAA) oranına bakılarak bu oran alkol alımının gösterilmesinde kullanılabilir (73, 74). Ancak, normal şartlarda 5-HTOL'un idrardaki 35ng/mL olan düzeyi, yüksek doz alkol alımıyla birlikte 90-2500 ng/mL seviyelerine kadar yükselebilmektedir. Yüksek oranda 5-HT içeren gıdaların tüketimi nedeniyle yalancı pozitif sonucu dışlamak amacıyla 5-HIAA ile oranına bakılması önerilmektedir (73).

5-HTOL'un seviyesinin idrarda 20 saate kadar yüksek kaldığı gösterilmiş ve yakın dönemde alkol alımının gösterilmesinde etkili bir belirteç olabileceği düşünülmüştür (75).

Fosfatidiletanol (PEth)

Fosfotidil etanol (PEth), etanol varlığında fosfotidilkolinin fosfolipaz D enzimi ile hücre membranında oluşan bir tür fosfolipiddir. Özellikle yoğun miktarda ve uzun süreli kullanım durumlarında tüm hücrel fosfolipid havuzunun yaklaşık %1-2'e varan oranlarında PEth sentezinin gerçekleştiği bildirilmektedir. PEth kan hücreleri yanı sıra beyin ve karaciğer gibi pek çok dokuda tespit edilebilmektedir (76).

Yapılan çalışmalarda PEth yüklü eritrositlerin yarılanma sürelerinin yaklaşık 4 gün olduğu, dolayısıyla PEth'in yarılanma süresinin 7 gün olduğu bildirilmektedir (77, 78). Kronik alkol kullananlarda yapılan bir çalışmada PEth 14. günde kanda gösterilmiştir (79). Bununla birlikte, literatürde yüksek miktarda da olsa tek bir sefer alkol tüketiminin tespiti için yeterli olmadığı nakledilmekte ve günlük en az ortalama 50 g olacak şekilde toplamda 1000 g alkol alımı sonrasında ancak tespit edilebilir düzeye ulaşabileceği ifade edilmektedir (80).

b) Kronik ve Yoğun Alkol Alımını Gösteren Belirteçler

Kronik alkol alımının tespitinde; gama-glutamil transferaz, ortalama korpuskuler hacim, carbonhydrate- deficient transferrin, dolikol ve hyaluronik asit kullanılmaktadır.

Gama-Glutamil Transferaz (GGT)

Gama-glutamil transferaz, hücre membranında yer alarak glutatyonun gama-glutamil kısmını transfer eden glikoprotein yapıda bir enzimdir. Kronik alkol alımı sonucunda oluşan hücresel hasara bağlı olarak yükseldiği bilinen bu enzim, kronik ve yoğun alkol kullanımını göstermede önemli bir belirteçtir (81-83).

Gama-glutamil transferaz seviyesindeki artışın etanol alımıyla artış gösterdiği ve AST gibi diğer enzimlere oranla daha yüksek sensitiviteye sahip olduğu anlaşılmış olmasına rağmen, enzimin alkol alımı dışında da yükselebildiği bildirilmektedir (84). Özellikle karaciğer hasarına yol açtığı bilinen obezite başta olmak üzere bazı metabolik bozukluklar GGT düzeyinde artışa neden olmaktadır (85-87). Ayrıca, literatürde GGT'nin oksidatif stresi belirlemede de kullanılabileceği yönünde çalışmalar mevcuttur (88).

Gama-glutamil transferaz seviyesinin yaşla birlikte arttığını gösteren çalışmalar da yapılmıştır (89). Bu konudaki araştırmalar sonucunda; GGT sensitivitesinin 30 yaşından küçük genç erişkinlerde düşük olduğu, orta yaşlı erkeklerde 110 U/l serum GGT düzeyinin normal olarak değerlendirilmesi gerektiği bildirilmiştir (90, 91).

Ortalama Korpuskuler Hacim - Mean Corpuscular Volume (MCV)

Kronik alkol alanlarda, etanolün ara metaboliti olan asetaldehitin eritrosit hacmini arttırıcı şekilde patojenik bir etki oluşturduğu bilinmektedir (92). Bu etkinin doğrudan alkolün etkisiyle ya da alkol alımına bağlı gelişen folik asit eksikliği veya karaciğer hasarı nedeniyle olduğu yönünde görüşler mevcuttur. Yalnızca tarama testi olarak kullanılması önerilen bu test ile eritrosit hacminde meydana gelen bu patojenitenin ortaya konması amaçlanmaktadır.

Alkolün etkisi gösterilmiş olmakla birlikte, alkole bağlı olmayan pek çok durumda (karaciğer hastalıkları, hemoliz, demir eksikliği, talasemiler, folik asit eksikliği, B12 eksikliği, hipotiroidizm, retikulositoz, antikonvulsanlar, yaşlılık ve sigara kullanımı gibi) MCV'nin artabileceği hatırd tutulmalıdır. Bu nedenle, MCV artışının diğer testlerle birlikte destekleyici bir bulgu olarak düşünülmesi gerekmektedir. Alkol kullanımı sonucu oluşan artmış MCV düzeyi alkol alımının kesilmesinin ardından 2-4 ay içinde normal sınırlara inebilmekte, böylece alkol dışı nedenlerle herhangi bir yükselme saptanmışsa bu şekilde bir ayırım yapılabilmektedir (93, 94).

Kolay uygulanabilir olması nedeniyle yaygın olarak kullanılan MCV'nin sensitivitesi GGT ve CDT'den daha düşük, spesifitesi ise GGT'den daha yüksektir. (95, 96).

Karbonhidrattan Yoksun Transferin – Carbohydrate Deficient Transferin (CDT)

Karaciğerde sentezlenip demirin taşınmasından sorumlu olan transferrin, yoğun ve kronik alkol kullananlarda enzimdeki karbonhidrat içeriğinin düşmesine bağlı olarak 'karbonhidrattan yoksun transferrin' adını almaktadır (97). Bu etkinin nasıl

ortaya çıktığı net olarak bilinmemekle beraber, görüşler iki olasılık üzerinde yoğunlaşmaktadır. Buana göre, ya alkol ve metabolitleri transferrine karbonhidrat ekleyen enzimin (glikotransferaz) aktivitesini azaltmaktadır ya da karbonhidrat birikimini önleyen enzimin (sialidaz) aktivitesini arttırmaktadır (98).

CDT'nin yarılanma ömrü yaklaşık olarak 15 gündür ve protein seviyesindeki artışın sosyal içicilere göre alkol bağımlılarında daha fazla olduğu saptanmıştır (99, 100). Ancak CDT'nin MCV ya da GGT'ye üstünlüğünün olmadığı bildirilmiştir (101).

Dolikol

Dolikoller, glikoprotein sentezinde glikozil taşıyan çok uzun zincirli izoprenlerdir. Moleküler ağırlığı 1382,37 g/mol, kimyasal formülü ise $C_{100}H_{164}O$ 'dur. İlk kez 1960'larda keşfedilen dolikol fosfatın, bugün bazı patolojilerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Beyinde substantia nigra da bulunduğu bilinmekte ve Alzheimer Hastalığı'nda ya da yaşlanma gibi fizyolojik süreçlerde biomarker olarak kullanılabileceği yönünde araştırmalar sürdürülmektedir. Bununla birlikte, kronik alkol kullanımının idrarda ve kanda dolikol seviyesini artırdığı gösterilmiştir (75).

Hyaluronik asit (HA)

Serum hyaluronik asit seviyesinin alkol alımıyla arttığı gösterilmişse de, alkol dışında birçok karaciğer hastalığı ile de arttığı bilinmektedir. Bu nedenle spesifitesi çok yüksek değildir. Alkol alımının kesilmesiyle seviyesinde azalma olduğu bildirilmektedir (102).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından değerlendirilmiş, 22.01.2013 tarih ve 2013/1-1 sayılı kararı ile desteklenmesi kabul edilmiştir. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulları'nın 20.12.2012 tarih, 07-07 nolu kararı ile tıbbi etik açıdan uygun bulunmuştur.

3.1. Çalışma Protokolü

Çalışmaya; kronik ya da akut rahatsızlığı olmayan, herhangi bir ilaç kullanmayan, psikiyatrik hastalığı veya gebelik durumu olmayan 17 sağlıklı gönüllü (yaş aralığı 19-52; 10 erkek ve 7 kadın; BMI 18-32,5 kg/m²) katıldı. Katılımcılardan çalışmadan önceki bir hafta süresince alkol tüketmemeleri istendi. Katılımcılara çalışma ayrıntılı olarak anlatıldı ve her birinin aydınlatılmış onamları alındı. Katılımcıların her birinden çalışmadan iki gün önce Hb, MCV, ALT, AST, GGT, BUN, Cr parametrelerinin değerlendirilmesi amacıyla kan alındı. Hiçbirinde anormal bir sonuca rastlanmadı.

Çalışma sabahı aç gelmeleri istenen ve daha önce onamları alınmış olan katılımcılara yapılacak işlemler ayrıntılı olarak tekrar anlatıldı. Daha sonra kan alımı için antekübital bölgeden intravenöz kateter takılarak ilk kan ve idrar örnekleri toplandı. Ardından, 5 dakikalık sürede her birinden 0,5 g/kg düzeyinde alkol (%40 votka) tüketmeleri istendi.

Kan örnekleri alkol alımından sonra 0,5-1-1,5-2-2,5-3-3,5-4-5-6-7-8 ve 10. saatlerde kateter yardımıyla EDTA'lı tüplere 2 ml olacak şekilde alındı. 10. saat kanı alındıktan sonra, katılımcılar çalışma alanından ayrılacakları için damar yolları çıkarıldı. Ertesi sabah her katılımcıdan 24. saat kan örneği alındı.

İdrar örnekleri ise, alkol alımından sonra 2-4-6-8-10-24 ve 48. saatlerde idrar kaplarına toplandı.

Çalışma sabahı alkol alımından sonraki 2. ve 7. saatlerde ekmek, peynir, salam ve alkolsüz içecekten oluşan menü ile yemek verildi. Katılımcılar, çalışma alanını terk ettikten sonra da çalışma süresi boyunca alkol ve sigara tüketmediler. Ayrıca, rutin diyetleri haricinde bir şey yeyip içmemeleri sağlandı.

Kan ve idrar örnekleri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ de analiz anına kadar saklandı. Analizler Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarında LC-MS/MS cihazı ile yapıldı.

3.2. Analitik Metot

a) Kimyasallar

EtG, EtS ve döteryum etiketli standartları Lipomed (Weil am Rhein, Almanya) firmasından temin edilmiştir. Asetonitril ve metanol çözücüleri HPLC saflığındadır ve Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından alınmıştır. HPLC mobil fazının hazırlanmasında kullanılan formik asit (%98) J.T. Baker (Floransa, İtalya) firmasından alınmıştır. Deiyonize su ise, Mili-Q (Millipore, Bedford, Amerika) su saflaştırma sisteminden temin edilmiştir.

b) Numune Hazırlanması

İdrar

1 ml idrar 12000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen idrar örneğinden 50 µl alınarak 10 µl internal standart eklenmiş ve %0.1 formik asit ile 1 mL’ye tamamlandıktan sonra vorteks ile karıştırılmıştır. Ardından 0.45 µm naylon filtreden geçirilerek vialle toplanmıştır. Internal standart 20 mg/l EtG-d5 ve 5 mg/L EtS-d5 içerecek şekilde suda hazırlanmıştır.

Kalibrasyon eğrisi EtG ve EtS için 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 ve 1 mg/L konsantrasyon aralığında suda hazırlanmıştır.

Kan

Kan örneğinden 200 µl alınarak üzerine 10 µl internal standart ve 790 mL asetonitril eklenmiş ve vorteks ile karıştırılmıştır. Ardından 12000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Berrak süpernetant 0.45 µm naylon filtreden geçirilerek vialle toplanmıştır. Internal standart 10 mg/L EtG-d5 ve 5 mg/L EtS-d5 içerecek şekilde suda hazırlanmıştır.

Kalibrasyon eğrisi EtG ve EtS için 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 ve 1 mg/L konsantrasyon aralığında asetonitrilde hazırlanmıştır.

c) Cihaz Koşulları

Kromatografik seperasyon

Acquity HSS C18 kolon (2.1x150 mm, 1.8µm)

Akis hizi 0.3 ml/dk @ 50°C

Izokratik akista 90% 0.05% fomik asit (suda), 10% asetonitril
Sample manager @ 10 °C

MS/MS

Kapiler voltaji: 3 V

Cone voltaji: 28 V

Extractor voltaji: 3 V

Source Temp: 130 °C

Desolvation Temp: 400 °C

Desolvation Gas Flow (N₂): 900 L/h

Collision gas flow (Ar): 0.2 ml/dk

d) Belirlenebilirlik Sınırı (LOD) ve Tayin Sınırı (LOQ)

Aranan analitin belirlenebildiği ancak kesin olarak hesaplanamadığı en düşük analit miktarı belirlenebilirlik sınırıdır. Genel bir yaklaşımla sinyal/gürültü oranının 3 olduğu konsantrasyon LOD olarak tanımlanır. Tayin sınırı ise numune içinde aranan analitin, uygun doğruluk ve kesinlik ile hesaplanabildiği en düşük analit miktarıdır. Sinyal/gürültü oranının 9 olduğu konsantrasyon LOQ olarak değerlendirilir. LOQ değerleri; kan EtG: 0,007 mg/L, idrar EtG: 0,032 mg/L ve kan EtS: 0,008 mg/L, idrar EtS: 0,040 mg/L olarak belirlenmiştir. LOD değerleri; kan EtG: 0,002 mg/L, idrar EtG: 0,010 mg/L ve kan EtS: 0,002 mg/L, idrar EtS: 0,012 mg/L olarak belirlenmiştir. Belirlenen konsantrasyonlarda katım yapılmış numunelerin analiz edilmesi ile bulunan değerler doğrulanmıştır.

e) İstatistik incelemeleri

Analizlerin değerlendirmesinde SPSS 15.0 programı kullanılmıştır. Her bir katılımcının kan ve idrardaki EtG ve EtS değerlerinin oluşturduğu eğriler incelenmiş, eğri altındaki alanları (areas under curve - AUC) bulunarak, Spearman'ın sıralama korelasyon katsayısı (Spearman'ın rho) hesaplanmıştır.

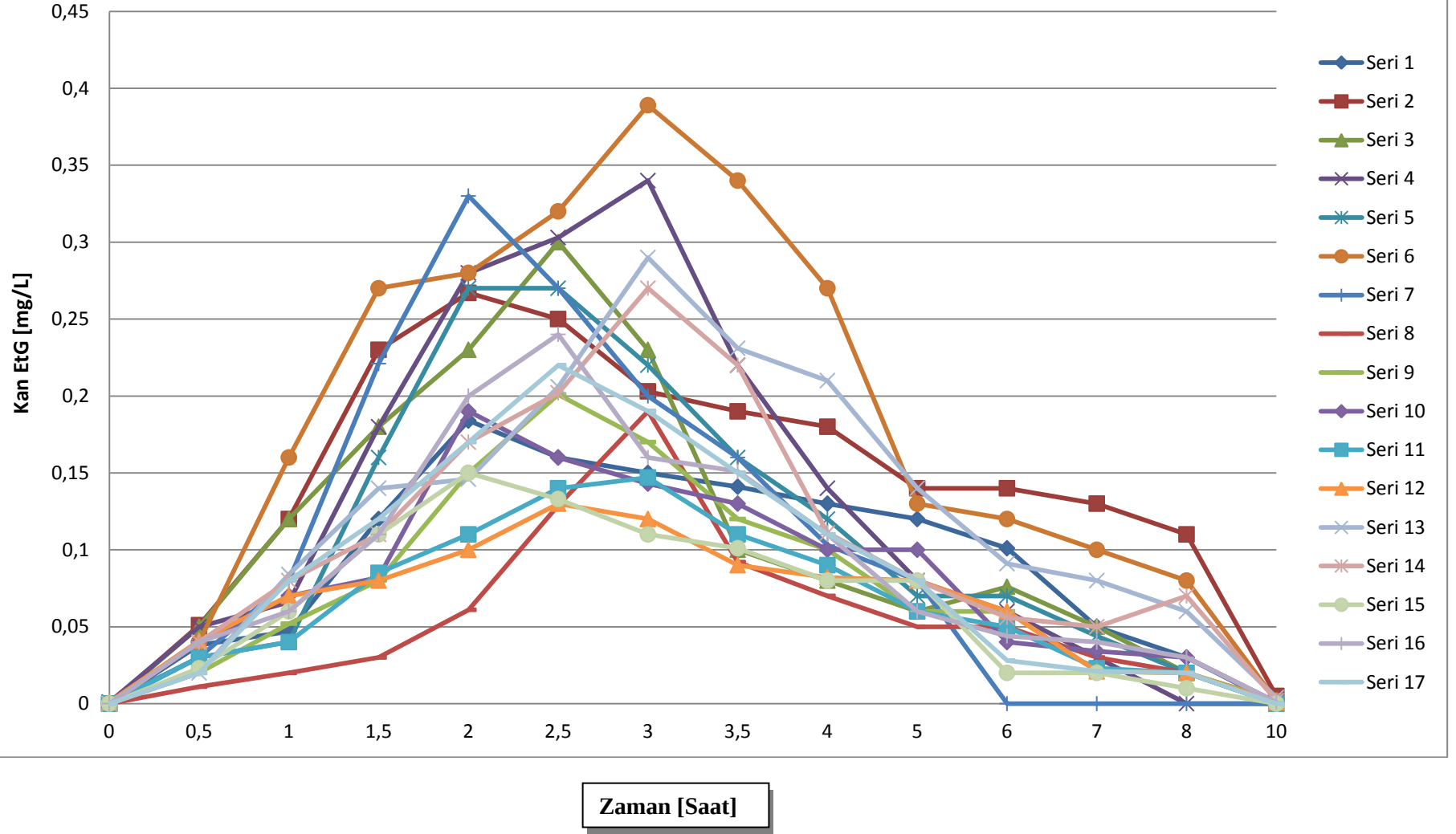
BULGULAR

Alkol alımından önce toplanan kan ve idrar örnekleri EtG ve EtS açısından negatif bulundu. Katılımcıların 0,5 g/kg düzeyinde alkol alımından sonra kan pik konsantrasyon değerleri EtG ve EtS için sırasıyla 0,13-0,389 mg/L (mean 0,240±0,075 mg/L SD) ve 0,211 – 0,5 mg/L (mean 0,334±0,091 mg/L SD) arasında tespit edildi (Grafik 1 ve 2). Alkol alımını takiben EtG kan pik konsantrasyon değerine 2-3 saat (mean 2,55±0,3 saat) sonra, EtS ise 2,5-4 saat (mean 3,14±0,3 saat) sonra ulaştı.

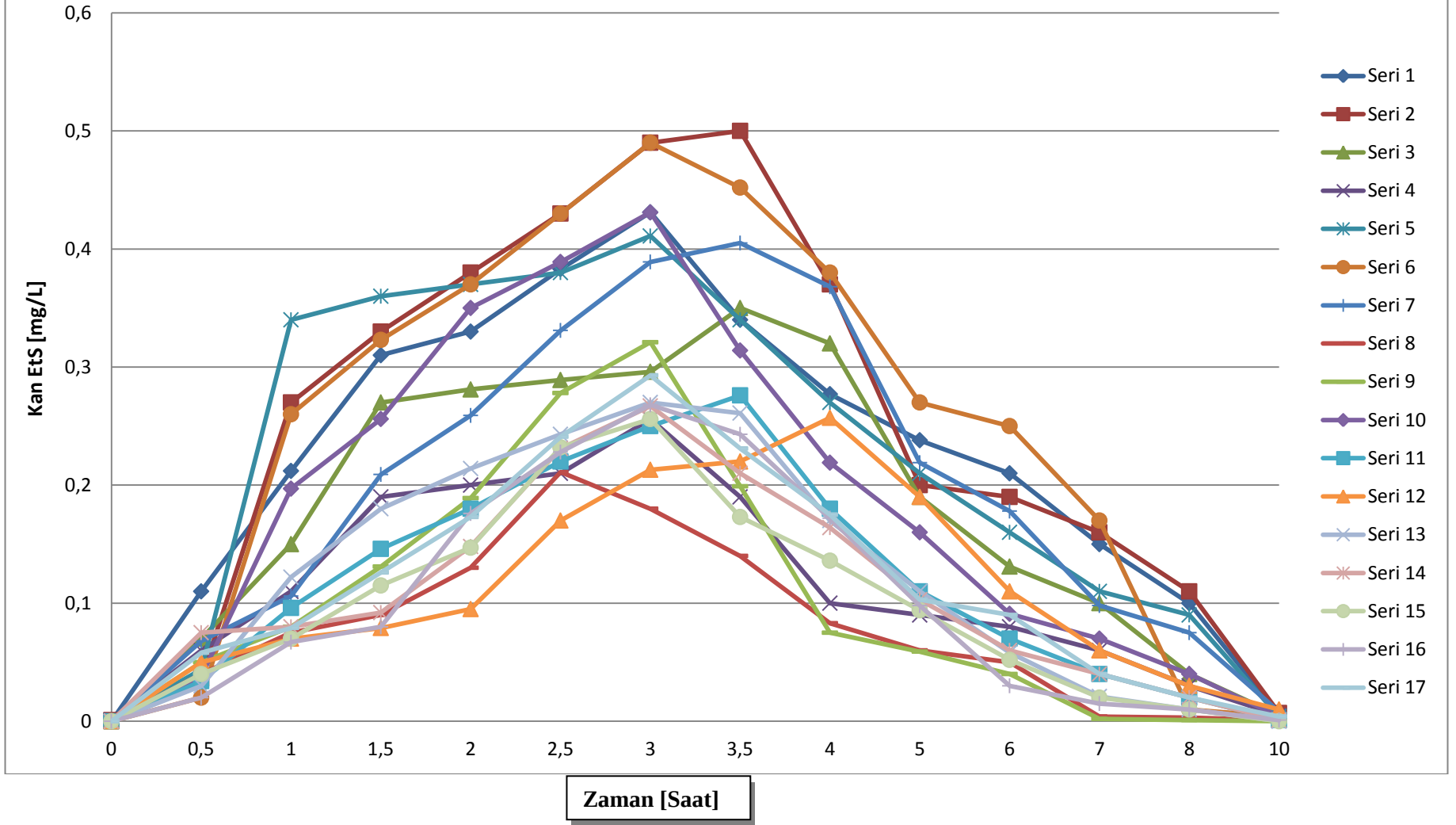
Kan EtS değerlerinin, kan EtG değerlerine oranla daha yüksek düzeylere ulaştığı görüldü. Alkol alımından 10 saat sonra hala 2 olguda kan EtG düzeyi LOD değerinin üzerinde bulunurken; aynı saatte bakılan kan örneğinde 9 olgunun EtS düzeyinin LOD değerinin üzerinde olduğu görüldü. Çalışmanın 24. saatinde ise hiçbir olgunun kanında EtG ve EtS tespit edilemedi.

Kan EtG ve EtS için eğri altındaki alanlar (areas under curve - AUC) hesaplandı. Spearman'ın rho testiyle yapılan korelasyon değerlendirmesinde kan EtG-AUC ve kan EtS-AUC değeri arasında orta düzeyde bir korelasyon olduğu görüldü ($\rho=0,588$).

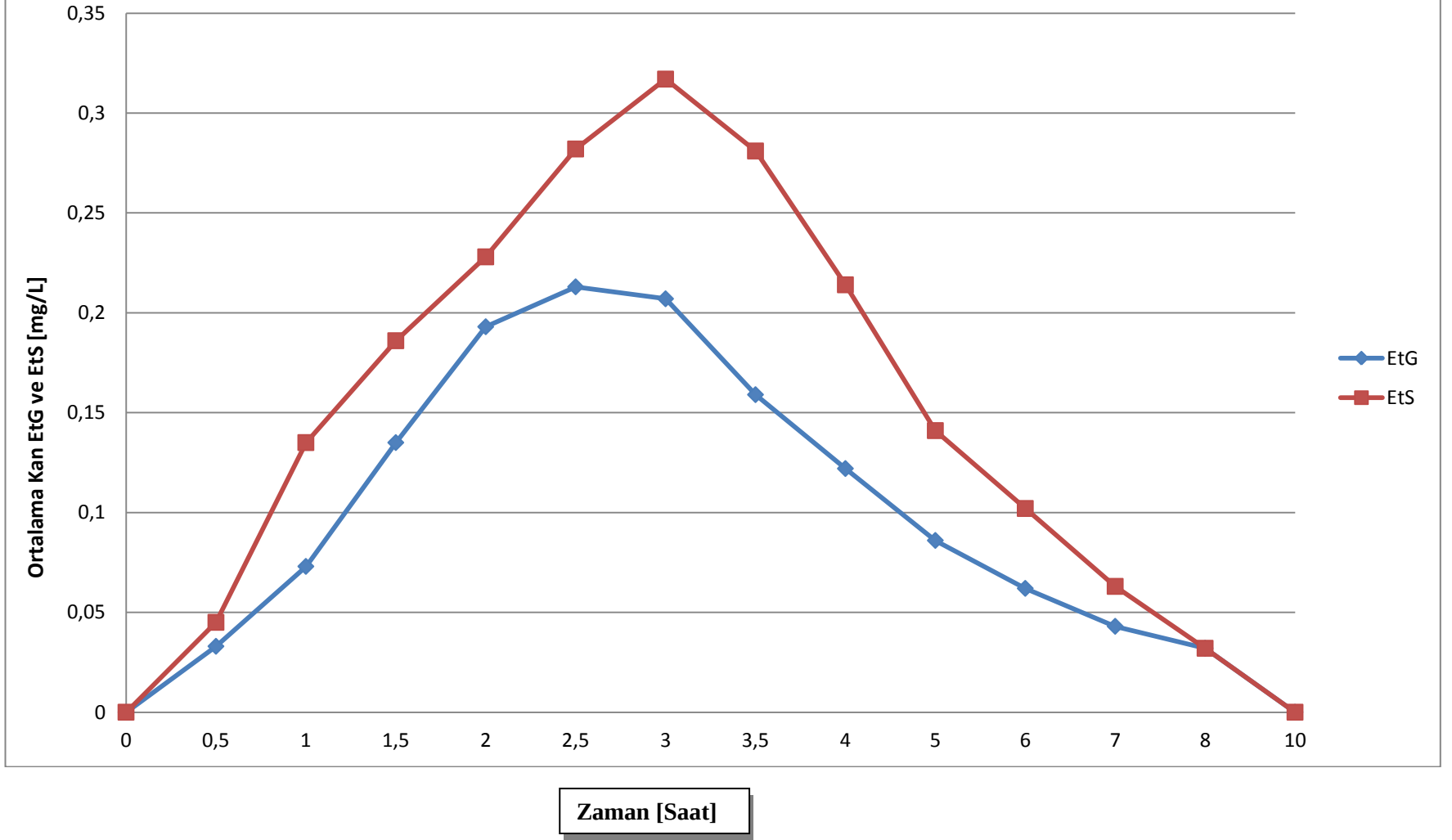
Grafik 1: Kan EtG Değerleri



Grafik 2: Kan EtS Değerleri



Grafik 3: Ortalama Kan EtG ve EtS Değerleri

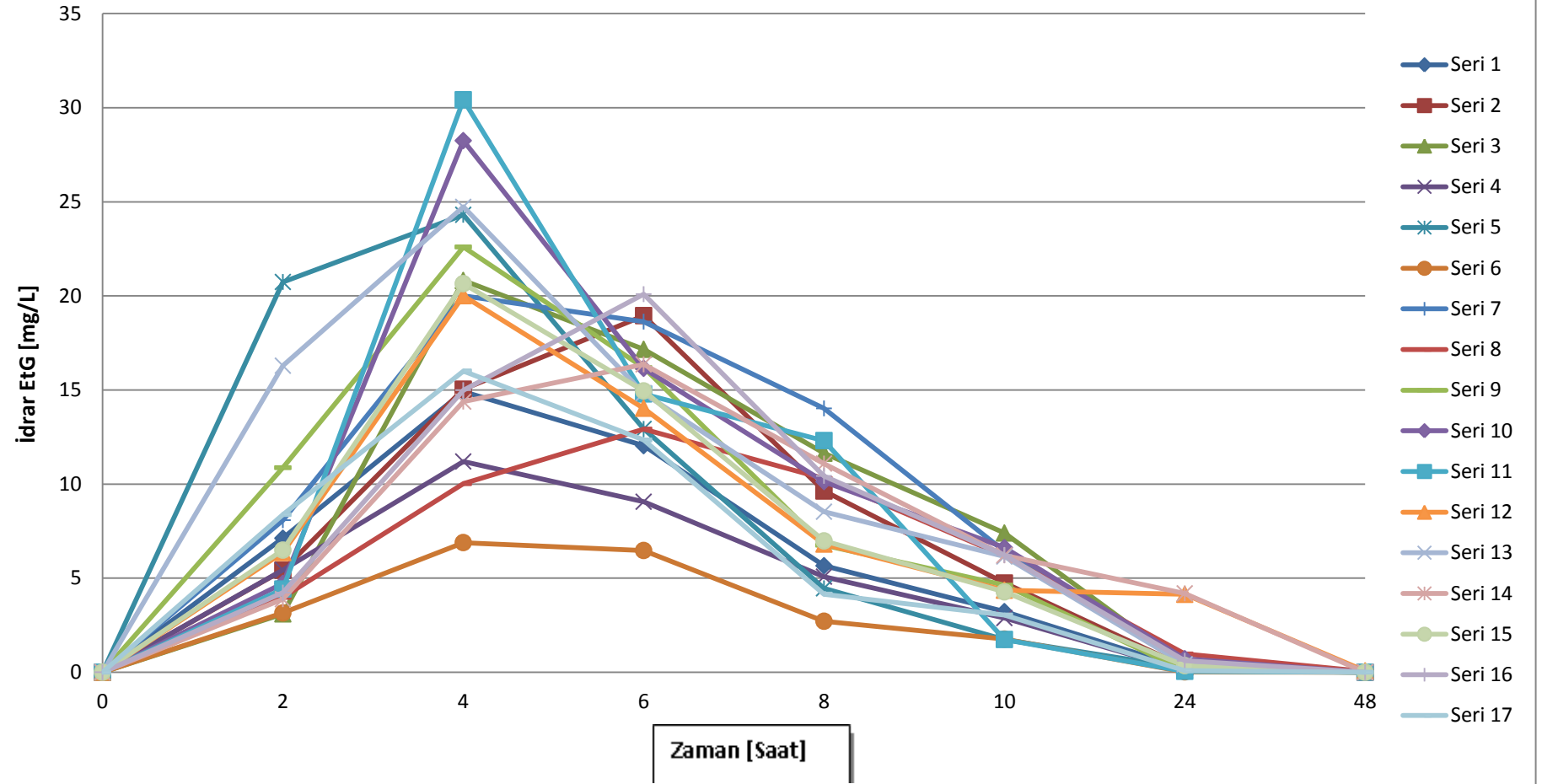


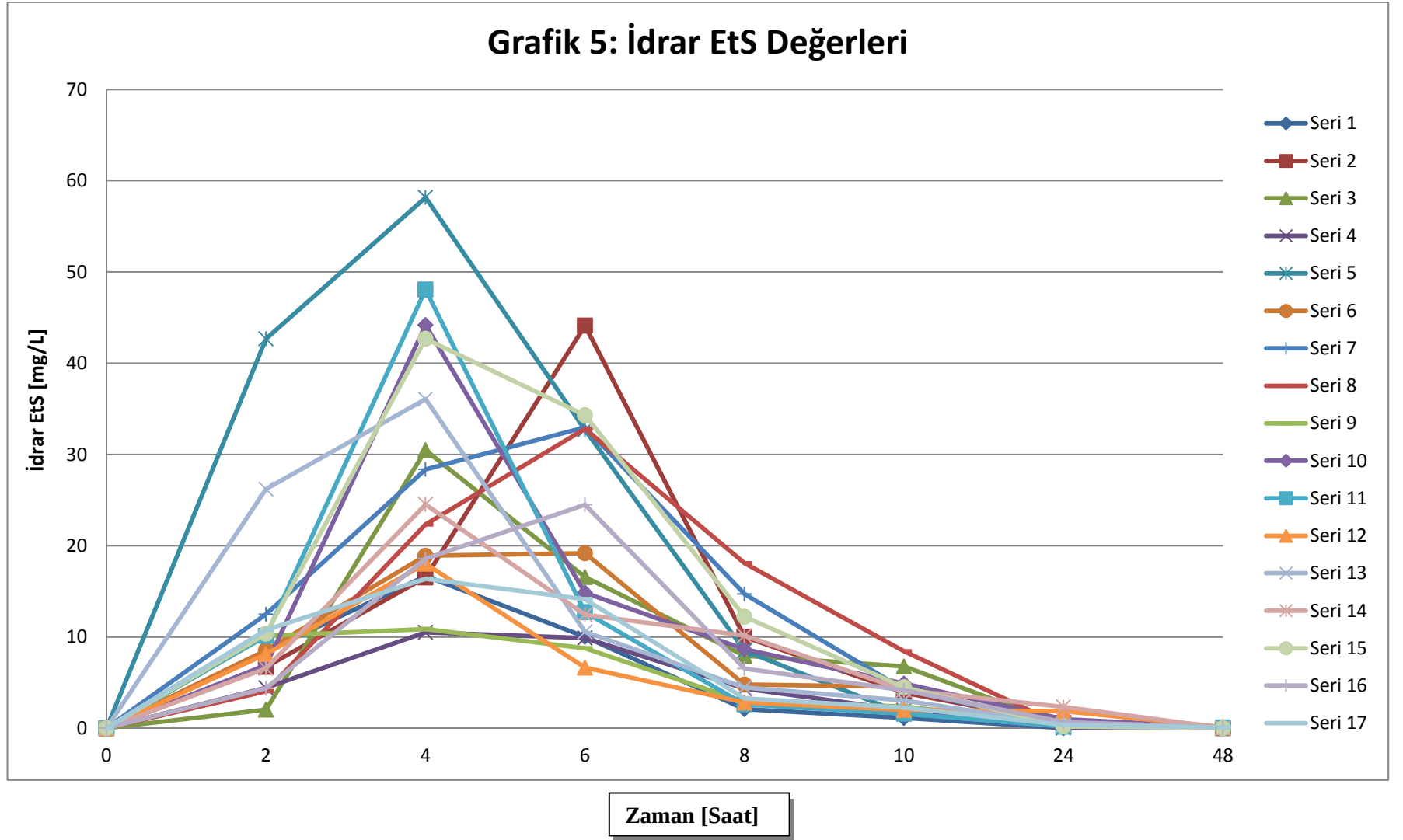
Katılımcıların 0,5 g/kg düzeyinde alkol alımından sonra idrar pik konsantrasyon değerleri EtG için 6,89-30,42 mg/L (mean 19,361±5,98 mg/L) ve EtS için 10,5-58,17 mg/L (mean 30,0±14,06 mg/L) olarak tespit edildi (Grafik 3 ve 4). Alkol alımını takiben EtG'nin idrar pik konsantrasyon değerine 4. ve 6. saatlerde (4,4±0,8 saat), EtS'nin ise 4. ve 6. (4,5±0,9 saat) saatlerde ulaştığı görüldü.

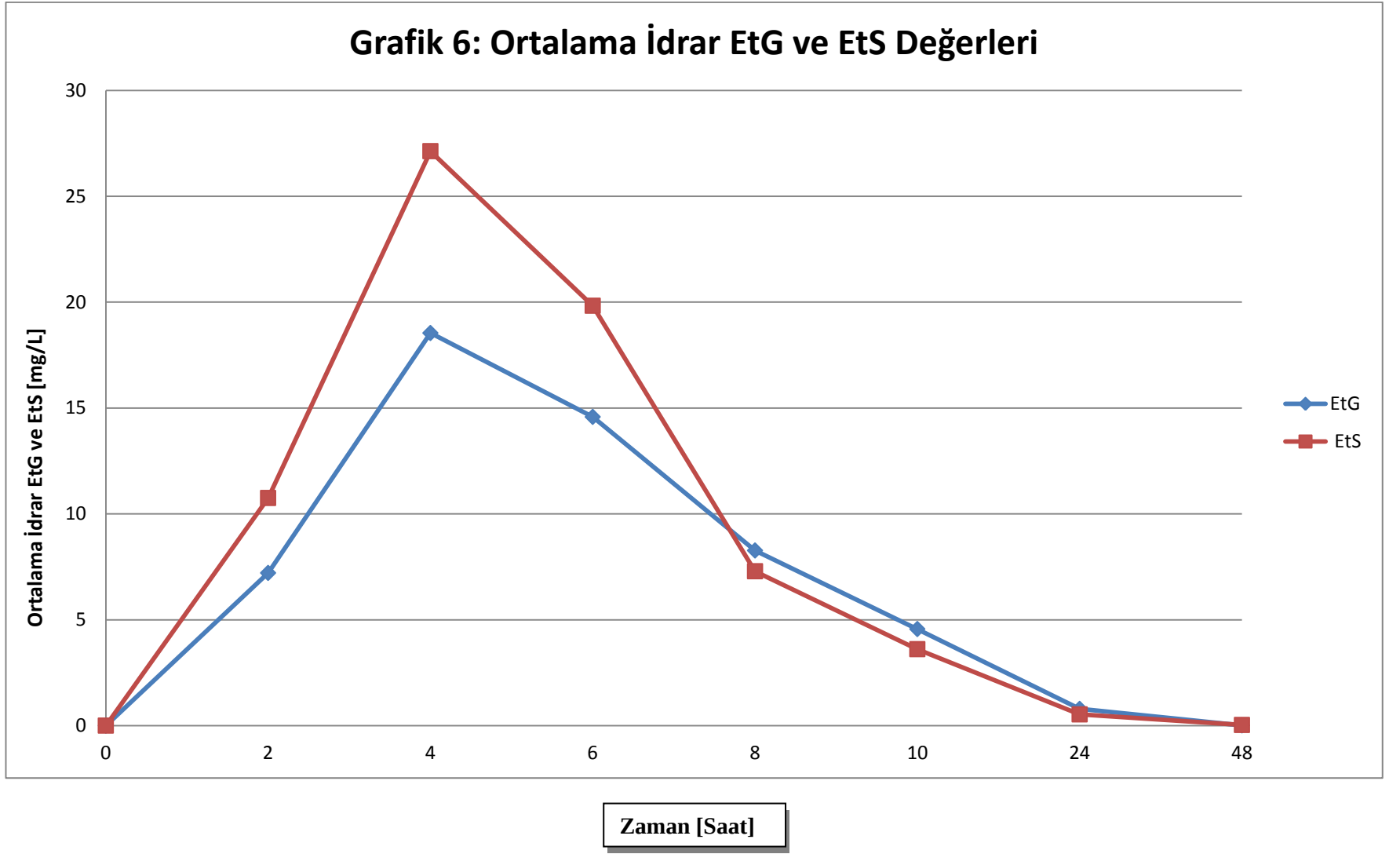
İdrar EtS değerlerinin EtG değerlerine oranla daha yüksek düzeylere ulaştığı görüldü. Alkol alımından 24 saat sonra hala tüm olgularda hem idrar EtG, hem de EtS düzeyleri LOD değerinin üzerinde bulunurken; 48. saatte yapılan ölçümlerde EtG ve EtS LOD değerinin altında saptandı.

İdrar EtG ve EtS için AUC değerleri hesaplandı. Ancak, idrar EtG ve EtS AUC değerleri arasında herhangi bir korelasyon gösterilemedi. Benzer şekilde, kan ve idrardaki EtG ve EtS AUC değerleri arasında da bir korelasyona rastlanmadı.

Grafik 4: İdrar EtG Değerleri







TARTIşMA

EtG, etanole UDP-glukuronosiltransferaz enziminin glukuronik asit eklemesiyle sentezlenen etanolün non-oksidatif minör metabolitlerinden biridir (103). İlk defa 1901 yılında Neubauer tarafından etil alkolün glukuronidasyonu ortaya konmuş ve sonrasında Kamil ve ark. EtG'yi analiz etmişlerdir (24). Benzer şekilde EtS de sülfotransferaz enzimi sayesinde etanole bir sülfat grubunun konjugasyonu sonucu oluşmaktadır (104). Araştırmalar vücuda alınan etanolün çok az bir kısmının (~% 0,1) bu meabolitlere dönüşerek idrarla atıldığını göstermektedir (105, 106). Bununla birlikte, bu minor metabolitler etanole nispetle gerek kanda ve gerekse de idrarda daha uzun süre kalabilme özelliğine sahip olduklarından, yakın dönemde alkol alımının tespitinde önemli avantajlar sağlamaktadır (107, 108). Hatta etanol negatif olsa bile, bu metabolitlerin tespit edilebiliyor olması alkol alımını doğrulamak için yeterli kabul edilmektedir (109). Bu nedenle EtS'ye oranla daha yaygın olarak bakılan EtG, başta alkol bağımlılarının tedavisinin takibinde olmak üzere, sporcular, cerrahlar, şoförler, pilotlar gibi alkol alımı yönünden ciddi ve sık olarak denetlenen meslek gruplarında klinik ve adli bir gösterge olarak kullanılmaktadır (41, 110).

Alınan etanol miktarı ne kadar fazla olursa olsun, kan alkol seviyesi ortalama saatte 12–20 mg/dL azalma gösterdiğinden, belli bir süre sonra kişinin olay sırasında alkollü olup olmadığına etil alkol ölçümü ile karar vermek imkânı kalmayacaktır (18). Her ne kadar, EtG'nin ayrıca postmortem incelemelerde, alkol alımının antemortem dönemde olup olmadığının tespitinde kullanılabileceği yönünde araştırmalar bulunsa da (10); numunenin etanolle birlikte *Escherichia coli* içermesi durumunda EtG'nin sonradan da oluşabileceği ve yanlış pozitif sonuca yol

açabileceği (111) ya da bakteriyel kontaminasyon söz konusu olduğunda hidroliz olarak yalancı negatif sonuçlar doğurabileceği belirtilmektedir (112). Buna karşın, EtS'nin yalancı pozitif ya da yalancı negatif sonuçlar vermediği ve bu anlamda EtG'ye üstünlüğü bildirilmektedir (113).

EtG ve EtS'nin literatürde, kan ve idrar dışında da pek çok vücut sıvılarında ve dokularda gösterildiği görülmektedir. Kerekes ve ark. ile Hoiseth ve ark. ayrı ayrı yürüttükleri çalışmalarda saçta ve diğer vücut bölgelerindeki kıllarda EtG'yi göstermeyi başarmışlardır (57, 114). Hatta son zamanlarda, değişik yöntemlerle saçta EtG tespitine yönelik çalışmaların sürdürüldüğü görülmektedir (115). Pichini ve ark. ise mekonyumda EtG tespitini gerçekleştirerek, gebelik döneminde alkol alımının bir göstergesi olarak değerlendirilebileceğini belirtmişlerdir (59).

Postmortem dönemde EtG'nin kan ve idrar ile birlikte daha korunaklı bir yerde bulunan göz içi sıvısında gösterilmesini ise Keten ve ark. gerçekleştirerek, göz içi sıvısında tespit edilen EtG değerleri ile kan ve idrar EtG değerleri arasında korelasyon olduğunu ortaya koymuşlardır (116).

Bununla birlikte, Hoiseth ve ark. kan ve idrar ile birlikte ağız içi sıvısını da analiz ettikleri çalışmalarında; oldukça düşük dozda alkol alımını takiben kan ve ağız içi sıvısında ne EtG ve ne de EtS'ye rastlandığını; oysa 1 g/kg etanol alımını takiben kan ve idrardakinden belirgin olarak düşük olmakla birlikte ağız içi sıvısında maksimum EtG değerlerinin 0,013–0,059 mg/L arasında olduğunu göstermişlerdir (117, 118), ki bu değerlerin kandakinin ortalama 0,029 katı olduğu rapor edilmiştir.

Schummer ve ark. ondört sağlıklı gönüllü üzerinde yürüttükleri bir çalışma ile 38 ile 154,6 g arasında değişen miktarlarda etanol alımından sonra toplanan ter

örneklerinde 1,7-103 µg/L düzeylerinde EtG tespit etmişler ve bu seviyenin kan EtG düzeyinin %1'i kadar olduğuna dikkat çekmişlerdir (119).

Morini ve ark. tırnak dokusunda EtG'nin tespitine yönelik sosyal içicilerle yürüttükleri bir çalışmada, EtG'nin tırnakta aynı kişilerden elde edilen saç örneklerinden daha yüksek değerlerde tespit edildiğini bildirmişlerdir (120). Keten ve ark. ise değişik derecelerde alkol kullanım öyküsü olan 16 gönüllü üzerindeki bir çalışmada, alkol kullanım yoğunluğu ile tırnakta tespit edilen EtG konsantrasyonları arasında doğru orantılı bir ilişki olduğunu göstermişlerdir (121).

Vücut sıvıları dışında kalsifiye dokularda da EtG tespitine yönelik çalışmalar yürütülmektedir. Zeren ve ark. 29 katılımcı ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında, diş dokusunda EtG göstermeyi başarmışlar ve yoğun miktarda alkol alan kişilerden elde edilen dişlerde istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha fazla EtG tespit etmişlerdir (122).

Schloegl ve ark. ise postmortem dönemde elde edilen kemik iliğinde EtG göstermeyi başarmışlardır (123).

Hoiseth ve ark. kan ve idrar numunelerinde EtG'nin farmakokinetik davranışını inceleyen çalışmalarında, bu minor metabolitin vücut sıvılarında farklı zamanlarda tespit edilebileceğini göstermişlerdir (53). Bununla birlikte literatürde, gerek EtG ve gerekse de EtS ile ilgili kan ve idrarda kinetik çalışmaların yapılmakta olduğu görülmektedir (47, 53, 117, 118, 124). Ancak, etanol metabolizmasının karaciğer enzimlerinin çalışma hızını etkileyen genetik faktörler başta olmak üzere pek çok kalıtsal ve çevresel faktörün etkisinde olduğu düşünüldüğünde ve yapılmış olan çalışmaların oldukça az sayıdaki katılımcı ile yürütüldüğü dikkate alındığında, minor metabolitlerin yarılanma ömürleri ve pik yapma ya da tespit edilme süreleri gibi

bilgilerin net olarak ortaya konabilmesi için halen konuya ilişkin olarak pek çok çalışmanın yapılması gerektiği görüşü geçerliliğini korumaktadır.

Çalışmamız, literatürdeki benzer çalışmalar gözetilerek, Türk toplumunda EtG ve EtS'nin kan ve idrar kinetiğini ortaya koyan ilk deneysel çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Katılımcı grubumuzun yaş (19-52) ve BMI değerleri (18-32,5 kg/m²) geniş bir dağılım göstermesi bakımından ve önemli sayıda kadın katılımcının (10 erkek, 7 kadın) yer alması açısından uygun bir örneklem olarak değerlendirilmektedir.

On yedi katılımcı ile yürütülen çalışmamızda kan EtG Cmax değerleri 0,13-0,389 mg/L arasında tespit edildi. Høiseth ve ark. ise 11 kişilik bir katılımcı grubuyla yürüttükleri deneysel çalışmada -çalışmamıza benzer şekilde- 0,5g/kg etanol alımı sonrasında kan EtG Cmax değerlerinin 0,28-0,41 mg/L saptandığını belirtmektedirler (118) (Tablo 5). Halter ve ark. 13 kişi üzerindeki çalışmalarında ise; katılımcılara 0,5 ile 0,78 g/kg etanol verilmiş ve kan EtG pik değerlerinin 0,26-1,08 mg/L arasında seyrettiği rapor edilmiştir (124). On sağlıklı sosyal içicinin katıldığı bir diğer çalışmada da 0,5 g/kg etanol alımı sonrasında maksimum kan EtG düzeyleri 0,27-0,5 mg/L arasında tespit edilmiştir (53).

Literatürde EtG'nin pik yapma süreleri ile ilgili olarak birbirine yakın değerler verildiği görülmektedir. Høiseth ve ark. 11 kişilik çalışmasında bu süre ortalama olarak 3,5 saat, Halter ve ark. çalışmasında 4,0 ±0,9 saat ve Høiseth ve ark. 10 kişilik bir grupta yaptığı farmakokinetik çalışmada ise 3,5-5 saat arasında olarak belirtilmiştir (53, 118, 124). Çalışmamızda da kan EtG değerinin 2-3 saat aralığında pik düzeye ulaştığı görülmüştür. Ayrıca, alkol alımından 10 saat sonra hala 2 olguda kan EtG düzeyi LOD değerinin üzerinde bulunurken; aynı saatte bakılan kan örneğinde 9 olgunun EtS düzeyinin LOD değerinin üzerinde olduğu görülmüştür.

Çalışmanın 24. saatinde ise hiçbir olguda EtG ve EtS tespit edilememiştir. Bununla birlikte; literatürde orta dozda etanol alımı sonrasında kan EtG düzeyinin 10 saat civarında, yüksek dozda etanol alımını takiben ise 17. saatte bile tespit edilebilir düzeyde kaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (53, 125, 126).

EtG'nin idrarda ulaştığı maksimum konsantrasyon ve pik yapma süreleri ile ilgili olarak; 0,5-0,78 g/kg etanol alımı sonrasında Cmax 23,08-178,7 mg/L, Tmax 6.2 ± 0.9 saat (124), Høiseth ve ark. 0,5 g/kg etanol vererek yaptıkları 10 kişilik çalışmada 41-73 mg/L, 4-7 saat (53), 11 kişilik çalışmada ise 47,1-96,5 mg/L ve 3,5-5,5 saat (118) değerlerine ulaşıldığı bildirilmektedir. Gerek maksimum konsantrasyon ve gerekse pik yapma süresiyle ilgili benzer de olsa oldukça geniş aralıklar verildiği dikkati çekmektedir. Çalışmamızda bu değerler 6,89-30,42 mg/L ve $4,4 \pm 0,8$ saat olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, alkol alımından 24 saat sonra hala tüm olgularda idrarda hem EtG, hem de EtS düzeyleri LOD değerinin üzerinde bulunurken; 48. saatte yapılan ölçümlerde EtG ve EtS LOD değerinin altında saptanmıştır. Buna benzer olarak, yapılan çalışmalarda idrarda EtG seviyesinin ortalama 13-20 saat aralığında, çok yüksek dozda etanol alımını takiben ise 3. günde bile halen tespit edilebilir düzeyde olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (48, 127, 128).

Literatürde EtG'nin aksine, EtS'nin kan ve diğer vücut sıvılarındaki kinetik davranışını inceleyen pek fazla çalışmaya rastlanmamıştır. Halter ve ark. çalışmasında 0,5-0,78 g/kg etanol alımı sonrasında kanda maksimum EtS konsantrasyonu ve pik yapma süresiyle ilgili olarak 0,12-0,8 mg/L ve $3 \pm 0,5$ saat değerlerinin verildiği görülmektedir. (124). EtS'nin EtG'ye nispetle daha uzun süre tespit edilebilir düzeyde kaldığı ve daha yüksek değerlere ulaşabildiği bilinmektedir. Bu bağlamda; Høiseth ve ark. oldukça düşük dozda etanol içeren ve alkolsüz şarap olarak bilinen bir içecek ve gargarayla gerçekleştirdikleri bir çalışmada, 7,5 saate

kadar ara ara yapılan ölçümlerde EtG'ye hiçbir kan ve idrar örneğinde rastlanmadığını, ancak EtS'nin 7,5 saat sonra bile idrarda tespit edilebilir düzeylerde olduğunu belirttikleri çalışmaları bu bilgiyi desteklemektedir (117).

Çalışmamızda da gerek kan ve gerekse idrar EtS düzeyleri literatürle uyumlu olarak, EtG'den yüksek bulunmuştur. Kan EtS maksimum konsantrasyon düzeyi 0,211 – 0,5 mg/L arasında, pik yapma süresi ise 2,5-4 saat aralığında bulunmuştur. İdrar EtS değerleri incelendiğinde ise; Cmax 10,5-58,17 mg/L aralığında ve Tmax 4,5±0,9 saat olarak bulunmuştur.

Tablo 5: EtG ve EtS'nin Kan ve İdrar Konsantrasyonları Kinetiğinin İncelendiği Diğer Çalışmalarla Karşılaştırma

Araştırmalar	Etanol Alımı (g/kg)	Kan EtG Cmax (mg/L) Tmax (h)	Kan EtS Cmax (mg/L) Tmax (h)	İdrar EtG Cmax (mg/L) Tmax (h)	İdrar EtS Cmax (mg/L) Tmax (h)
Høiseth ve ark. (2007)	0,5	0,27 - 0,5 4,0	- -	41 - 73 4,75	- -
Halter ve ark. (2008)	0,5-0,78	0,26 - 1,08 4,0 ±0,9	0,12 - 0,8 3±0,5	23,08 - 178,7 6,2±0,9	5,79 - 67,15 5,3±1,2
Høiseth ve ark. (2010)	0,5	0,28 - 0,41 3,5	- -	47,1 - 96,5 5,5	- -
Çalışmamız (2013)	0,5	0,13 – 0,389 2,55±0,3	0,211 - 0,5 3,14±0,3	6,89 - 30,42 4,4±0,8	10,5 - 58,17 4,5±0,9

SONUÇ VE ÖNERİLER

Alkol alımının tespiti, halen adli tıp alanında önemini koruyan konulardan biridir. Literatürde de görüldüğü üzere, günümüzde bu yöndeki çalışmaların; etil alkol minor metabolitlerinin saptanmasına ve hatta bu metabolitlerin canlılarda kan, idrar ve diğer vücut sıvılarındaki saatlik değişimlerinin gösterilmesine odaklandığı anlaşılmaktadır. Bu minor metabolitler içerisinde şüphesiz en fazla üzerinde durulan –bir ölçüde daha kolay çalışılabilmesinden dolayı- EtG olsa da, gerek bizim çalışmamızda ve gerekse de önceki çalışmalarda vurgulandığı üzere EtS, düşük doz etanol alımından sonra bile saptanabilmesi, daha uzun süre tespit edilebilirliğini koruması ve yalancı pozitif ya da negatif sonuçlar açısından güvenilir olması gibi özellikleriyle üstünlüğünü ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak çalışmamızla, Türk popülasyonunda 0,5 g/kg düzeyinde alkol alımından sonra EtG ve EtS'nin en yüksek değerlerine kanda 2-4 saat aralığında, idrarda ise 3,5-5,5 saat aralığında ulaştıkları gösterilmiş, EtS'nin gerek kanda ve gerekse idrarda hem daha yüksek konsantrasyonlara ulaştığı ve hem de daha uzun süre tespit edilebilme potansiyelinin olduğu tespit edilmiştir.

Bununla birlikte, elde edilen analiz sonuçları yorumlanırken dikkat edilmesi ve mutlaka hesaba katılması gereken hususların başında; yaş, cinsiyet, BMI gibi kişisel ve alkol metabolizmasından sorumlu enzimlerin çalışmasını doğrudan etkileyen genetik faktörler gelmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz analiz sonuçları ile önceki çalışmalar arasındaki farklılıkların, bu faktörler nedeniyle oluştuğu düşünülmektedir. Nitekim, literatürde, etil alkol minor metabolitlerinin kinetiğinin araştırıldığı bu tür deneysel çalışmalar henüz yeterli düzeye ulaşamamış ve farklı

toplumlarda gerçekleştirilen bu deneylerdeki sonuç farklılıkları da kişisel ve özellikle de genetik faktörlerle açıklanmaya çalışılmıştır.

Toplumumuzda alkol metabolizma hızının ve EtG, EtS metabolitlerinin kinetiklerinin net olarak ortaya konabilmesi amacıyla, farklı dozlarda etanolün verildiği, birkaç basamaklı, daha uzun süreli ve sık aralıklarla ölçümlerin yapıldığı geniş katılımlı deneysel çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Örnek-Büken N, Balseven-Odabaşı A, Aslan D, Temel F, Odabaşı O. Dünya Tabipler Birliğinin Alkolün Toplum ve Sağlık Üzerine Etkisini Azaltmaya Yönelik Bildirgesi, Sağlıkla İlgili Uluslararası Belgeler, Füsun Sayek TTB Raporları/Kitapları, Türk Tabipleri Birliği Yayınları, Ankara, 2009 s.133
2. Polat O., Adli Tıp, Der Yayınları 2000; 448-454.
3. Koç S, Alkol ve Uyuşturucu Madde Kullanımı ile İlgili Adli Tıp Sorunları, Soysal Z, Çakalır C. Adli Tıp Kitabı, Cilt 3. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Basımevi ve Film Merkezi; 1999. s.1349-1354
4. <http://www.mevzuat.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=1.5.5237&sourceXmlSearch=&MevzuatIliski=0> Erişim Tarihi: 18.09.2013
5. <http://www.mevzuat.gov.tr/Metin.Aspx?MevzuatKod=1.5.4721&sourceXmlSearch=&MevzuatIliski=0> Erişim Tarihi: 18.09.2013
6. Swift R. Direct measurement of alcohol and its metabolites. *Addiction* (2003);98(2) :73–80.
7. Conigrave KM, Degenhardt LJ, Whitfield JB, Saunders JB, Helander A, Tabakoff B. CDT, GGT and AST as markers of alcohol use: the WHO/ISBRA collaborative project. *Alcohol Clin Exp Res.* (2002); 26(3):332–9.
8. Balseven A, Bilge Y, Hancı İH, Kan ve Solunum Havası Kan Alkol Düzeyi Arasındaki İlişkisi. *Toksikoloji Dergisi* (2003); 1(1): 31-37
9. Politi L, Leone F, Morini L, Poletini A. Bioanalytical procedures for determination of conjugates or fatty acid esters of ethanol as markers of ethanol consumption: A review. *Analathical Biochemistry* (2007); 368(1):1-16.

10. Wurst MF, Skipper GE, Weinmann W. Ethyl glucuronide-the direct ethanol metabolite on the trashold from science to routine use. *Addiction* (1998); Suppl. 2: 51-61
11. Viel G, Boscolo-Berto R, Cecchetto G, Fais P, Nalesso A, Ferrara SD. Phosphatidylethanol in Blood as a Marker of Chronic Alcohol Use: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Mol. Sci.* (2012); 13, 14788-14812.
12. Vural N., Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Basımevi 1984: 293-303
13. Hacıoğlu G, Alkol Kullanımının Kişilik ve Zeka Üzerine Etkisi ve Alkoliklerin İşledikleri Suçlar, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul 1994: 2-4,9-11.
14. Aykaç M., Adli Tıp, Nobel Tıp Kitabevleri, 1993; 325-330.
15. Sayın H., Alkol Hassasiyeti ve Alkol Metabolizması Enzimlerinin Postmortem Araştırılması ve Adli Toksikoloji Açısından değerlendirilmesi, Farmasotik Toksikoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi, Ankara 2000:2, 20-22.
16. Yediparmak A., Trafik Kazalarında Alkol ve Uyuşturucu Madde Faktörü, Kazaların Çevresel ve Teknik Araştırması Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 1996: 11.
17. Dökmeci İ, Toksikoloji, Savaş Ciltevi, İstanbul 2001: 270.
18. Baban N, Kurt K, Kaptanoğlu K, Kaptanoğlu AS, Baban A, Acar U, Karakuş Ü. Etil alkol. *Adli Toksikoloji Kitabı*. 1.baskı. İstanbul: Adli Tıp Kurumu Yayınları; 2003. s. 145.
19. Dubowski KM., Absorption, Distribution and Elimination of Alcohol: Highway Safety Aspects. *J Stud Alcohol Suppl.* (1985) Jul;10:98-108.

20. Bujanda L., The effects of alcohol consumption upon the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol.* (2000) Dec;95(12):3374-82.
21. Loew M, Boeing H, Stürmer T, et al. Relation among alcohol dehydrogenase 2 polymorphism, alcohol consumption, and levels of gamma-glutamyltransferase. *Alcohol* (2003); 29: 131-5
22. İlter T, Tekin F., Alkol Metabolizması. *Güncel Gastroenteroloji.* (2005); 58-62.
23. Zakhari S., Overview: How Is Alcohol Metabolized by the Body. (2006). Vol. 29, No. 4, 245-254.
24. Wurst FM, Kempster C, Metzger J, Seidl S, Alt A. Ethyl glucuronide: a marker of recent alcohol consumption with clinical and forensic implications. *Alcohol* (2000); (20) 111–116.
25. Murty BR, The Biochemistry of Alcohol Toxicity. *Resonance*, October (2004), 41-47.
26. Işık E. *Organik Psikiyatri*, Tayf Matbaası, İstanbul, 1999:418
27. Knight B, Saukko P. *Knight's Forensic Pathology*, Oxford University Pres, London, (2004):557
28. Vonghia L, Leggio L, Ferrulli A, Bertini M, Gasbarrini G, Addolorato G, et al. Acute alcohol intoxication. *European Journal of Internal Medicine*, (2008) 19(8), 561–567.[5]
29. Bilge Y. *Adli Bilimler Sözlüğü*, Palme Yayıncılık, Ankara 2002:20,21
30. Can M, Gürpınar S, İşler H, Varol N, Alkol Alan Kişilerin Kan Alkol Düzeyinin Solunum Havasındaki Alkol Düzeyi İle Karşılaştırılması Ve Karaciğer Enzimlerine Etkisinin Araştırılması, *Van Tıp Dergisi*, 15 (3): 75–80, 2008

31. Gullberg RG, Breath alcohol measurement variability associated with different instrumentation and protocols, *Forensic Sci Int.*, 2003 Jan 9, 131(1): 30-35
32. Uysal C. Solunum Havasında Alkol Düzeyini Etkileyen Etmenler. Uzmanlık Tezi, İstanbul; 2009.
33. Vural N, Sayın H, Kan Alkol Düzeyini Etkileyen Faktörlerin Adli Tıp Açısından Değerlendirilmesi, *Adli Tıp Bülteni* (1996):1 (2), 75.
34. Baduroğlu E, Durak D., Alkol İle İlgili Adli Tıp Sorunları. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, (2010); 36 (2) 65-71.
35. Di Maio M, Vincent J, Interpretative Toxicology. *Drug Abuse and Death, Forensic Pathology* (1993): 439-487.
36. Vural N., Toksikoloji Labaratuar Kitabı, Ankara Üniversitesi Basımevi (2000):6-10
37. Bilge Y., *Adli Tıp*, Üçbilek Matbaası 2005:160-163
38. Annabel I. Ingham Roger W. Byard MBBS. The potential significance of elevated vitreous sodium levels at autopsy. *Journal of Forensic and Legal Medicine* 16 (2009) 437–440
39. Aşıcıoğlu F., *Trafikte Güvenli Sürüş Açısından Alkol*. Beta Yayınevi, İstanbul 2009.
40. Hancı H, Çoşkunol H, Ege B, Yemişçigil A, Saygılı R, Biranın Solunum Havası ve Alkol Düzeylerine Etkisi, 7 Ulusal Adli Tıp Günleri Poster Sunuları Antalya (1993): 110-112
41. Kugelberg FC, Jones AW. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: A review of the literature. *Forensic Science International* 165 (2007) 10–29.
42. Andersen BD, Wise BL. *Textbook of clinical chemistry*. Philadelphia: WB Saunders Company, (1986); 197-208.

43. Schröck A., Development of an LC-MS/MS Method for the Detection of the Alcohol Biomarker Phosphatidyl- Ethanol (PEth) in Blood. Institute of Forensic Medicine Bern, Switzerland. Master Thesis 2012.
44. Lehrer M. In Kaplan LA. Mass spectrometry. St. Louis: Mosby Company, (1996); 167-84.
45. Biberoğlu G., Kütle spektrometresi ve tıp alanında kullanımı. T Klin Tıp Bilimleri (2003); 23:491-498
46. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. Science (1989); 6: 64-71.
47. Høiseth G, Morini L, Poletti A, Christophersen A, Mørland J., Blood kinetics of ethyl glucuronide and ethyl sulphate in heavy drinkers during alcohol detoxification. Forensic Science International 188 (2009) 52–56.
48. Wurst FM, Dresen S, Allen J, Wiesbeck G, Graf M, Weinmann W. Ethyl sulphate: a direct ethanol metabolite reflecting recent alcohol consumption. Addiction (2006);101:204-11.
49. Wurst FM, Thon N, Weinmann W, et al. Characterization of sialic acid index of plasma apolipoprotein J and phosphatidylethanol during alcohol detoxification: a pilot study. Alcohol Clin Exp Res (2012);36:251-7.
50. Schneider H, Glatt H. Sulpho conjugation of ethanol in humans in vivo and by individual sulfotransferase forms in vitro. Biochem J (2004); 383(1): 543–549
51. Schmitt G, Aderjan R, Keller T, Wu M. Ethyl glucuronide — an unusual ethanol metabolite in humans — synthesis, analytical data, and determination in serum and urine. J Anal Toxicol (1995);19:91-4.

52. Knight B, Alkol, Birgen N (ç.ed), Sipmson Adli Tıp Kitabı, 10.Baskı, İstanbul: Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı;1991. s.310
53. Høiseth G, Bernard JP, Karinen R, Johnsen L, Helander A, Christophersen AS, Mørland J. A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: applications to forensic toxicology. *Forensic Sci Int* (2007) ;172(2-3):119-24
54. Høiseth G, Karinen R, Christophersen AS, Olsen L, Normann PT, Mørland J. A study of ethyl glucuronide in post-mortem blood as a marker of ante-mortem ingestion of alcohol. *Forensic Sci Int* (2007); 165(1):41-5.
55. Neumann T, Helander A, Dahl H, Holzmann T, Neuner B, Weiss-Gerlach E, Müller C, Spies C. Value of ethyl glucuronide in plasma as a biomarker for recent alcohol consumption in the emergency room. *Alcohol Alcohol* (2008);43(4):431-5.
56. Politi L, Morini L, Mari F, Groppi A, Bertol E. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in autopsy samples 27 years after death. *Int J Legal Med* (2008);122(6):507-9.
57. Kerekes I, Yegles M, Grimm U, Wennig R. Ethyl glucuronide determination: head hair versus non-head hair. *Alcohol Alcohol* (2009);44(1):62-6.
58. Wurst FM, Kelso E, Weinmann W, Pragst F, Yegles M, Sundström Poromaa I. Measurement of direct ethanol metabolites suggests higher rate of alcohol use among pregnant women than found with the AUDIT--a pilot study in a population-based sample of Swedish women. *Am J Obstet Gynecol* (2008);198(4):407.e1-5.
59. Pichini S, Morini L, Marchei E, Palmi I, Rotolo MC, Vagnarelli F, Garcia-Algar O, Vall O, Zuccaro P. Ethylglucuronide and ethylsulfate

- in meconium to assess gestational ethanol exposure: preliminary results in two mediterranean cohorts, *Can J Clin Pharmacol* (2009);16(2):370-5.
60. Baranowski S, Serr A, Thierauf A, Weinmann W, Perdekamp MG, Wurst FM, Halter CC, In vitro study of bacterial degradation of ethyl glucuronide and ethyl sulphate, *Int J Legal Med* (2008);122(59): 389–39
 61. Arndt T, Gierten B, Gussregen B, Werle A, Gruner J, False-positive ethyl glucuronide immunoassay screening associated with chloralhydrate medication as confirmed by LC–MS/MS and self-medication. *Forensic Sci Int* (2009);184(1-3):27–29
 62. Høiseth G, Karinen R, Johnsen L, Normann PT, Christophersen AS, Mørland J, Disappearance of ethyl glucuronide during heavy putrefaction. *Forensic Sci Int* (2008); 176(2-3):147–151.
 63. Kaphalia BS, Ansari GA. Fatty acid ethyl esters and ethanol-induced pancreatitis. *Cell Mol Biol* (2001); 47(online pub:oL): 173-179.
 64. Laposata EA, Lange LG. Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abused. *Science* (1986); 231(4737): 497-499.
 65. Lange LG. Mechanism of fatty acid ethyl ester formation and biological significance, in: E Rubin, KW Miller, SH Roth (Eds). *Molecular and Cellular Mechanisms of Alcohol and Anesthetics*. New York Academy of Science. New York. 1991.
 66. Heith AM, Morse CR, Tsijita T, Volpacelli SA, Flood JG, Laposata M. Fatty acid ethyl ester synthase catalyzes the esterification of ethanol to cocaine. *Biochem Biophys Res Commun* (1995); 208(2):549-554.

67. Doyle KM, Bird DA, al- Salihi S, Hallaq Y, Cluette- Brown JE, Goss KA, Laposata M. Fatty acid ethyl esters are present in human serum after ethanol ingestion. *J Lipid Res* (1994); 35(3): 428-437.
68. Best CA, Cluette-Brown JE, Teruya M, Teruya A, Laposata M. Red blood cell fatty acid ethyl esters in the blood. *J Lipid Res* (2003); 44(3): 612-620.
69. Moore C, Jones J, Lewis D, Buchi K. Prevalence of fatty acid ethyl esters in meconium specimens. *Clin Chem* (2003); 49(1):133-6.
70. Ostrea EM, Hernandez JD, Bielawski DM, Kan JM, Leonardo GM, Abela MB, Church MW, Hannigan JH, Vanisse JJ, Ager JW, Sokol RJ. Fatty acid ethyl esters in meconium: are they biomarkers of fetal ethanol exposure and effect? *Ethanol Clin. Exp. Res* (2006); 30:1152-1159.
71. Moore C, Jones J, Lewis D, Buchi K. Prevalence of fatty acid ethyl esters in meconium specimens. *Clin. Chem* (2003); 49: 133-136.
72. Pichini S, Pellegrini M, Gareri J, Koren J, García-Algar O, Vall O, Pacifici R, Zuccaro P, Marchei E. Alarming Prevalence of Fetal Ethanol Exposure in a Mediterranean City. *Ther Drug Monit* (2008); 30: 249-254.
73. Beck O, Helander A. 5-Hydroxytryptophol as a marker for recent alcohol intake. *Addiction* (2003); 98(2):63–72.
74. Borg S, Beck O, in: F.M.Wurst (Ed.). *New and Upcoming Markers of Alcohol Consumption*, Steinkopff, Darmstadt, 2001, s. 53.
75. Musshoff F. Chromatographic methods for the determination of markers of chronic and acute alcohol consumption. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* (2002); 781(1-2): 457–480

76. Wurst FM, Alling C, Aradottir S, Pragst F, Allens JP, Weinmann W et al. Emerging biomarkers: new directions and clinical applications. *Alcohol Clin Exp Res* (2005); 29(3): 465–73.
77. Aradottir S, Asanovska G, Gjerss S, Hansson P, Alling C. Phosphatidylethanol (PEth) concentrations in blood are correlated to reported alcohol intake in alcohol-dependent patients. *Alcohol Alcohol* (2006);41:431-7.
78. Zheng YF, Beck O, Helander A. Method development for routine liquid chromatography–mass spectrometry measurement of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (PEth) in blood. *Clin Chim Acta* (2011);412:1428-35.
79. Hansson P, Caron M, Johnson G, Gustavsson L, Alling C. Blood phosphatidylethanol as a marker of alcohol abuse: levels in alcoholic males during withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res* (1997);21:108-10.
80. Wurst FM, Thon N, Aradottir S, et al. Phosphatidylethanol: normalization during detoxification, gender aspects and correlation with other biomarkers and self-reports. *Addict Biol* (2010);15:88-95.
81. Conigrave KM, Davies P, Haber P, Whitfield JB. Traditional markers of excessive alcohol use. *Addiction* (2003);98(2):31–43.
82. Anton RF, Lieber C, Tabakoff B. Carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyltransferase for the detection and monitoring of alcohol use: results from a multisite study. *Alcohol Clin Exp Res* (2002); 26(2): 1215–22.
83. Hietala J, Puukka K, Koivisto H, Anttila P, Niemelä O. Serum gammaglutamyl transferase in alcoholics, moderate drinkers and abstainers: effect on GT reference intervals at population level. *Alcohol Alcohol* (2005);40(6): 511–4.

84. Helander A, Tabakoff B. Biochemical markers of alcohol use and abuse: experiences from the Pilot Study of the WHO/ISBRA Collaborative Project on state and trait markers of alcohol. International Society for Biomedical Research on Alcoholism. *Alcohol Alcohol* (1997); 32(2): 133-44.
85. Puukka K, Hietala J, Koivisto H, Anttila P, Bloigu R, Niemelä O. Additive effects of moderate drinking and obesity on serum gammaglutamyl transferase activity. *Am J Clin Nutr* (2006);83(6):1351-4.
86. Lawlor DA, Sattar N, Smith GD, Ebrahim S. The associations of physical activity and adiposity with alanine aminotransferase and gamma glutamyltransferase. *Am J Epidemiol* (2005);161(11):1081-8.
87. Lam GM, Mobarhan S. Central obesity and elevated liver enzymes. *Nutr Rev* (2004); 62(10):394-9.
88. Lee DH, Blomhoff R, Jacobs Jr DR. Is serum gamma glutamyltransferase a marker of oxidative stress? *Free Radic Res* (2004);38(6):535-9.
89. Puukka K, Hietala J, Koivisto H, Anttila P, Bloigu R, Niemelä O. Agerelated changes on serum GGT activity and the assessment of ethanol intake. *Alcohol Alcohol* (2006);41(5):522-7.
90. Stromme JH, Rustad P, Steensland H, Theodorsen L, Urdal P. Reference intervals for eight enzymes in blood of adult females and males measured in accordance with the International Federation of Clinical Chemistry reference system at 37 °C: part of the Nordic Reference Interval Project. *Scand J Clin Lab Invest* (2004);64(4):371-84.

91. Sillanauke P, Aalto M, Seppä K. Carbohydrate-deficient transferrin and conventional alcohol markers as indicators for brief intervention among heavy drinkers in primary health care. *Alcohol Clin Exp Res* (1998);22(4): 892–6.
92. Yokoyama A, Yokoyama T, Muramatsu T, Omori t, Matsushita S, Higuohis S et al. Macrocytosis, a new predictor for esophageal squamous cell carcinoma in Japanese alcoholic men. *Carcinogenesis* (2003);24(11):1773–8.
93. Allen JP, Litten RZ. The Role of Biomarkers in the Treatment of Alcohol Use Disorders, *J Subst Abuse Treat* (2001); 20 (1):81-85
94. Adamson JW. Logo DL. Anemiler ve polisitemiler. Harrison TR (ed). Harrison İç Hastalıkları Prensipleri, Sağlık Y (çev. ed.). 14 baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2004 s. 350-2
95. Mırsal H, Kalyoncu ÖA, Pektaş Ö. [Biochemical markers of alcohol use and their clinical applications]. *Journal of Dependence*, (2002);3(3):165-172
96. Yersin B, Nicolet JF, Dercrey H, Burnier M, van Melle G, Pecoud A. Screening for excessive alcohol drinking. Comparative value of carbohydrate- deficient transferrin, gamma-glutamyltransferase, and mean corpuscular volume. *Arch Intern Med* (1995);155(17):1907–11.
97. Xin Y, Lasker JM, Lieber CS. Serum carbohydrate- deficient transferrin: mechanism of increase after chronic alcohol intake. *Hepatology* (1995); 22(5):1462-8.
98. Mırsal H, Kalyoncu ÖA, Pektaş Ö. Alkol Kullanımının Biyokimyasal Belirleyicileri ve Klinik Uygulamaları. *Bağımlılık Dergisi*, 2002; 3(3): 165-172.

99. Sillanauke P, Olsson U. Improved diagnostic classification of alcohol abusers by combining carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyl transferase. *Clin Chem* (2001); 47(4):681- 685.
100. Glasinovic JC, Lobos X, Scrivanti M, Severin MC, Quiroga t, Moncada C et al. Carbohydrate-deficient transferrin, gamma –glutamyl transferase and mean corpuscular volume in the evaluation of recent alcohol intake in excessive drinkers. *Rev Med Chil* (2001); 129(4): 375-381.
101. Limin S, Jarvie DR, Chick J, Simpson D. Limitations of CDT and GGT in detecting relapses in patients attending an alcohol problems clinic. *Scott Med J* (1999); 44(2): 140-2.
102. Das SK, Dhanya L, Vasudevan DM. Biomarkers of alcoholism: an updated review. *Scand J Clin Lab Invest* (2008);68(2): 81–92
103. Foti R.S., Fisher M.B., Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs, *Forensic Sci. Int.* 153 (2005) 109–116.
104. Helander A, Beck O. Mass spectrometric identification of ethyl sulfate as an ethanol metabolite in humans. *Clin Chem* (2004) 50:936–7.
105. Dahl H, Stephanson N, Beck O *et al.* Comparison of urinary excretion characteristics of ethanol and ethyl glucuronide. *J Anal Toxicol* (2002) 26:201–4.
106. Zimmer H, Schmitt G, Aderjan R. Preliminary immunochemical test for the determination of ethyl glucuronide in serum and urine: comparison of screening method results with gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* (2002) Jan-Feb;26(1):11-6.
107. Helander A. Biological markers in alcoholism. *J Neural Transm* (2003) 66(Suppl):15–32.

108. Politi L, Leone F, Morini L et al. Bioanalytical procedures for determination of conjugates or fatty acid esters of ethanol as markers of ethanol consumption: a review. *Anal Biochem* (2007) 368:1–16.
109. Helander A, Beck O. Ethyl sulfate: a metabolite of ethanol in humans and a potential biomarker of acute alcohol intake. *J Anal Toxicol* (2005) 29:270–4.
110. Skipper GE, Weinmann W, Thierauf A et al. Ethyl glucuronide: a biomarker to identify alcohol use by health professionals recovering from substance use disorders. *Alcohol Alcohol* (2004) 39:445–9.
111. Helander A, Olsson I, Dahl H. Postcollection synthesis of ethyl glucuronide by bacteria in urine may cause false identification of alcohol consumption. *Clin Chem* (2007) 53:1855–7.
112. Hoiseth G, Karinen R, Johnsen L *et al.* Disappearance of ethyl glucuronide during heavy putrefaction. *Forensic Sci Int* (2007) 176:147–51.
113. Helander A, Dahl H. Urinary tract infection: a risk factor for false-negative urinary ethyl glucuronide but not ethyl sulfate in the detection of recent alcohol consumption. *Clin Chem* (2005) 51:1728–30.
114. Hoiseth G, Morini L, Polettini A, Christophersen A, Morland J. Ethyl glucuronide in hair compared with traditional alcohol biomarkers—a pilot study of heavy drinkers referred to an alcohol detoxification unit. *Alcohol Clin Exp Res* (2009);33:812-6.
115. Yaldiz F, Daglioglu N, Hilal A, Keten A, Gülmen MK. Determination of ethyl glucuronide in human hair by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Forensic Leg Med.* (2013) Oct;20(7):799-802.

116. Keten A, Tumer AR, Balseven-Odabasi A. Measurement of ethyl glucuronide in vitreous humor with liquid chromatography-mass spectrometry. *Forensic Sci Int.* (2009) Dec 15;193(1-3):101-5.
117. Høiseth G, Yttredal B, Karinen R, Gjerde H, Christophersen A. Levels of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in oral fluid, blood, and urine after use of mouthwash and ingestion of nonalcoholic wine. *J Anal Toxicol.* (2010) Mar;34(2):84-8.
118. Høiseth G, Yttredal B, Karinen R, Gjerde H, Mørland J, Christophersen A. Ethyl glucuronide concentrations in oral fluid, blood, and urine after volunteers drank 0.5 and 1.0 g/kg doses of ethanol. *J Anal Toxicol.* (2010) Jul-Aug;34(6):319-24.
119. Schummer C, Appenzeller BM, Wennig R. Quantitative determination of ethyl glucuronide in sweat. *Ther Drug Monit.* (2008) Aug;30(4):536-9.
120. Morini L, Colucci M, Ruberto MG, Groppi A. Determination of ethyl glucuronide in nails by liquid chromatography tandem mass spectrometry as a potential new biomarker for chronic alcohol abuse and binge drinking behavior. *Anal Bioanal Chem.* (2012) Feb;402(5):1865-70.
121. Keten A, Zeren C, Arslan MM, Daglıoğlu N, Karanfil R, Şen BB. Determination of ethyl glucuronide in fingernails by LC/MS-MS. *Rom J Leg Med* (2013); 21: 67-72.
122. Zeren C, Keten A, Celik S, Damlar I, Daglıoğlu N, Celiker A, Karaarslan B. Demonstration of ethyl glucuronide in dental tissue samples by liquid chromatography/electro-spray tandem mass spectrometry. *J Forensic Leg Med.* (2013) Aug;20(6):706-10.

123. Schloegl H, Rost T, Schmidt W, Wurst FM, Weinmann W., Distribution of ethyl glucuronide in rib bone marrow, other tissues and body liquids as proof of alcohol consumption before death, *Forensic Sci. Int.* 156 (2006) 213-218.
124. Halter CC, Dresen S, Auwaerter V, Wurst FM, Weinmann W. Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulfate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake. *Int J Legal Med.* (2008) Mar;122(2):123-8.
125. Schmitt G., Droenner P., Skopp G., Aderjan R., Ethyl glucuronide concentration in serum of human volunteers, teetotalers, and suspected drinking drivers, *J. Forensic Sci.* 42 (1997) 1099–1102.
126. Droenner P., Schmitt G., Aderjan R., Zimmer H., A kinetic model describing the pharmacokinetics of ethyl glucuronide in humans, *Forensic Sci. Int.* 126 (2002) 24–29.
127. Stephanson N., Dahl H., Helander A., Beck O., Direct quantification of ethyl glucuronide in clinical urine samples by liquid chromatography–mass spectrometry, *Ther. Drug Monit.* 24 (2002) 645–651.
128. Wurst F.M., Vogel R., Jachau K., et al., Ethyl glucuronide discloses recent covert alcohol use not detected by standard testing in forensic psychiatric inpatients, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 27 (2003) 471–476.