T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Doç. Dr. Hüseyin Çakan

ADLİ BİLİMLERDE *Lucilia sericata* LARVALARININ ENTOMOTOKSİKOLOJİK ÇALIŞMALARDA KULLANILMASI

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

UZM. BİYOLOG SELDA DARI

İSTANBUL, 2019

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Doç. Dr. Hüseyin Çakan

ADLİ BİLİMLERDE *Lucilia sericata* LARVALARININ ENTOMOTOKSİKOLOJİK ÇALIŞMALARDA KULLANILMASI

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

UZM. BİYOLOG SELDA DARI

İSTANBUL, 2019

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje no: 2688

Önsöz

Doktora öğrenimimi ve tez çalışmamı yaptığım süre içerisinde, araştırmamı yapabilmem için tüm imkanları bana sağlayan İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Faruk AŞICIOĞLU' na ve Fen Bilimleri Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Münevver AÇIKKOL' a,

Öğrenciliğim ve tez çalışmalarım sürecinde ilgi ve desteğini esirgemeyen, akademik bilgileri ile bana çok şey öğreten ve bana inanan, sakin, kibar ve mütevazi yapısını hep örnek aldığım, her başım sıkıştığında bana zaman ayıran ve yardımcı olan, tez çalışmamda çok fazla emeği geçen çok sevdiğim ve değer verdiğim kıymetli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Hüseyin ÇAKAN' a,

Doktora öğrenimim için aldığım ilk derste tanıştığım, derslerine heyecanla katıldığım ve toksikoloji bilimini bana sevdiren, öğreten ve doktora tez araştırmamda bütün sorunları çözen, bilgisi ile beni aydınlatan çok sevdiğim Sayın hocam Prof. Dr. Salih CENGİZ' e,

Tez çalışmalarım sürecinde, kendisinden entomoloji alanında çok şey öğrendiğim, çalışkanlığını örnek aldığım, tez araştırmalarım için gerekli laboratuvar şartlarını sağlayan Sayın hocam Doç. Dr. Erdal POLAT' a,

Doktora öğrenimim süresince dostluğu ile yanımda olan, tez araştırmamda benim kadar emeği geçen, çalışkanlığına ve bilgisine şaşırdığım, kendisinden çok şey öğrendiğim dostum ve bilim insanı Sayın hocam Doç. Dr. Beril ANILANMERT'e,

İlk Toksikoloji laboratuvarı çalışmalarını öğreten ve tez çalışmamda ilk deneyleri yapmamda yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Selda MERCAN, Dr. Öğr. Üyesi Zeynep TÜRKMEN'e,

Doktora öğrenimim ve tez çalışmalarım süresince yardımları ve dostlukları ile hep yanımda olan, sevgili arkadaşlarım Dr. Saqib SHAHZAD, Dr. Öğr. Üyesi Özlem BÜLBÜL ERCAN, Uzman Biyolog Gülden Onur KONDAKÇI, Uzman Biyolog Erhan AÇAR'a, Uzman Biyolog Perihan YUCA' ya,

Tez çalışmam süresince emeği geçen İ.Ü. Adli Tıp Enstitüsü öğretim üyeleri ve tüm çalışanlarına,

Her zaman sevgisi ve dostluğu ile yanımda olan, doktora öğrenimim süresince yardımlarını esirgemeyen ve bana güç veren kıymetli eşim Ökkeş DARI'ya ve aileme sonsuz teşşekürlerimi sunarım.

Selda DARI

İçindekiler

Önsöz ..... **ii**

İçindekiler ..... **iv**

Tablolar Listesi ..... **ix**

Şekiller Listesi ..... **xiii**

Kısaltmalar ..... **xxi**

Özet..... **xxiv**

Summary..... **xxvi**

1. Giriş ve Amaç **1**

2. Genel Bilgiler **4**

2.1. Adli Entomoloji **4**

2.1.1. Adli Entomolojinin Tarihçesi **8**

2.2. Ölümden Sonra Gerçekleşen Değişimler **11**

2.2.1. Postmortem (Ölüm Sonrası) Değişiklikler **12**

2.2.1.1. *Çürüme (Dekompozisyon)* **13**

2.2.1.1.1. Otoliz *)* **14**

2.2.1.1.2. Pütrefaksiyon (=Kokuşma=Çürüme) **15**

2.2.1.2. *Cesedin çürüme evreleri* **16**

2.2.1.2.1. Başlangıç evresi **16**

2.2.1.2.2. Şişme evresi **17**

2.2.1.2.3. Aktif çürüme **17**

2.2.1.2.4. İleri çürüme **17**

2.2.1.2.5. Kuruma **17**

2.3. Taksonomide *Lucilia sericata*' nın Yeri **17**

2.4. Sineklerin Biyolojisi **21**

2.4.1. Beslenmeleri ve boşaltım organları **21**

2.4.2 Yumurta ve döllenme …….. 22

***2.4.2.1 Yumurta bırakma* …… 22**

2.4.3 Postembriyonal gelişme ……. 23

2.4.3.1 *Başkalaşım (Metamorfoz*) …… 25

2.4.4. Metamorfoz sonrası gelişme …… 26

2.4.4.1 *Olgunlaşma dönemi* …… 26

2.4.4.2 *Üreme dönemi* …….. 26

2.4.4.3 *Yaşlılık dönemi* …… 27

2.5. Sineklerin Gelişimini Etkileyen Çevresel Koşullar …… 27

2.5.1. Sıcaklık …….. 27

2.5.2. Işık ……. 28

2.5.3. Nem …… 28

2.6. Adli Entomolojik Açıdan Sineklerin Önemi …… 28

2.6.1 Adli entomolojide sineklerin biyolojisi ……. 28

2.7. Adli Entomolojide Ölüm Zamanı Tespiti ……. 30

2.7.1 Ölüm zamanının belirlenmesi …… 31

2.7.2. Ölüm anında cesedin yerinin belirlenmesi …….. 33

2.7.3. Sinek larvası kullanılarak DNA analizleri …… 33

2.8. Toksikoloji Bilimi…….. 34

2.8.1 Adli toksikoloji bilimi ……. 34

2.8.2 Biyokimyasal toksikoloji …… 37

2.8.2.1. *İlaç ve zehirlerin organizmaya girişi, dağılımı ve atılması* …… 37

2.8.2.1.1. *Atılım* …… **37**

2.9. Adli Entomotoksikoloji Bilimi …… 38

2.9.1. Adli entomotoksikolojinin tarihçesi ……. 39

2.9.2. Adli entomotoksikolojinin adli bilimlerdeki önemi …….. 44

2.9.3. Postmortem ilaç redistribüsyonu …… 46

2.9.4. Karaciğer …… 46

2.9.5. Morfin …… 47

2.9.6. Amitriptilin …… 50

2.10. LC/MS/MS …… 52

2.11. Validasyon …… 55

2.11.1. Metot validasyonu …… 55

2.12. Metot Validasyonu Parametreleri: ……..... 56

2.12.1. Validasyon parametrelerinin belirlenmesi: …… 56

3. Gereç ve Yöntem …… 57

3.1. Gereç …… **57**

3.1.1. Adli Entomoloji Çalışmalarında Kullanılan Gereçler ……. 57

3.1.2. Adli Entomotoksikoloji Çalışmalarında Kullanılan Gereçler …… 58

3.2. Yöntem …… 60

3.2.1. Adli entomoloji çalışmalarında uygulanan yöntemler …… 60

3.2.1.1 ***Sinek kolonisinin devamlılığının sağlanması*** **…… 60**

3.2.1.2. ***Örnek hazırlama ve büyüme eğrileri oluşturma*** **…… 63**

3.2.1.2.1 *Morfin katılarak hazırlanmış ciğer ile beslenen örneklerin hazırlanması ve büyüme eğrilerinin oluşturulması* …… **63**

3.2.1.3. ***Amitriptilin katılarak hazırlanmış ciğer ile beslenen örneklerin hazırlanması ve büyüme eğrilerinin oluşturulması*** **…… 64**

3.2.2. Adli entomotoksikoloji çalışmalarında uygulanan yöntemler …… 72

3.2.2.1. ***Çalışma çözeltilerinin hazırlanması*** **…… 72**

3.2.2.2. ***Örnekleme ve örnek hazırlama*** **…… 74**

3.2.2.2.1. *Ciğer ve larvadan morfin analizi için örnek hazırlama ve büyüme eğrileri oluşturma* …… **74**

3.2.2.2.2. *Ciğer ve larvadan amitriptilin analizi için örnek hazırlama ve büyüme eğrileri oluşturma* …… **76**

3.2.2.3. ***Larva ve ciğer örneklerinden organik toksik maddelerin ekstraksiyon prosedürü*** …… **77**

3.2.2.4.*LC-MS-MS analizi* …… **84**

3.2.2.4.1. *Cihaz parametreleri* …… **85**

4. Bulgular …… **87**

4.1 Adli Entomoloji Çalışmalarına Ait Bulgular …… **87**

4.2. Adli Entomotoksikoloji Çalışmalarına Ait Bulgular …… **125**

4.2.1. Yöntemin optimizasyonu …… **125**

4.2.1.1.*Yöntemin validasyonu* …… **125**

4.2.1.1.1. *Validasyon parametreleri* …… **125**

4.2.1.1.2. *Morfin için yöntem validasyonu* …… **126**

4.2.1.1.3.*Standart çözeltilerde amitriptillin tayini için yöntemvalidasyonu* …… **131**

4.2.1.1.4. *Ciğerde amitriptillin tayini için yöntem validasyonu* …… **136**

4.2.1.1.5. *Larvada amitriptillin tayini için yöntem validasyonu* …… **147**

5. Tartışma ……..…… **160**

6. Sonuç……..**184**

8. Kaynaklar …… **188**

- Ekler …… **200**

Ek-1: Deneysel Hayvanlar Etik Kurulu Onay Raporu……..**200**

Ek-2:Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Proje Özet Raporu**…….201**

- Özgeçmiş …….202

Tablolar Listesi

Tablo I. Araştırmada kullanılan cihazlar ……**57**

Tablo II. Araştırmada kullanılan gereçler ……...**58**

Tablo III. Araştırmada kullanılan cihazlar ve gereçler ……...**58**

Tablo IV. Araştırmada kullanılan kimyasal maddeler ……**59**

Tablo V: Morfin analizi için pompa programı……..**85**

Tablo VI: Amitriptilin analizi için pompa programı…….....**85**

Tablo VII: Morfin ve Amitriptilinin MS-MS Parametreleri.……**86**

Tablo VIII: 5,00, 25,00, 100,00, 500,00, 750,00 ve 1000,00 $ngmL^{-1}$ standart çözeltileri kullanılarak, larvadan ekstraksiyon çalışması öncesinde çizilen kalibrasyon grafiğine ilişkin değerler……**129**

Tablo IX: Farklı günlerde çalışılmış olan ESMK ve EOMK larva örneklerine ilişkin geri kazanım sonuçları ESMK: Ekstraksiyon sonrası morfin katılmış, EÖMK: Ekstraksiyon öncesi morfin katılmış……**130**

Tablo X. Ekstraksiyon çalışmaları öncesinde hazırlanmış olan amitriptillin standart çözeltileri kullanılarak, Eurachem tarafından tavsiye edilen yöntemle LOQ değerinin bulunması için tayin edilen amitriptillin konsantrasyonlarına karşı bulunmuş olan %RSD değerleri (LOQ=5,00$ngmL^{1}$)……. **133**

Tablo XI. Amitriptilin standart çözeltileri kullanılarak, ekstraksiyon çalışmaları öncesinde çizilen kalibrasyon grafiğine ilişkin veriler……..**134**

Tablo XII. 750,00, 1000,00, 1500,00, 2000,00 ve 3000,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri kullanılarak, ekstraksiyon çalışmaları öncesinde çizilen kalibrasyon grafiğine ilişkin veriler..**135**

Tablo XIII. Ciğer matriksine ekstraksiyon öncesi 10,00, 50,00, 250,00, 750,00, 1500,00, 3000,00 ve 5000,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri katılması (EÖAK) ile bulunan pik alanları yardımıyla Eurachem tarafından tavsiye edilen yönteme göre LOQ değerinin bulunması için

katılan amitriptilin konsantrasyonlarına karşı bulunmuş olan % RSD değerleri (LOQ=25,00 $ngmL^{-1}$)……..**139**

Tablo XIV. Ciğer matriksine ekstraksiyon sonrası 10,00, 50,00, 250,00, 750,00 ve 1500,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri katılması (ESAK) ile bulunan pik alanları yardımıyla Eurochem tarafından tavsiye edilen yönteme göre LOQ değerinin bulunması için katılan amitriptilin konsantrasyonlarına karşı bulunmuş olan % RSD değerleri ….....**141**

Tablo XV. Ciğer matriksine ekstraksiyon öncesi 10,00, 50,00, 250,00, 750,00, 1500,00, 3000,00 ve 5000,00 $ngmL^{-1}$ konsantrasyonlarda amitriptilin katılması (EÖAK) ile amitriptilin tayin yöntemi için oluşturulmuş olan kalibrasyon grafiğine ilişkin değerler (NLOQ: 25,00 $ngml^{-1}$)…….**142**

Tablo XVI. Ciğer matriksine ekstraksiyon sonrası 10,00, 50,00, 250,00, 750,00, 1500,00, 3000,00, 5000,0 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltilerinin katılması (ESAK) ile amitriptilin tayin yöntemi için oluşturulmuş olan kalibrasyon grafiğine ilişkin veriler (LOQ: 10,00 $ngmL^{-1}$)……..**143**

Tablo XVII. Ciğerden ekstraksiyonu gerçekleştirilen her bir amitriptillin konsantrasyonuna ilişkin geri kazanım değerleri, bu değerlere göre hesaplanmış olan ortalama geri kazanım…**145**

Tablo XVIII.0,500 g ciğer matriksinde LC-MS/MS kullanılarak geliştirilmiş olan amitriptillin tayin yöntemi ile olay yeri simülasyonundan elde edilen 4 farklı konsantrasyondaki 117 saatlik ciğerde bulunan amitriptilin miktarları……**146**

Tablo XIX. Ciğer matriksine ekstraksiyon öncesi ve sonrasında amitriptilin katılarak hazırlanan grafiklerden faydalanılarak bilinmeyen örneklerin analiz sonuçlarına ilişkin hesaplanan belirsizlikler……**147**

Tablo XX. Larva matriksine ekstraksiyon öncesi 5,00, 10,00, 50,00, 250,00, 500,00 ve 1000,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri katılması (EÖAK) ile bulunan pik alanları yardımıyla

Eurachem tarafından tavsiye edilen yönteme göre LOQ değerinin bulunması için katılan amitriptilin konsantrasyonlarına karşı bulunmuş olan % RSD değerleri ……**150**

Tablo XXI. Larva matriksine ekstraksiyon sonrası 5,00, 10,00, 50,00, 250,00, ve 500,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri katılması (ESAK) ile bulunan pik alanları yardımıyla Eurachem tarafından tavsiye edilen yönteme göre LOQ değerinin bulunması için katılan amitriptilin konsantrasyonlarına karşı bulunmuş olan % RSD değerleri …….....**151**

Tablo XXII. Larva matriksine ekstraksiyon öncesi 5,00, 10,00, 50,00, 250,00, 500,00 ve 1000,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin katılması (EÖAK) ile amitriptillin tayin yöntemi için oluşturulmuş olan kalibrasyon grafiğine ilişkin veriler (LOQ:7,00 $ngml^{-1}$)…….....**153**

Tablo XXIII. Larva matriksine ekstraksiyon sonrası 5,00, 10,00, 50,00, 250,00, 500,00 ve 1000,00 ng mL^{-1} amitriptilin katılması (ESAK) ile amitriptillin tayin yöntemi için oluşturulmuş olan kalibrasyon grafiğine ilişkin değerler (LOQ: 6,00 $ngml^{-1}$)……**154**

Tablo XXIV: Larvadan ekstraksiyonu gerçekleştirilen her bir amitriptillin konsantrasyonuna ilişkin geri kazanım değerleri, bu değerlere göre hesaplanmış olan ortalama geri kazanım….**155**

Tablo XXV.0,500 g larva matriksinde LC-MS/MS kullanılarak geliştirilmiş olan amitriptilin tayin yöntemi ile olay yeri simülasyonundan elde edilen 4 farklı konsantrasyondaki 117 saatlik ciğer üzerinden elde edilen larvalarda bulunan amitriptilin miktarları……..**156**

Tablo XXVI. Larva matriksine ekstraksiyon öncesi ve sonrasında amitriptilin katılarak hazırlanan grafiklerden faydalanılarak bilinmeyen örneklerin analiz sonuçlarına ilişkin hesaplanan belirsizlikler……..**157**

Tablo XXVII. Yönteme ilişkin LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması……..**157**

Tablo XXVIII. Ciğer analizlerinden elde edilen amitriptilin konsantrasyonlarının, ölüm anındaki ciğer konsantrasyonunun bulunmasında kullanılması için gerekli faktörlerin bulunması……**158**

Tablo XXIX. Larva analizlerinden elde edilen amitriptilin konsantrasyonlarının, ölüm anındaki ciğer konsantrasyonunun bulunmasında kullanılması için gerekli faktörlerin bulunması.....**159**

Şekiller Listesi

Şekil 1: *Lucilia sericata* ergin sinekleri……**19**

Şekil 2: *Lucilia sericata* ergin sineğinin morfolojisi (vücut kısımları)……**20**

Şekil3: *Lucilia sericata* dişi sineğinin beslenmesi……**21**

Şekil4: *Lucilia sericata* ergin sineklerin çiftleşmesi……..**22**

Şekil 5: *Lucilia sericata* dişi sineğinin yumurta bırakması……**23**

Şekil6: *Lucilia sericata* larvasının deri değişimi…….....**23**

Şekil 7: *L.sericata* 3. evre larvada solunum yarıkları……**24**

Şekil 8: *L.sericata* 3. evre larvada sklerit ve ön stigma……**24**

Şekil 9: *L.sericata* pupası……**25**

Şekil 10: Pupadan yeni çıkmış *L.sericata* sineği……..**26**

Şekil 11: *L.sericata* sineklerinin bulunduğu laboratuvar……...**61**

Şekil 12: Erişkin *L.sericata* sineklerinin yaşadığı kafesler……**62**

Şekil 13: Erişkin *L.sericata* sineklerinin yaşadığı kafesin yakından görünümü……**62**

Şekil 14: Ergin L.sericata sineklerinin yaşadığı kafesin içten görünümü……**66**

Şekil 15: Sinek kafesine yumurta almak için bırakılan ciğer……**66**

Şekil 16: *L. sericata* yumurtalarının bırakıldığı ciğer……**67**

Şekil17: *L.sericata* yumurtaları……**67**

Şekil 18: Deneylerde ortam olarak kullanılan taze tavuk ciğer……**68**

Şekil 19: Ciğerlerin karıştırıcıda parçalanması……**68**

Şekil 20: Ciğerler karıştırıcıda parçalanarak homojen hale getirilmektedir……..**69**

Şekil 21: Homojenize edilmiş ciğer……**69**

Şekil 22: 400 *L. sericata* yumurtasının aktarıldığı homojenize edilmis ciğer……**70**

Şekil 23: Talaşlı ortama bırakılan, 400 *L. sericata* yumurtasının aktarıldığı homojenize edilmiş ciğer……...**70**

Şekil 24: *L. sericata* yumurta ve larvalarının hava alması için tül ile kaplanmış yaşam ortamları……**71**

Şekil 25: *L. sericata* larvalarının yaşadığı ve beslendiği çürümüş ciğer……**71**

Şekil 26: *L. sericata* larvalarının yaşadığı ve beslendiği çürümüş ciğer……**72**

Şekil 27: Toksikolojik analiz için larvaların distile su ile yıkanması……**79**

Şekil 28: Toksikolojik analiz için larvaların distile su ile yıkanıp kurutulmuş larvalar……**79**

Şekil 29: Toksikolojik analizde kullanılan 0.5 g larva (Beslenen 3. evre larvalar)……**80**

Şekil 30: Larvadan amitriptilin, morfin ekstraksiyonu için homojenize edilmiş karışımlar…..**80**

Şekil 31: Larvadan amitriptilin ve morfin ekstraksiyonu için homojenize edilmiş karışımların vortekslenmesi……..**81**

Şekil 32: Çalkalama ve santrifüj işlemlerinden sonra organik fazları alınacak karışımlar……**81**

Şekil 33: Azot gazı altında uçurulmuş karışımlar……**82**

Şekil 34: Ekstraktın süzülerek viallere aktarılışı…….....**82**

Şekil 35: ESI LC-MS\ MS cihazında analiz edilecek vialler…….....**83**

Şekil 36: LC-MS\MS'de amitriptilin ve morfin tayini……..**83**

Şekil 37: LC-MS\MS cihazı……..**84**

Şekil 38: *L.sericata* ergin sineklerinin çiftleşmesi……**87**

Şekil 39: *L.sericata* dişi sineğinin yumurta bırakması……...**88**

Şekil 40: *L.sericata* dişi sineğinin posteriorundan yumurta bırakılması…….**88**

Şekil 41: *L.sericata* dişi sineğinin posteriorundan yumurta bırakılması…….**89**

Şekil 42: *L.sericata* dişi sineğinin yumurta bırakması……**89**

Şekil 43: *L.sericata* dişi sineğinin yumurta bırakması……**90**

Şekil 44: *L.sericata* dişi sineğinin beslemesi……..**90**

Şekil 45: *L.sericata* sineklerinin ciğer üzerine yumurta bırakmaları, ciğer ile beslenmeleri..**91**

Şekil 46: Ciğer üzerine bırakılmış *L.sericata* yumurtaları……....**91**

Şekil 47: 400 *L. sericata* yumurtasının aktarıldığı ciğer……**92**

Şekil 48: *L. sericata'* ya ait olgunlaşmış yumurtalar…….**92**

Şekil 49: *L. sericata'* ya ait olgunlaşmış yumurtalar……..**93**

Şekil 50: *L. sericata* yumurtalarından 1. evre larva çıkışı……...**93**

Şekil 51: *L. sericata* 1. evre larva……...**94**

Şekil 52: *L. sericata* 1. evre larvanın besine ilerleyişi……**94**

Şekil 53: *L. sericata* boş yumurtaları…….**95**

Şekil 54: *L. sericata* 1. evre larva……...**95**

Şekil 55: *L. sericata* 1. evre larvaya ait solunum yarıkları…….**96**

Şekil 56: *L. sericata* 2. evre larva……...**96**

Şekil 57: *L. sericata* larvalarının ciğer içinde beslenmeleri……**97**

Şekil 58: *L. sericata* 2. evre larvaya ait solunum yarıkları……**97**

Şekil 59: *L. sericata* 2. evre 'den 3. evreye geçişte solunum yarıkları ……**98**

Şekil 60: *L. sericata* 2. evre 'den 3. evreye geçerken deri değişimi ……**98**

Şekil 61: *L. sericata* 2. evre 'den 3. evreye geçişte solunum yarıkları …….**99**

Şekil 62: *L. sericata* 2. evre 'den 3. evreye geçişte solunum yarıkları ……...**99**

Şekil 63: *L. sericata* 2. evre larvadan 3. evre larvaya geçerken deri değişimi…….....**100**

Şekil 64: *L. sericata* 2. evre larvadan 3. evre larvaya geçerken deri değişimi……**100**

Şekil 65: *L. sericata* 2. evre larvadan 3. evre larvaya geçerken deri değişimi…….**101**

Şekil 66: *L. sericata* 2. evre larvadan 3. evre larvaya geçerken deri değişimi……**101**

Şekil 67: *L. sericata* 3. evre larvaya ait solunum yarıkları…….....**102**

Şekil 68: *L. sericata* 3. evre larvaya ait solunum yarıkları……....**102**

Şekil 69: *L. sericata* 3. evre larvaya ait solunum yarıkları……**103**

Şekil 70: *L. sericata* beslenen 3. evre larva……**103**

Şekil 71: *L.sericata* 3. evre larvada siklerit ve ön stigma……**104**

Şekil 72: *L. sericata* beslenen 3. evre larva……**104**

Şekil 73: *L. sericata* beslenen 3. evrenin deri değişimi……**105**

Şekil 74: *L. sericata* gezici evre larva ……...**105**

Şekil 75. *L. sericata* larvasının deri değişimi……..**106**

Şekil 76: Talaşa geçen *L.sericata* 3. evre larvaları…….....**106**

Şekil 77: Beslenme sonrası ciğerin durumu…….....**107**

Şekil 78: Talaşa geçen*L.sericata* 3. evre larvalarının pupa öncesi görünümü…….**107**

Şekil 79: Talaşa geçen*L.sericata* 3. evre larvalarının pupa öncesi renk değişimi…….**108**

Şekil 80: *L.sericata* gezici larvanın pupa olurken renk değişimi…….**108**

Şekil 81: Gezici *L.sericata* larvasının pupaya dönüşümü……**109**

Şekil 82: *L.sericata* pupaları (genç pupalar)……**109**

Şekil 83: *L.sericata* pupaları……...**110**

Şekil 84: *L.sericata* pupasındaki solonum yarıkları……**110**

Şekil 85: *L.sericata* pupaları……...**111**

Şekil 86: *L. sericata*' ya ait Pupa…….**111**

Şekil 87: *L. sericata* pupasından sinek çıkışı……...**112**

Şekil 88: *L. sericata* pupasından sinek çıkışı……..**112**

Şekil 89: *L. sericata* pupasından sinek çıkışı……..**113**

Şekil 90: *L. sericata*' ya ait pupa içinde sineğin duruşu……..**113**

Şekil 91: Pupadan yeni çıkmış *L.sericata* sineği (kül renginde, kanatları buruşuk)……**114**

Şekil 92: Pupadan yeni çıkmış kül rengi *L. sericata* sineği…….**114**

Şekil 93: Orjinal rengini almış *L. sericata* sineği……**115**

Şekil 94: *L. sericata* sineğinin abdomeni (karnı)…….**115**

Şekil 95: *L. sericata* sineğinin kanatları……..**116**

Şekil 96: *L. sericata* sineği…….....**116**

Şekil 97 (a): *L.sericata* larvalarının ortalama ağırlık ve ortalama boy uzunluklarının saatlere göre karşılaştırılması……...**118**

Şekil 97 (b): *L.sericata* larvalarının ortalama ağırlık ve ortalama boy uzunluklarının büyüme evrelerine göre karşılaştırılması……...**118**

Şekil 98 (a): Boş ciğer (Kimyasal madde katılmamış ciğer) ile beslenen *L.sericata* larvalarının ortalama ağırlığı (g)…….....**119**

Şekil 98 (b): Boş ciğer (Kimyasal madde katılmamış ciğer) ile beslenen *L.sericata* larvalarının ortalama boy uzunlukları (mm)……...**120**

Şekil 98 (c): Boş ciğer (Kimyasal madde katılmamış ciğer) ile beslenen *L.sericata* larvalarının ortalama boy uzunluklarının (mm) ve ortalama ağırlıklarının (g) karşılaştırılması…….**121**

Şekil 99 (a): Amitriptilin katılarak hazırlanmış ciğer ile beslenen *L.sericata* larvalarının ortalama ağırlıkları (g) ……**122**

Şekil 99 (b): Amitriptilin katılarak hazırlanmış ciğer ile beslenen *L.sericata* larvalarının ortalama boy uzunlukları (mm) ……...**122**

Şekil 99 (c): Amitriptilin katılarak hazırlanmış ciğer ile beslenen *L.sericata* larvalarının ortalama boy uzunluklarının (mm) ve ortalama ağırlıklarının (g) karşılaştırılması……..**123**

Şekil 100: Amitriptilin katılarak hazırlanmış ciğer ve boş ciğer ile beslenen *L.sericata* larvalarının ortalama ağırlıklarının (g) karşılaştırılması…….....**124**

Şekil 101: Amitriptilin katılarak hazırlanmış ciğer ve boş ciğer ile beslenen *L.sericata* larvalarının ortalama boy uzunluklarının (mm) karşılaştırılması…….**125**

Şekil 105: Metanol çözücüsüne ilişkin morfin kanalında gözlenen kromatogram (a), 1000,0 $ngmL^{-1}$ konsantrasyonda morfin içeren metanolde gerçekleştirilen analiz sonucu gözlenen morfin piki (b)……**126-127**

Şekil 106: Madde ilave edilmemiş ciğerle beslenmiş boş larvada morfin kanalında gözlenen kromatogram (a)., 7,5 morfin ilave edilmiş ciğer yemiş larvada gerçekleştirilen analiz sonucu gözlenen morfin piki (b)……...**127-128**

Şekil 107: 5,00, 25,00, 100,00, 500,00, 750,00 ve 1000,00 $ngmL^{-1}$ morfin standart çözeltileri kullanılarak, larvadan ekstraksiyon çalışması öncesinde çizilen kalibrasyon grafiği……**129**

Şekil 108: Metanol çözücüsüne ilişkin amitriptillin kanalında gözlenen kromatogram (a), ciğerden ekstraksiyon çalışması öncesinde hazırlanmış olan, 500,0 $ngmL^{-1}$ amitriptillin standart çözeltisinde gerçekleştirilen analiz sonucu gözlenen amitriptillin piki (b)……...**131-132**

Şekil 108. Ekstraksiyon çalışmaları öncesinde hazırlanmış olan 5,00, 10,00, 50,00 100,00 250,00, 500,00 ve 750,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri kullanılarak, Eurachem tarafından tavsiye edilen yöntemle LOQ değerinin bulunması için çizilen amitriptilin konsantrasyonlarına karşı % RSD grafiği (LOQ=5,00 $ngmL^{-1}$) ……**133**

Şekil 109: 5,00, 10,00, 50,00, 100,00, 250,00, 500,00 ve 750,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri kullanılarak, ekstraksiyon çalışmaları öncesinde çizilen kalibrasyon grafiği…….**135**

Şekil 110: 750,00, 1000,00, 1500,00, 2000,00, 3000,00 $ngmL^{-1}$ amitriptillin standart çözeltiler kullanılarak, ekstraksiyon çalışmaları öncesinde çizilen kalibrasyon grafiği……...**136**

Şekil 111: Ekstraksiyon öncesi (a) ve ekstraksiyon sonrası katım yapılmış olan, 750,00 $ngmL^{-1}$ konsantrasyondaki amitriptillin ciğer ekstraktları (b) ve bunların blank kromatogramı (c)……**137**

Şekil 112: C2 $ngmL^{-1}$ konsantrasyondaki amitriptillin katılmış olan ve larvaların üzerinden yediği ciğerden alınan örneğin ekstraktının (a) ve blank ekstraktın kromatogramı (b)……**138**

Şekil 113: Ciğer matriksine ekstraksiyon öncesi 10,00, 50,00, 250,00, 750,00, 1500,00, 3000,00 ve 5000,00 ng mL^{-1} amitriptilin standart çözeltileri katılması (EÖAK) ile bulunan pik alanları yardımıyla Eurochem tarafından tavsiye edilen yönteme göre LOQ değerinin

bulunması için katılan amitriptilin konsantrasyonlarına karşı çizilen % RSD grafiği (LOQ=25,00 ngmL^{-1}) …….....**140**

Şekil 114: Ciğer matriksine ekstraksiyon sonrası 10,00, 50,00, 250,00, 750,00 ve 1500,00 ngmL^{-1} amitriptilin standart çözeltileri katılması (ESAK) ile bulunan pik alanları yardımıyla Eurachem tarafından tavsiye edilen yönteme göre LOQ değerinin bulunması için katılan amitriptilin konsantrasyonlarına karşı çizilmiş olan % RSD grafiği ……..**141**

Şekil 115: Ciğer matriksine ekstraksiyon öncesi 10,00, 50,00, 250,00, 750,00, 1500,00, 3000,00 ve 5000,00 ng mL^{-1} konsantrasyonlarda amitriptilin katılması (EÖAK) ile amitriptilin tayin yöntemi için oluşturulmuş olan kalibrasyon grafiği (LOQ: 25,00 ng mL^{-1})……**143**

Şekil 116: Ciğer matriksine ekstraksiyon sonrası 10,00, 50,00, 250,00, 750,00, 1500,00, 3000,00 ve 5000,00 ngmL^{-1} amitriptilin standart çözeltilerinin katılması (ESAK) ile amitriptilin tayin yöntemi için oluşturulmuş olan kalibrasyon grafiği (LOQ: 10,00 ngml^{-1})……..**144**

Şekil 117: Ekstraksiyon öncesi (a) ve ekstraksiyon sonrası katım yapılmış olan, 500,00 ngmL^{-1} konsantrasyondaki amitriptillin larva ekstraktları (b) ve blank larva kromatogramı (c)……**148**

Şekil 118: 250,00 g ciğereC2=750000,00 ng amitriptillin katılmış olan ciğerden yemiş larva ekstraktının (a) ve larva blank ekstraktın kromatogramı (b)……**149**

Şekil 119: Larva matriksine ekstraksiyon öncesi 5,00, 10,00, 50,00, 250,00 ve 500,00 ngmL^{-1} amitriptilin standart çözeltileri katılması (EÖAK) ile bulunan pik alanları yardımıyla Eurachem tarafından tavsiye edilen yönteme göre LOQ değerinin bulunması için katılan amitriptilin konsantrasyonlarına karşı çizilmiş olan % RSD grafiği …….....**151**

Şekil 200: Larva matriksine ekstraksiyon sonrası 5,00, 10,00, 50,00, 250,00 ve 500,00 ngmL^{-1} amitriptilin standart çözeltileri katılması (ESAK) ile bulunan pik alanları yardımıyla Eurachem tarafından tavsiye edilen yönteme göre LOQ değerinin bulunması için katılan amitriptilin konsantrasyonlarına karşı çizilmiş olan %RSD grafiği ……...**152**

Şekil 201: Larva matriksine ekstraksiyon öncesi 5,00, 10,00, 50,00, 250,00, 500,00 ve 1000,00 $ngmL^{-1}$ amitriptillin katılması (ESAK) ile amitriptilin tayin yöntemi için oluşturulmuş olan kalibrasyon grafiği (LOQ: 7,00 $ngml^{-1}$)……..**152**

Şekil 202: Larva matriksine ekstraksiyon sonrası 5,00, 10,00, 50,00, 250,00, 500,00 ve 1000,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin katılması (ESAK) ile amitriptilin tayin yöntemi için oluşturulmuş olan kalibrasyon grafiği (LOQ:6,00 $ngml^{-1}$)……**154**

Kısaltmalar

cm: Santimetre

°C: Santigrat (Derece)

C_0: Kontrol örneği

C_1 : 1. Konsantrasyon

C_2 : 2. Konsantrasyon

C_3 : 3. Konsantrasyon

C_4 : 4. Konsantrasyon

CAD: Collisionally Activated Dissociation

dk: dakika

ESMK: Ekstraksiyon Sonrası Morfin Katılmış

EÖMK: Ekstraksiyon Öncesi Morfin Katılmış

ESAK: Ekstraksiyon Sonrası Amitriptilin Katılmış

EÖAK: Ekstraksiyon Öncesi Amitriptilin Katılmış

ESI: Elektron Sprey İyonizasyon sistemi

g: Gram

GC-MS: Gas chromatography -Mass Spectrometry

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography

mg: Miligram

ml: Mililitre

mm: Milimetre

m/z : kütle/yük

MRM: Multi Reaction Monitoring (Çoklu Reaksiyon İzleme)

kg: Kilogram

L: Litre

LOD: Limit Of Detection (Tayin Limiti)

LOQ: Limit Of Quantitation (Ölçüm Limiti)

L.sericata: *Lucilia sericata*

LC-MS/MS: Liquid Chromatography Coupled with tandem Mass Spectrometry

ng: Nanogram

µg: Mikro gram

pH: Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesini tarif eden ölçü birimi

PMI: Post- Mortem Interval

RIA: Radyo İmmuno Assey yöntemi

rt : Maddenin alıkonma süresi

Q_1: Quadrupol

SOP: Strateji Oluşturma Planı

µL: Mikro Litre

NaCl: Sodyum Klorür

mM: miliMolar

%RSD: Yüzde Bağıl standart Sapma (Relative Standard Deviation)

%u_{rel}: Yüzde Bağıl Belirsizlik

2E+07: 2.10^7

u_t: Tekrarlanabilirliğe ilişkin bağıl belirsizlik

n: Deney sayısı

s: Kalibrasyon grafiğindeki tüm noktaların ortalama standart sapması

b: Eğrinin eğimi

p: Tek konsantrasyondaki bilinmeyen örneğin analiz tekrarı

n: Kalibrasyon eğrisi için gerçekleştirilen toplam deney sayısı

yada

n: Kalibrasyon grafiğindeki tüm noktalara ait tekrarların toplamı

x_{pred}: Bilinmeyene ilişkin tahmin edilen konsantrasyon

x_i: Her bir kalibrasyon düzeyinin konsantrasyonu

x_{ort}: Kalibrasyon standartlarının ortalama konsantrasyonu

Özet

Adli bir olayın aydınlatılması için ceset önemli bir delildir. Ölümden sonra çürümenin gelişmesiyle orantılı olarak toksikolojik analiz için gerekli organik sıvı ve dokulardan yararlanmak zorlaşabilir veya gerekli biyolojik materyal bulunamayabilir. Bu gibi durumlarda; böcekleri kullanarak toksik maddeleri belirleyen ve toksik maddelerin böcek gelişimine etkilerini araştıran, entomoloji ve toksikoloji disiplinlerinin bir araya gelerek oluşturdukları entomotoksikoloji biliminden yararlanılır. Adli Entomotoksikoloji; cesede ait doku ve vücut sıvısı yokluğunda, cesetlerle beslenen böceklerdeki toksik maddeleri kalitatif ve kantitatif metotlar ile tespit ederek, şüpheli ölümlerin nedenlerini araştırır. *L.sericata* larvaları bu çalışmada toksikolojik analizler için ortam (besiyeri) olarak tercih edilmiştir. Türkiye'deki adli vakalarda sıklıkla karşılaşılan bir uyuşturucu türü ve opiatların temel metaboliti olan morfin (3,6-dihidroksi-4,5-epoksi-17-metilmorfinan-7-en) ($C_{17}H_{19}NO_3$) ve amitriptilin (3- (10,11-dihidro-5H-dibenzo [a, d] siklohepten-5-iliden) -N, N-dimetil-1-propanamin) ($C_{20}H_{23}N$), bu araştırmada adli toksikolojik metotlar ile tayin edilecek maddeler olarak seçilmiştir. Homojenize edilmiş ciğere terapatik, toksik ve potansiyel letal dozda morfin veya amitriptilin katılmıştır. Morfin ve amitriptilin içeren doku ile beslenen *Lucilia sericata* larvalarından morfin ve amitriptilin ekstrakte edilerek LC/MS-MS' de toksikolojik analizi yapılmıştır. Amitriptilin ve morfin tüm larva örneklerinde tespit edilmiştir. Bu bilgi, larvanın kalitatif toksikolojik analizde kullanılabileceğini göstermektedir. Larvada tespit edilen kantitatif konsantrasyonda amitriptilin ciğerdeki amitriptilin konsantrasyonu ile ilişkili olarak tespit edilmiştir Morfin için gerikazanımlar tekrarlanabilir özellikte değildir. Fakat oluşturulan metod yardımı ile dokuda morfin kalitatif olarak tespit edilebilir.

Yaptığımız araştırma, zengin bir faunaya sahip olan ülkemizde, ortaya çıkan pek çok zehirlenme vakası sonucunda ölen kişilerin ölüm zamanı ve nedenlerini belirlemek için sinek

larvalarından yararlanarak entomotoksikolojik bilgiler ile adalet sistemine ve yargıya hizmet etme amacındadır. Bu çalışma, adli bilimlere yeni bir yöntem sunacaktır.

Anahtar Kelimeler: Entomotoksikoloji, trisiklik antidepresan, opiatlar, adli entomoloji, *Lucilia sericata*, larva

Summary

The body is important proof for solving a forensic judicial case. The goal of this presentation is to demonstrate the reliability of insect larvae as samples for toxicological investigations and to compare the methods that was developed in larvae and liver samples. Analytical entomotoxicology is a basic area of forensic toxicology, where a few studies exist in literature. The aim of this study is to evaluate the use of insects as alternative specimens for toxicological evidence. For this purpose, larvae of *Lucilia sericata* were reared on samples of minced chicken liver treated with different concentrations of amitriptyline and morphine; regarding therapeutic, toxic, and potentially lethal doses. A method was developed for amitriptyline determination in larvae and liver and morphine detection in larvae. Amitriptyline and morphine was detected in all tested larvae samples, confirming the reliability of these specimens for qualitative toxicology analysis. Quantitative concentrations of amitriptyline measured in larvae were correlated with levels in liver tissue. The recoveries for morphine was not repeatable, the method could only be used to detect this drug qualitatively. These observations bring new elements regarding the potential use of drug analysis in larvae for estimation of drug levels in human tissues.

This research purposes to determine PMI, reasons of death that died because of drug poisoning, using fly larvaes. Also this research offer a new method to forensic science.

Key Words: Entomotoxicology, tricyclic antidepressants, opiates, forensic entomology, *Lucilia sericata*, larvae

1. Giriş ve Amaç

Adli bilimler; adaletin tesisinde büyük rol oynayan, birçok uzmanlık alanı ile ortak çalışan önemli bir bilim dalıdır. Adli bilimler, adli ve idari soruşturmalar sırasında elde edilen maddi delillerin incelenmesi ve değerlendirilmesi suretiyle, suç ve suçlunun saptanması ve kanıtlanmasında yürütülen teknik hizmetlere verilen bir addır. Adli bilimler, adaletin tecellisi amacı ile yararlanılan tüm bilim dallarını kapsar.

Adli bilimler, olay yerinde başlar. Olay yeri, suçun gerçekleştiği ve bu suç ile ilgili delillerin bulunduğu yerdir. Locard Prensibi ' Her temas bir iz bırakır' anlayışıyla deliller eksiksiz ve büyük bir titizlikle toplanmalı ve incelenmelidir.

Adli bir olayın aydınlatılması için ceset önemli bir delildir. Bazen ceset tek başına yeterli olamayacağı gibi, bazı durumlarda olayın gerçekleşme zamanı veya yeri ya da oluş nedeniyle ilgili bilgiler vermeyebilir. Bu durumlarda diğer adli bilim dallarından yararlanmak gerekir. Bu bilimlerden birisi de Adli Entomolojidir.

Böceklerin yaşamı ve çevreleri ile olan ilişkilerini inceleyen bilim dalına entomoloji denilmektedir. Ölüm sonrası birkaç dakika gibi kısa bir süre içinde cesede belirli bir sırayla (cesedin durumuna göre) gelen ve yumurtalarını bırakıp giden bir seri böceği inceleyerek, kişinin ölüm zamanını ve kişinin ölüm yeri hakkında veriler ortaya koyan bilim dalına ise adli entomoloji veya medikokriminal entomoloji denir. Yapılan araştırmalar, böcek türünün beslenmek için cesede belirli bir sırayla geldiklerini göstermektedir (1). Bu sırayı böceklerin beslenme rejimi, cesedin durumu (çürüme evreleri) ve cesetten çıkan koku belirlemektedir. Adli entomolojik çalışmalarda en çok yararlanılan evre larva evresidir. Larva boyu ve ağırlığı ölümden sonra geçen zaman hesaplanmasında kullanılmaktadır (2).

Adli vakaların çözümünde kullanılan diğer bir bilim dalı ise zehir ve zehirlenme bilgisini adli amaçlar doğrultusunda kullanan adli toksikolojidir. Adli toksikoloji için en önemli delil mağdurdan alınan vücut sıvısı ve dokularıdır. Fakat ölümden sonra çürümenin gelişmesiyle

orantılı olarak toksikolojik analiz için gerekli organik sıvı ve dokulardan yararlanmak zorlaşabilir veya gerekli biyolojik materyal bulunamayabilir (3). Bu gibi durumlarda; böcekleri kullanarak toksik maddeleri belirleyen ve toksik maddelerin böcek gelişimine etkilerini araştıran, entomoloji ve toksikoloji disiplinlerinin bir araya gelerek oluşturdukları entomotoksikoloji biliminden yararlanılır (4).

Adli Entomotoksikoloji; cesede ait doku ve vücut sıvısı yokluğunda, cesetlerle beslenen böceklerdeki toksik maddeleri kalitatif ve kantitatif metotlar ile tespit ederek, şüpheli ölümlerin nedenlerini araştırır (4,5). Larvada herhangi bir ilaç tespit edildiğinde, bu ilacın larvanın beslendiği cesetten geldiği bilinmelidir (5,6). Çünkü ilaç veya zehirlerin larvalarda biriktiği ve absorbe olan miktarları eliminasyon oranını geçtiğinde kantitatif olarak tespit edilebileceği gösterilmiştir (7,8,9). Kintz, 'maggotlarda toksikolojik araştırmalara başvuruların kesinlikle artacağı, bu analizler için canlı materyallerinin kullanılmasının her zaman daha uygun olacağı ve daha iyi sonuçlar elde edileceği' sonucuna varmıştır (7,10,11). Ayrıca adli entomotoksikoloji, ölüm sonrası zamanın (PMI) doğru hesaplanmasına yardımcı olur (6,9).

Adli Entomolojide en çok yararlanılan böcek türünün, ölümden sonra cesede ilk gelen sineklerden biri olan *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) olduğu, yapılan çalışmalar ile gösterilmektedir (12,13). Larvaların cesetler üzerinde bulunuşları ve burada geçirdiği zaman kriminal açıdan, olayın aydınlatılması için oldukça önem kazanmaktadır. Ayrıca hayat döngülerine ait bilgilerin daha rahat elde edilmesi, dünyanın her tarafına yayılmaları, birey sayısının fazla olması, kokuyu çabuk algılamaları, PMI'nin çoğu evresinde bulunmaları (ilk 4 evre) ve beslenme rejimlerinin çeşitliliği gibi özelliklerinden dolayı, *L.sericata* larvaları bu çalışmada toksikolojik analizler için güvenilir bir ortam (besiyeri) olarak tercih edilmiştir.

Türkiye'deki adli vakalarda sıklıkla karşılaşılan bir uyuşturucu türü ve opiatların temel metaboliti olan morfin (3,6-dihidroksi-4,5-epoksi-17-metilmorfinan-7-en) ($C_{17}H_{19}NO_3$) ve Amitriptilin (3-(10,11-Dihydro–5*H*-dibenzo[*a*,*d*]cyclohepten–5–ylidene)-*N*,*N*-dimethyl–1–

propanamine) ($C_{20}H_{23}N$) bu araştırmada adli toksikolojik metotlar ile tayin edilecek maddeler olarak seçilmiştir.

Ükemizde adli bilimlere bir basamak teşkil etmesi açısından yapılan bu çalışmada;

1. Opiat toksikasyonuna maruz kalan dokularla beslenen *Lucilia sericata* larvaları (1., 2., 3. evre larvaları)' nın toksikolojik analizlerde güvenilir ortam (besiyeri) olarak kullanılabileceğini ortaya koymak,

2. Larvalardaki morfin veya amitriptilin seviyeleri ile örnek dokulardaki morfin veya amitriptilin konsantrasyonları arasında korelasyon olup olmadığını belirlemek,

3. Normal doku (Kimyasal madde katılmadan hazırlanan örnek) ile morfin veya amitriptilin içeren doku ile beslenen *Lucilia sericata'*nın büyüme evrelerini karşılaştırmak,

Amaçları ile bu çalışma planlanmıştır. Yapılan bu araştırma, zengin bir faunaya sahip olan ülkemizde, ortaya çıkan pek çok zehirlenme vakası sonucunda ölen kişilerin ölüm zamanı ve nedenlerini belirlemek için sinek larvalarından yararlanarak entomotoksikolojik bilgiler ile adalet sistemine ve yargıya hizmet etme amacındadır.

Larvaları toksikolojik analizlerde kullanarak yeni bir metot geliştirmek ve adli bilimlere farklı bir bakış açısı kazandırmak amacıyla, yapılan bu entomotoksikolojik araştırma öncü ve orijinal bir çalışmadır. Bu çalışma sonrasında, gerçek anlamda entomotoksikolojinin, adli bilimlerde bir bilim dalı olarak gelişmeye başlaması, beklenmektedir. Adaletin sağlanması için başka delillerin yanında entomolojik ve entomotoksikolojik bulgularınında kullanılması daha kesin sonuçların elde edilmesini sağlayacaktır.

2. Genel Bilgiler

Adli Bilimler, herhangi bir suçun kanıtlanıp hukukun uygulanmasında tüm bilimsel ve teknolojik uygulamaları inceleyen multidisiplinel bir alandır. Bilim ve teknolojinin her geçen gün ilerlemesiyle birlikte bünyesine yeni alanlar katmaktadır. Adli Entomoloji ve Adli Entomotoksikoloji, Adli Bilimler içerisinde yer alan ve gelişmekte olan bilim dallarıdır (5,6,8,14,15).

2.1. Adli Entomoloji

Adli entomoloji; eklembacaklı grubuna (böcekler) ait bilgileri adaletin hizmetine sunan adli bilimler alanıdır. Adli entomolog, adli vakaları çözebilmek için böceklere ait bilgileri kullanan bilim adamıdır. İnsan ve hayvan cesetlerinde, sinekler veya larvalar her zaman bulunmuştur (15). Ölüm zamanının bilinmesi, on dokuzuncu yüzyıldan günümüze adli entomolojinin esas ilgi alanlarından biri olmuştur (16).

Adli entomoloji bilimi; cinayet, tecavüz, intihar vb. gibi adli vakalarda cesedin bulunduğu ve ölümün gerçekleştiği zaman arasında geçen sürenin tahmin edilmesinde; böceklerin teşhis edilmeleri, biyolojileri, davranışları, ekolojileri ve hayat döngüleri ile ilgili bilgilerin kullanılması olarak tanımlanmaktadır. Adli entomolojik delillerin yorumlanması ile ölüm sonrası zaman, ölüm nedeni ve ölümün gerçekleştiği ortam hakkında sonuçlara varılır (17-20). Adli bilimlerin bir dalı olan Adli Entomoloji, bütün böcek delillerini inceler. Böcekler, hem karada hem de suda gerçekleşen olay yeri incelemesinde kullanılabilir. Pek çok yıldır, cesedin gözlerinde, ağzında, burnunda ve yaralarında bulunan kurtçuklar; çürümenin tiksindirici bir öğesi olduğu düşünülürdü. Cesetler, genellikle yıkandıktan sonra otopsi masasına konulurdu. Adli bilimlerde balistik, ateşli silah muayenesi, ısırık izleri, atış artıkları, kan lekesi model analizi ve suç biliminin diğer disiplinleri çalışılıp geliştirilirken, ölüm yeri ile birlikte böcekler ihmal edilirdi (6, 17, 18).

Fakat böcekler ile ceset arasındaki yakın ilişki ve medikokriminal incelemelerde böceklerin kullanımı, adli entomolojinin önemini ortaya koymuştur. Adli Entomoloji, belli başlı üç alt bölümde incelenmektedir.

- Kentsel entomoloji, insanların yaşadığı çevrelerde, termitler, hamamböcekleri ve diğer böcek türleri sebebiyle ortaya çıkan bir takım problemleri inceler.
- Depolanmış ürün entomolojisi, arthropodlar (eklembacaklılar) ile arthropod parçalarının gıda ve diğer ürünlerde bulunması sonucu ortaya çıkan anlaşmazlıkları inceler. Kahvaltılık yiyeceklerde böcek kalıntıları veya fast-food restaurantlardaki sandviçlerde bulunan sinek larvaları bu alanda en sık görülen dava konularına örnek gösterilebilir. Narkotiklerde depolanmış ürünler içerisinde sayılabilir. Yasa dışı psikoaktif maddeler sıklıkla bir ülkede yapılıp başka bir ülkede satılırlar. Narkotiklerin beraberinde bulunan böceklerin türleri incelendiğinde bunların hangi coğrafyaya ait olduğu bulunabilir. Dolayısıyla da uyuşturucu maddenin menşei tayininde araştırmacılara yardımcı olabilir (21).
- Çoğunluğu şiddet suçları olmakla birlikte suçların çözümünde eklembacaklı (arthropod) delillerinin kullanımına odaklanan bir diğer alan ise *"medikolegal entomoloji"* veya "*adli medikal entomoloji*" olarak adlandırılır (2,22,23).

Adli entomoloji, ölümden sonra geçen zamanın hesaplanması, ölüm yerinin belirlenmesi ve toksikolojik çalışmaları ile adli bilimlere yardımcı olur. Başkalaşım geçiren böceklerin, özellikle de tam başkalaşım geçiren (holometabol) böceklerin yumurta, larva evreleri, nimfleri ve ergin bireylerinin her biri adli vakaları aydınlatmada büyük öneme sahiptir. Türü tespit edilen bir böceğin, erginlik öncesinde tüm büyüme evrelerinin süreleri, entomolojik olarak bilinir ve bu bilgiler adli bilimler tarafından kullanıldığı zaman, gerçekleşen adli vakalar ile ilgili birçok soruyu cevaplayabilecek nitelikte kriminal bilgilere ulaşılır (21).

Özellikle Diptera (sinekler) takımından böceklerin erginlik öncesi larva gelişim verileri adli entomoloji çalışmalarında önemlidir. Coleoptera (kın kanatlılar) ve Lepidoptera (pul kanatlılar) takımından böceklerin cesede geliş zamanları ise uzun süreli ölüm zamanı tahminlerinde kullanılmaktadır (24-28).

Farklı türdeki böcekler kendi yaşamlarına uygun iklim ve bitki örtüsünün bulunduğu alanlarda (habitat) yaşarlar. Her bölgede yaşayan farklı böcek faunası vardır. Ceset üzerinde bulunan böcekler cesedin kaldığı ortam ve taşınma durumu hakkında da bilgi verir. Ayrıca bu böceklerin dokuları, üzerinde bulundukları ve beslendikleri cesede ait olan dokulardan daha fazla toksin içermesinden dolayı toksikolojik analizlerde de kullanılabilmektedirler (3,4,8,11).

Ölüm sonrası zamanı (PMI) tahmin etmek için entomolojik delillerin önemi ve geçerliliği uzun zamandan beri bilinmektedir (19)

28 Mart 1850'de Bergeret tarafından yazılan bir rapor mahkemede kabul edilmiş olup ilk modern "postmortem interval" (PMI) tayinini kapsayan adli entomoloji vakası 1855 yılında yine Bergeret tarafından bildirilmiştir (20).

Türkiye' de Adli entomoloji hakkında genel bilgi içeren yayınların yanı sıra entomolojik delillerden yararlanarak ölüm zamanının tahmini (29,30), ölenin yerinin değiştirilip değiştirilmediğinin tespiti (31), ölüme neden olan toksik maddenin larvalar yardımıyla tanımlanması işlemleri (24) ve adli böcek faunasına ilişkin deneysel çalışmalar yapılmaktadır (26, 27, 28).

Ölmüş biyolojik varlıkların dekompozisyonu, doğanın ekolojik dengesi ve canlılığın devamı için bir zorunluluktur (15). Çürümüş cesetler farklı canlı türleri için geçici, değişen bir besin kaynağı oluşturur. Bu canlıların içinde en büyük zararı veren böcekler, sadece açıkta kalmış cesedi harap etmekle kalmayıp aynı zamanda gömülmüş cesetlerin yok olmasında da etkin rol oynarlar.

Cesetten yayılan kokuları alan Diptera (çift kanatlılar, sinekler) takımına ait türler cesede ulaşırlar. Cesede ilk önce gelenler Calliphoridae (Yapışkan sinekler) ailesine ait olan blowflies (mavi ve yeşil şişe sinekleri) türleri ve bunu takiben Sarcophagidae (Et sinekleri) familyasına ait olan fleshflies (leş sinekleri) türleridir. Ceset üzerinde her zaman yumurta görülmeyebilir. Bazı türler ölümden hemen sonra cesedin bulunduğu alana gelir ama çok geç kolonize olurlar ya da gelen türler leşçil olmayan türlerdir. Bazı türlerse yumurta değil larva bırakır. Cesetler üzerindeki böcek aktivitesi, çürümenin çeşitli evrelerinde farklı dalgalar halinde olabilir.

Literatürde ölüm zamanını tayin etmek için kullanılması amacı ile cesede gelen çeşitli türlerin üreme davranışları incelenmiştir. *Calliphora vicina* adlı sineğin larvalarının büyüme davranışlarının incelendiği bir çalışmada, 53 sinek yumurtası çatlama evresine kadar laboratuvarda gözlenmiştir (29) .

Larvalar pupa olana kadar beslenmişlerdir, günde birkaç kere larvaların boyları ölçülerek kayıt edilmiştir ve gelişimleri incelenmiştir. 5500 larvadan elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve şu sonuçlara varılmıştır: Bu araştırmada; mavi yeşil şişe sineklerinden olan *Calliphora vicina* sineğinin, entomolojik ölüm zamanı tespitine uygun olan bütün büyüme evreleri, ortamın sıcaklık koşullarına bağlı olduğu ortaya konmuştur. Aşağıdaki bilgilere ulaşılmıştır:

1. Yumurta evresi süresi, sıcaklığın düşmesi ile uzar.

2. Larva büyüme hızı, düşük sıcaklıkta yavaştır.

3. Larvalar maksimum uzunluğuna, yüksek sıcaklıklarda daha erken ulaşır.

4. Larvaların ortalama maksimum uzunluğu, yüksek sıcaklıkta düşer.

5. Larvalar, bütün sıcaklıkta maksimum uzunluğa ulaştıklarında küçülmeye başlarlar. Kısalma, yüksek sıcaklıkta daha hızlı gerçekleşir.

6. 30°C üzerindeki sabit sıcaklık, bodur larva formuna yol açar. Bu larvalar, pupaya dönüşemez ve ölürler.

7. Pupa olmak için kısalmış ve pupaya hazır larvaların, 16°C altındaki sabit sıcaklıktaki ortam koşullarında değişimleri durur. Sıcaklık yükselince, metamorfoza kaldıkları yerden devam ederler.

Bir başka çalışmada; *Calliphora vicina* sineğinin beslenme sonrası larva evresine ait bilgilerin, PMI (ölüm sonrası zamanı)' i tahmin etmede faydalı olduğu anlaşılmıştır (32).

2.1.1. Adli Entomolojinin Tarihçesi

Adli entomoloji ile ilgili bilinen ilk doküman; 13. yüzyılda (1235) Çinli avukat ve ölüm araştırıcısı olan Sung Tzu'nun yaptığı bir cinayet araştırmasıdır. Köyde orak ile boğazı kesilerek öldürülen bir kişinin katili bulunamayınca, Sung Tzu bütün işçilerin oraklarını bir odaya dizmiş ve sadece üzerinde görünmeyen kan izi olduğu düşünülen bir orakta Calliphoridae larvalarının görülmesi sonucu, orağın sahibi cinayetle suçlanmış ve orada öldürülmüştür. Bu araştırma Sung Tzu tarafından orijinal ismi " *Hsi Yüan Lu*" olan (The Washing Away of Wrongs) kitapta rapor edilmistir (33). Heykeltıraşlar, ressamlar ve şairler larvaların cesetlerin ayrışmasındaki etkilerini not etmişler ve ortaçağdaki (15.yy) dokümanlarda "ölüm dansı" diye adlandırılan resimlerde, cesetler üzerindeki larvaları abartarak çizmişlerdir. Buna benzer bir resim 16. yüzyılda Tumba'nın iskeleti olarak isimlendirilmiştir ve bu resimde; tüm iskelet larvalar ile kaplıdır (16,34).

Entomoloji alanında bilimsel olarak ilk deney 1668'de Francesco L. Redi tarafından yapılmıştır. 17. yüzyılın ortalarında abiyogenez ile ilgili deneyler yapan Redi, "Böceklerin oluşumu üzerine deneyler" adlı eserinde, abiyogenez teorisinin geçersizliğini anlatmıştır (33).

Linne 1767 yılında, üç sineğin bir at cesedini bir aslan kadar hızlı tahrip edeceğini ifade etmiştir. Anonymous 1814'de çürümenin başlangıcında cesetlerin sineklerin saldırısına uğradığına dikkat çekmiştir.

Orfila 1831'de yaptığı feth-i kabir incelemesinde larvaların cesedin bozulmasındaki önemini fark etmiştir. Bergeret 1850'de ölüm zamanının belirlenmesinde ilk Modern adli entomoloji

vakasını rapor etmiş, böceklerin hayat döngüsü ve çiftleşme alışkanlıkları hakkında birçok varsayımdan bahsetmiştir (16).

Fransız Adli Tıp Cemiyeti Başkanı Brouardel 1879'da yeni doğmuş çocuk cesedi üzerindeki sinek larvalarından ölüm zamanı tespiti ile ilgili bir rapor hazırlamıştır (16,35).

Reinhard'ın 1881'deki ilk sistematik çalışması Adli Entomoloji tarihinde önemli bir role sahiptir (23,36).

Megnin 1894'de insan cesetlerine gelen 8 arthropod saldırı dalgasını ortaya koyan "La Faune Des Cadavres- Application de I'entomologie a la Medicine Legale" isimli kitabını yayınlamıştır. Megnin, ceset üzerindeki böcekleri tanımlayarak, makul bir güvenlik içinde, ölüm zamanının saptanabileceğini açıklamıştır (2,16,37,38).

Hough 1897'de, önceki çalışmaları inceleyip onaylamış, cesede gelen Diptera takımına ait sinek türlerini, ayrıca Amerika ve Avrupa'daki sinek faunalarını karşılaştırmıştır (22).

I.Dünya savası sonrası Adli Entomoloji çalışmaları hız kazanmıştır. Aldrich 1916'da erişkin erkek sineklerin genital organlarını, Sarcophagidae ailesine ait sinek türlerinin ayrımında kullanmıştır.

Meixner, 1922'de çalıştığı enstitünün bodrumundaki cesetlerin arthropodlar tarafından hızlı ayrıştırıldığını fark etmiş ve bundan dolayı Adli Entomoloji'ye olan ilgi artmış ve takip eden birkaç yıl içinde Hermann Merkel, Meixner'in inceleme raporlarını yayınlamıştır.

İtalya'da Bari Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü Müdürü Bianchini 1929'da "Cesetlere Gelen Böceklerin Faunasına Dair Çalışmaya Pratik ve Deneysel Katkılar" adlı bir çalımsa yayımlamıştır. Kulak, kol, abdominal bölge ve bacaklarında lezyonlar görülen bir ceset ile ilgili sunduğu dava raporunda, karıncaların 24 saatlik bir periyotta bu lezyonlara neden olduğunu bildirmiştir.

Knipling 1936'da I. evre larva ve et sineklerinin türlerini tespit etmek için teşhis anahtarını yayınlamıştır (38).

Hubert Hamburg Müzesi ve Zooloji Enstitüsü'nden Caspers 1959'da adli araştırmalarına cesede gelen sinek türlerini incelemekle başlamıştır (39).

Arutjuna 1962'de; Azerbaycan'da, kısmen iskeletleşmiş ve ileri derecede dağılmış bir olgu yayınlamıştır (35).

Burger 1965'de Sarcophaga cinsine ait sinek türlerinin cesede yılın farklı mevsimlerinde geldiğini tespit etmiştir (16).

1960-1980 yılları arasında Adli Entomoloji'nin babası sayılan Fransız Hekim Marcel Leclerg ile Zooloji Profesörü Pekka Nuorteva'nın çalışmaları sayesinde ölüm zamanı hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir (34).

1969-1980 yılları arasında Adli Entomoloji'deki çalışmalar, Tıp Doktoru Marcel Leclecq ve Entomoloji Profesörü Pekka Nuorteva tarafından dava odaklı olarak sürdürülmüştür. Bundan sonra İngiltere, Hindistan, Rusya, US, Kanada, Fransa ve Japonya gibi ülkelerde rutin olarak çalışmalar başlamıştır (16).

Smith, 1986'da "A manuel of Forensic Entomology" isimli ilk ders kitabını yazmıştır (38).

Erzinçlioğlu, 1987'de, ete gelen 10 sinek türünün üçüncü evre larvalarının teşhis özelliklerini tarif etmis ve 1988'de *Phormia regina, Phormia terranovae* ve *Borellus atriceps'*i tanımlamıştır (22).

Mackenzie, cesetler üzerindeki yumurta ve maggotları (Modi 1999) inceleyerek Hindistan' da ki ilk adli entomolojik çalışmaları Calcutta'da yapmıştır (Indian Medical Gazette, 1889; 167). Literatürde bu çalışma ile ilgili daha fazla bilgi bulunmamaktadır (22).

Türkiye'de ise Savran ve arkadaşları 1994 yılında 'Adli Entomoloji' başlıklı bir makale yayınlamışlardır. Hancı ve arkadaşları 2000 yılında 'Adaletin Gerçekleşmesinde Böceklerin Yeri Var' başlığı ile Adli Entomoloji'ye dikkat çeken bir yazı yayınlamışlardır. Daha sonra Açıkgöz ve arkadaşları 2002'de 'Adli Olaylarda Böceklerden Nasıl Yararlanırız' başlıklı bir makale yayınlamışlardır. Nihal Açıkgöz 2010'da 'Adli Entomoloji' adında bir derleme

sunmuştur. Dr. Ayla Tüzün ve Serdar Yüksel 2007'de 'Postmortem İnterval'in Saptanmasında Adi Entomoloji' başlıklı derleme sunmuşlardır. Açıkgöz A, 2008.'de 'İnsan cesetleri üzerinden toplanan entomolojik delillerle ölüm zamanı tayini' başlıklı Doktora Tezini Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde tamamlamıştır.

Açıkgöz A, Açıkgöz HN, İşbaşar T, 2008'de ' İnsan Cesetleri Üzerinde Bulunan Chrysomya Albiceps'in (Fabricius) (Diptera:Calliphoridae) Predatör Davranışı' 8. Adli Bilimler Kongresi'nde sunmuştur.

Doç. Dr. Osman Sert, 2006'da 'Cesetler üzerinde yaşayan böceklerin laboratuar koşullarında yetiştirilmesi' başlıklı Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Merkezi Projesinde proje yöneticisi olarak görev yapmıştır. Osman Sert 2012'de 'Adli Bakımdan Önemli Olan Böcek Gruplarından Calliphoridae Familyasına Ait Calliphora *vomitoria* (Linnaus 1758) ve *Chrysomya allbiceps* (Wiedemann 1819) Türlerinin Pupa Dönemindeki Gelişiminin incelenmesi' başlıklı yüksek lisans tezini (Ergil C) yönetmiştir. Karabey T.,2012'de 'Adli Önemi Olan Böcek Türlerinden *Lucili sericata* (Diptera:Calliphoridae) Pupa Gelişim sürecinin İncelenmesi' konulu yüksek lisans tezini sunmuştur.

Doç. Dr. Hüseyin Çakan, 2009'da 'Adli bilimlerde *Lucilia sericata* larvalarının kullanımı' başlıklı yüksek lisans tezini (Kondakçı G.) yönetmiştir.

Doç. Dr. Erdal Polat, 2009'da 'İstanbul, Pendik İlçesi Akfırat Beldesi'nde adli entomolojide kullanılan sinek türlerinin belirlenmesi' başlıklı yüksek lisans tezini (Yuca P.) yönetmiştir.

2.2. Ölümden Sonra Gerçekleşen Değişimler

Ölüm, basit anlatım ile yaşamsal işlevlerin sona ermesidir. Ölüm, somatik ölüm ve hücresel ölüm olmak üzere ikiye ayrılır.

Günümüzde, Dünya Hekimler Birliği ve Uluslararası hukuk; solunum, dolaşım ve santral sinir sistemi işlevlerinin geri dönüşümsüz olarak yitirilmesi halini 'somatik ölüm' olarak kabul etmektedir. Somatik ölümde ölen canlı bilinçsizdir, hiçbir şeyin farkında değildir.

Hücresel ölümde ise; hücre solunum ve metabolizma faaliyetlerini durdurmuştur. Tüm hücreler öldüğünde vücut da ölür.

Fakat bütün hücreler aynı zamanda ölmezler (nükleer patlama dışında). Araba bombalandığında bile kurbana ait vücut parçalanır, hücreler birkaç dakika daha yaşamaya devam ederler. Farklı hücre tipleri, kalp durduktan sonra, farklı zamanlarda ölürler. Sinir hücreleri ise oksijen yokluğunda 3-7 dakika içerisinde ölürler.

Ölümden sonra, vücudun sıcaklığı düşmeye başlar. Cesedin bulunduğu ortamın sıcaklığı ölçülmelidir. İnsan vücut sıcaklığı 37 ℃ kabul edilip, son vücut sıcaklığı ile kıyaslanarak ölüm zamanına ulaşılabilir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta; sıcaklık düşüşünün ölümden sonra yaklaşık 2 saat sonra başlayacağıdır.

Ölümden yaklaşık olarak 2 gün sonra (çürümenin başlamasından sonra) bakteri ve diğer çürükçül organizmaların metabolik aktivitelerinden dolayı vücut sıcaklığı tekrar artar.

2.2.1. Postmortem (Ölüm Sonrası) Değişiklikler

Canlılığın sona ermesi ile cesetlerde ortak değişiklikler meydana gelmektedir. Post-mortem değişikliklerin bilinmesi; ölüm kararı ve ölüm sonrası zamanın (PMI) doğruya yakın tespit edilmesinde çok önemli rol oynamaktadır.

Postmortem değişiklikler şunlardır:

1. Cesedin su kaybı,

2. Kan ve vücut sıvılarında meydana gelen değişiklikler,

3. Ölü soğuması (Algor mortis),

4. Ölü lekeleri (Livor mortis),

5. Ölü katılığı (Rigor mortis),

6. Kokuşma (Pütrefaksiyon),

7. Sabunlaşma (Saponifikasyon),

8. Mumyalaşma (Mumifikasyon),

9. Salamuralaşma (Maserasyo)

Böcekleri ve onların kriminal araştırmalar ile ilişkilerini inceleyen bilim dalı Adli Entomoloji olarak bilinir. Böcekler, genellikle suç ile ilgili ayrıntıların bilinmediği ve tıbbi parametrelerin yeterli olmadığı durumlarda ölüm zamanının tahmininde kullanılır (2,3,4,14). Vücut sıcaklığı veya ölü lekeleri (livor mortis) ve ölü katılığı (rigor mortis) analizi gibi tıbbi teknikleri kullanarak ölümden sonra geçen sürenin ölçümü, ölümü takip eden bir, iki veya üç gün için mümkün olabilir. Buna karşılık, ceset ile beslenen henüz olgunlaşmamış böceklerin yaşını hesaplanmasıyla ve bulunan nekrofaj türlerin analiz edilmesiyle, birinci günden bir kaç haftaya kadar olabilen ölüm sonrası süre (post-mortem interval) hesaplanabilir (18,22,24,25).

2.2.1.1. *Çürüme (Dekompozisyon)*

Çürüme ya da kokuşma ölümden sonra cesedin çürüyüp dağılarak yok olmasıdır (33, 40, 41). Canlılar, öldükten sonra çürürler ve ekolojik sisteme katılırlar. Ölüm sonrası cesedin çürümesi ve bu çürümenin sonlanması binlerce yıl sürebilir. Yalnızca iskeletin fosilleşmesi moleküler yapı dışında kalıcıdır.

Dekompozisyon, doğadaki ekolojik dengenin sağlanması ve canlılığın devamı için bir zorunluluktur. Organik yapı taşlarından oluşan insan vücudu, ölümden sonra gerçekleşen çürüme ile organik bileşikler temel basit elemanlarına ayrılarak yok olur.

Karmaşık ve gelişmiş organik bileşiklerin kendilerini oluşturan basit elemanlara ayrılması, bakterilerin ürettikleri proteolitik ve diğer enzimlerin etkisi ile gerçekleşir. Bu enzimlerin yardımı ile dokular gaz, sıvı ve tuzlara ayrışarak yok olurlar(41).

Çürümeyi etkileyen başlıca faktörler; ortamdaki canlılar, kimyasal olaylar ve fiziksel etkenlerdir. Çürümeyi gerçekleştiren en büyük faktör, vücudun normal florasını oluşturan bakteriler ve patojen bakteriler (varsa) dir.

Ölümden sonra; canlı iken vücutta bulunan bakteriler, ceset üzerinde çoğalarak dokuları istila eder. Ölümden sonra vücuttaki bakterilerin sistematik analizini yapan Burn, ölümden sonra dokularda bulunan bakterileri sık ve seyrek olarak rastlanan bakteriler olmak üzere iki gruba ayırmıştır.

Birinci grupta; Clostridium "VVelchii gibi sporlu anaerobik bakteriler, koliform bakteriler, mikrokoklar, difteroid basiller, proteuslar bulunur. Bu bakteriler, sindirim kanalı ve solunum sisteminde bulunmaktadırlar ve ölümden sonra faaliyetlerine devam ederek savunmayı bozup dokuları istila etmektedirler.

İkinci grup bakteriler ise patojen ve patojen olmayan geniş bir grubu kapsar.

Cesetten patojen bir bakteri izole edildiğinde, o organdaki bir hastalığın nedeni olarak değerlendirilmeleri normaldir. Patojen bakterilerin varlığı çürümeyi hızlandırır. Septik düşüklere bağlı ölümler ve gazlı gangrende çürüme oldukça hızlı gelişir. Akut enfeksiyonlar, özellikle pulmoner enfeksiyon ve sepsislerde çürüme çok hızlı seyreder. Vücudun içerdiği bakteri sayısı da çok önemlidir. Oldukça az sayıda bakteri içeren yeni doğan bedeni geç çürür.

Dış ortamda uzun süre kalan cesetlerin çürümesine özellikle böceklerin (insectler) katkısı çok fazladır. Aynı zamanda cesedin bulunduğu ortama göre etoburlar, kemiriciler, balıklar ve diğer canlılar da cesede saldırarak cesedin çürümesine katkıda bulunurlar. Çürüyen cesetler farklı canlı türleri için geçici ve değişen bir besin kaynağı oluşturmaktadır (1, 2, 20, 37).

Çürüme (Dekompozisyon) evresi, Otoliz ve Pütrefaksiyon olmak üzere iki aşamadan oluşur.

2.2.1.1.1. *Otoliz*

Hücre içinde lizozomlarda bulunan proteolitik enzimlerin postmortem dönemde aktive olmaları sonucunda hücre yapısının bozulması *otoliz* olarak adlandırılmaktadır. Aynı zamanda otoliz,

hücrelerin zedelenmesi sonucu açığa çıkan lizozomal enzimlerin kendi yapılarını sindirmesi ve ölümden sonra hücrelerin enzimatik parçalanmasıdır.

2.2.1.1.2. *Pütrefaksiyon (=Kokuşma=Çürüme)*

Otoliz sonrasında dokuların gaz, sıvı ve tuzlara kadar parçalanması olayına kokuşma (pütrefaksiyon) denir. Kokuşmadan primer sorumlu bakteriler, solunum sistemi ve barsak lümeninde saprofit olarak bulunan sporlu anaerobik bakterilerdir. Bazı clostridium türleri, koliformlar, mikrokoklar, difteriodler ve proteusların da aralarında bulunduğu bu bakteriler postmortem dönemde çoğalarak dokulara geçer. Septisemi (kan zehirlenmesi) gibi olgularda mevcut bakteriler çok hızlı çoğalarak kokuşmanın daha erken oluşmasına ve hızlı seyretmesine neden olur (40).

Kokuşma süresi organlar arasında farklılıklar gösterir. Göz, beyin, mide, barsaklar, karaciğer ve dalak daha erken kokuşurken, kalp, akciğer, böbrek, mesane ve uterus gibi kas ve fibröz dokudan zengin organlar pütrefaksiyona daha dirençlidir.

Açık havada kokuşmaya etki eden faktörler şöyle sıralanabilir:

1. Hava sıcaklığı ve nem: Hava sıcaklığı artıp nem oranı yükseldikçe bakterilerin üreme hızı arttığından, kokuşma çabuk başlayıp hızlı seyreder. Ortam sıcaklığının 10ºC'nin altında olduğu durumlarda ise pütrefaksiyon belirgin bir şekilde yavaşlamaktadır.

2. Dokunun hidrasyonu: Bakterilerin üremesi için su gerekli olduğundan, dokularda ödemin arttığı durumlarda kokuşma da hızlı olur. Bu olayın tersi durumlarda, herhangi bir nedenle dehidrate kalan cesetlerde kokuşma yavaş gelişir.

3. Şahsın yaşı ve beslenme durumu: Hiç beslenmemiş bir yeni doğanda barsak florası gelişmediği için kokuşma daha yavaş gelişir. Çocuklar erişkinlere, şişman kişiler de zayıflara oranla daha hızlı kokuşur.

4. Ölüm nedeni: Yukarıda da bahsedildiği gibi, septisemi ya da bakteriyemi gibi tüm vücudun kontamine olduğu durumlarda kokuşma erken olur ve hızlı seyreder.

5. Cesedin bulunduğu ortam: Suda bulunan cesetlerde kokuşma hızı suyun özelliğine göre değişebilmektedir. Tuzlu suda pütrefaksiyon gecikirken, durgun, hareketsiz, kimyasal ve organik atık bulunan sularda kokuşma çok daha hızlı olmaktadır (40).

Cesedin çürüme oranını etkileyen faktörler aşağıda belirtilmiştir:

- Cesedin bulunduğu ortamın ve cesedin vücut sıcaklığı,
- Cesede böceklerin gelişi,
- Cesedin gömülü olup olmaması,
- Cesedin gömülme derinliği,
- Cesede etçillerin gelişi,
- Cesede kemirgenlerin gelişi,
- Ortamın nem ve kuruluk derecesi,
- Ortamın yağış miktarı,
- Cesedin vücut ölçüsü,
- Cesedin ağırlığı,
- Cesedin giyinik olup olmaması,
- Cesedin bulunduğu zeminin durumu,
- Cesette yara, bere olup olmaması'dır.

2.2.1.2. *Cesedin çürüme evreleri*

2.2.1.2.1. *Başlangıç evresi*

Başlangıç evresi, ölümden sonraki ilk gündür. Ceset henüz şişmemiştir, cesette kokuşma ve bozulma olmamıştır. Cesede bu dönemde yalnızca Calliphoridae, Sarcophagidae ve Muscidae familyalarından sinekler ile zar kanatlılar (Hymenoptera) takımından böcekler gelmektedir (34,42).

2.2.1.2.2. *Şişme evresi*

Şişme evresi, yaklaşık olarak, ölümden sonraki 2-6 gündür. Bu dönemde cesedin karnı belirgin biçimde şişer, vücut açıklarından sıvılar akar ve keskin koku duyulur. Cesette bu dönemde Calliphoridae familyasından sinekler görülmektedir (34,42).

2.2.1.2.3. *Aktif çürüme*

Aktif çürüme evresi, yaklaşık olarak ölümden sonraki 7-12 gündür. Aktif çürümenin görüldüğü bu dönemde koku güçlü bir şekilde duyulmaktadır. Çürümenin yoğun olduğu yerlerde deri siyahımsı bir renk almıştır ve ceset, üzerinde beslenen böcekler tarafından oldukça zarar görmüştür. Cesette bu dönemde Calliphoridae ile Muscidae familyasından sinekler ve kın kanatlılar (Coleoptera) takımından leşçil böcekler görülmektedir (23, 33,34).

2.2.1.2.4. *İleri çürüme*

İleri çürüme evresi, yaklaşık olarak, ölümden sonraki 13-51 gündür. Çürümenin sonuna gelindiği bu dönemde koku artık azalmıştır ve ekşimiş peynir kokusu duyulmaktadır. Cesette bu dönemde yalnızca kın kanatlılar takımından leşçil böcekler görülmektedir (33,34).

2.2.1.2.5. *Kuruma*

Kuruma evresi, yaklaşık olarak, ölümden sonraki 52-207 gündür. Et ve yumuşak dokular tamamen yenilip tüketilmiştir. Yalnızca kemik, saç ve kurumuş deri kalıntıları bulunmaktadır. Koku duyulmamaktadır. Cesette bu dönemde zar kanatlılar (Hymenoptera) takımından arılar ve Dermestidae familyasından kın kanatlı böcekler görülmektedir (23,34).

2.3. Taksonomide *Lucilia sericata*' nın Yeri

Canlıları sınıflandırmanın amacı; yeryüzünde bulunan canlıları, akrabalık ilişkilerine göre gruplandırmak ve bu sayede araştırılacak canlıların düzenli bir sistem içinde çalışılmasını kolaylaştırmaktır.

Şube: Arthropoda (Eklembacaklılar)

Sınıf: Insecta (Böcekler)

Takım: Diptera (Çift Kanatlılar-Sinekler)

Bu takım, sineklerden oluşur ve 86 000' in üzerinde tür barındırır. Sinekler neredeyse bütün habitatlarda bulunur ve bir çift kanatlarının olmasıyla karakterize edilirler. Aristoteles, sinekleri Diptera (di = iki, ptera = kanat) olarak adlandırmıştır. İkinci çift kanatları "halter" adı verilen, topuz şeklinde görülen, uçuş sırasında dengelerini sağlamasına yardımcı olan bir organa indirgenmiştir. Ekosistemde organik maddelerin geri dönüşümünde ve dekompozisyonda önemli bir role sahiptirler (2,43).

Alttakım: Brachycera

Karakteristik kanat damarlanmasının yanı sıra antenlerinin şeklide kendine özgüdür (brachy = kısa, ceros = boynuz). Antenleri çok kısadır ve birbirinden farklı şekilleri olan segmentlerin birleşmesiyle meydana gelmiştir.

Aratakım: Muscomorpha

Adli açıdan en önemli gruptur. Antenleri 3 segmentten oluşmuştur. Üçüncü anten segmenti uç kılı taşır (arista). Larva evresi üç safhadan oluşur. Larvanın başı ve gövdesi arasında morfolojik bir ayrım yoktur. Taksonomik olarak iki alt gruba ayrılır. *Aschiza* ve *Schizophora*. Schizophora ise kanat kaidesinde "*calypter*" (squama) adı verilen halter organını örten yapının olmamasına göre ikiye ayrılır. Bunlardan *Acalyptratae*'de calypter bulunmazken ve *Calyptratae*' de calypter ya da squama bulunur. *Muscidae, Fannidae, Sarcophagidae* ve *Calliphoridae* aileleri bu Calyptratae grubu içerisinde yer alırlar (43,44).

Familya (Aile): Calliphoridae

1000' in üzerinde türü barındıran oldukça geniş bir ailedir. Megnin'den günümüze insanlarla iç içe yaşayan bu böcekler, insan kadavrasındaki faunal süksesyonun ilk dalgası olarak kabul edilirler. Çoğunlukla metalik renklidirler. Proteince zengin maddelerin bozulduğu yerleri hemen bularak yumurta bırakırlar. Çıkan larvalar proteolitik enzimler salgılamak suretiyle bulundukları organik dokuyu delerek daha derinlere girerler. Özellikle yaralar ve vücut

açıklıkları en çok girdikleri yerlerdir. Ölüm sonrası sürenin tespitinde sıklıkla kullanılması dolayısıyla adli entomolojik açıdan en önemli türleri içerir. Her türün kendine özgü bir biyolojisi vardır. Kentlerde dağılım gösteren türleri olduğu gibi kırsal bölgelere özgü türleri de mevcuttur (43-45).

Cins: *Lucilia sp.*

Lucilia türleri, cesete ilk dalgada gelen sinek türleri arasındadır ancak mevsime ve coğrafi konuma bağlı olarak populasyonları değişiklik gösterir.

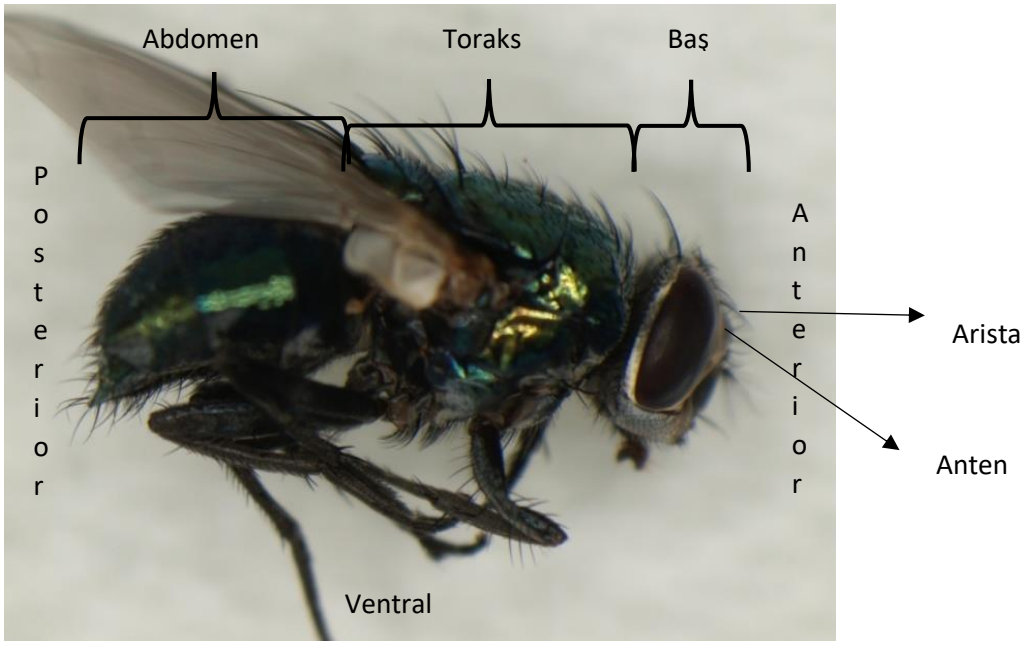
Tür: *Lucilia sericata (Meigen)*



Şekil 1: *Lucilia sericata* ergin sinekleri

Bu tür metalik yeşil renkte olduğu için yeşil sinek olarak adlandırılırlar. İlk olarak Meigen tarafından 1826'da tanımlanmıştır. Kuzey Amerika'lı yazarlar, *Lucilia sericata*'yı *Phaenicia sericata* olarakta isimlendirir. Holarktik bölgede (bütün kuzey enlemleri) insan habitatlarında sıklıkla görülen bir sinektir. *L. sericata*, yılın sıcak aylarında yaygın olarak bulunan bir türdür ve genellikle ait olduğu taksonomik ailenin biyolojisi ve ekolojisi ile ilgili pek çok araştırmada bu tür kullanılır. Yükseklerde yaşayan *Lucilia sericata*, Orta Avrupa'da sadece ölü dokularda

yaşamasına karşın İskoçya'da koyun miyazının nedeni; Avustralya ve Yeni Zelanda'da ise ikincil parazit olduğuna ilişkin kayıtlar verilmiştir. *Lucilia* türleri, diğer Calliphoridae ailesi üyelerinden squama yukarısında bir bombesinin oluşu (suprasquamal bombe) ile ayırd edilir. *Lucilia sericata*' nın sarı renkte basicostası vardır. Mesotoraksında üç sıra kıl görülür. Arista, uç noktasına kadar kıllıdır. *L sericata*'nın dorsali dışbükeydir. Toraks üzerinde beyaz tozumsu yapılar gözlenir.



Şekil 2: *Lucilia sericata* ergin sineğinin morfolojisi (vücut kısımları)

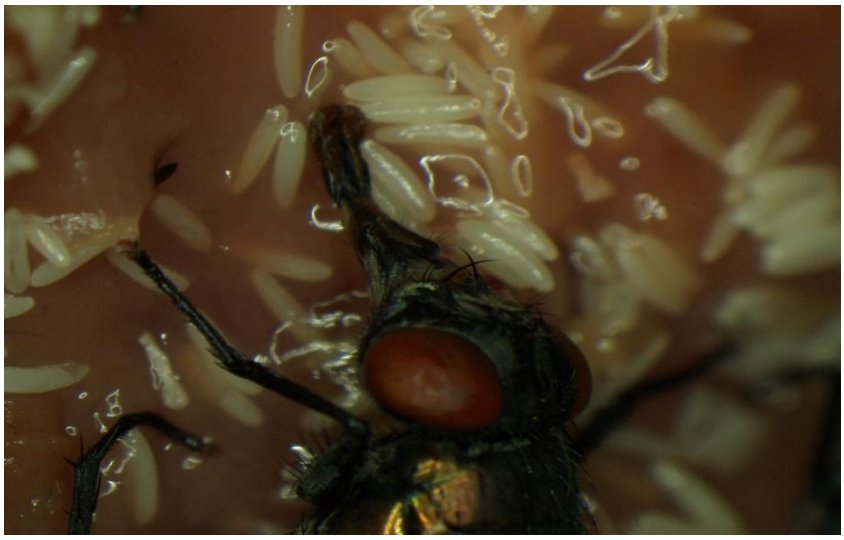
Lucilia sericata'nın larvaları ise, en son posterior segmentin kenarına bakılarak da ayırt edilebilir. Segmentin dış kenarında bulunan çıkıntıya *tüberkül* adı verilir. İki iç tüberkül arasındaki mesafe, iç ve dış tüberkül arasındaki mesafeden küçük ise bu türün *Lucilia sericata* olduğu söylenebilir. Bu özellik 3. evre larvalar için karakteristiktir (2, 44, 46, 47, 48).

L. sericata, Adli Entomolojinin yanı sıra tıp alanında da faydalanılan bir türdür. *L. sericata*'nın steril hale getirilmiş larvalarının kronik yaraların tedavisinde kullanılması "Larva Debridman Tedavisi" olarak adlandırılır. Larvalar, ürettikleri güçlü proteolitik enzimler ile nekrotik dokuyu eriterek kendilerine besin kaynağı olarak kullanmaktadırlar. Salgıları yaradaki ölü dokuya ve bakteriyel enfeksiyona litik etki gösterir. Dokunun yenilenmesini teşvik eder (2,49).

2.4. Sineklerin Biyolojisi

Böcekler ve diğer karasal eklem bacaklılar, kutuplardan ekvatora bütün habitatlarda bulunurlar. Yaşam şekilleri dolayısıyla insanlarla çeşitli şekillerde etkileşim halinde olabilirler. Dünyanın ekolojik etkileşiminde sinekler çeşitli roller üstlenirler. Sineklerin çoğu bitkilerle beslenirler ve zararlı eklembacaklıları kontrol ederler. Bitkilerin bozulmasına, çiçeklerin çoğalmasına yardımcı olurlar ve diğer türler için besin olurlar. Hastalıkların yayılmasını sağlarlar. Onların direk veya indirek olarak sebep olabilecekleri zararları azaltmak ve adli delil olarak kullanabilmek için onların biyolojilerini bilmek gereklidir (42). Araştırmacılar sinekleri adli bilimler, moleküler araştırmalar için ve turizm endüstrisinde kullanmaktadırlar.

2.4.1. Beslenmeleri ve boşaltım organları



Şekil3: *Lucilia sericata* dişi sineğinin beslenmesi

Sineklerin hepsi emici ya da yalayıcı ve emici ağız tipine sahiptir. Bu tiplerde kendi arasında birçok farklılıklar gösterir. Besin olarak sıvı maddeleri alırlar. Sıvının emilmesi, besin kanalının ön kısmında bulunan iki emme pompası ile gerçekleşir. Genellikle besinler yemek borusuna ince bir kanalla bağlı olan büyük hacimli kursakta depo edilir. Birçok kıvrım yapmış orta bağırsağı başlangıç kısmı peritrofik zar denen ince bir zar halindedir. Bu zar, besini çepeçevre sarar. Boşaltım organları dört, nadiren iki malpigi tüpünden oluşmuştur. Son bağırsakta bulunan

dört rektal papil, bağırsak içeriğinin suyunu çekerek dışkıyı yoğunlaştırır; ayrıca mekanik olarak peritrofik zarı parçalar.

2.4.2. Yumurta ve döllenme



Şekil4: *Lucilia sericata* ergin sineklerin çiftleşmesi

Olgunlaşmasını tamamlamış yumurta, yumurta hücresi tarafından meydana getirilen ince bir yumurta sarısı (vitellus) zarı ve folikül epiteli tarafından salgılanan "Koriyon" (yumurta kabuğu) ile çevrilmiştir. Koriyonun belirli yerlerinde spermaların girmesi için bir ya da birçok delik vardır. Bu deliklere "Mikropil" denir. Mikropilden giren birçok spermadan bir tanesi yumurtayı döller. Döllenme her zaman dişinin vücudu içerisinde olur (43).

2.4.2.1. Yumurta bırakma

Yumurtalıklarında meydana gelen, uzun oval ve üzerinde yapışmalar olan yumurtalar döllendikten sonra tek tek ya da toplu olarak, dişi ergin birey tarafından bırakılır. Dişiler genellikle korunaklı, larvanın besinini en kolay şekilde bulabileceği bir ortamı seçer. Ceset üzerindeki yaralanma bölgeleri ve doğal vücut açıklıkları bu bakımdan uygun alanlardır (43). Sinekler, yumurtalarını bırakmak için genellikle ölü dokuları tercih etseler de bazı türler canlı dokulara da saldırırlar. Bu tip durumlarda "Miyaz" denilen hastalık ortaya çıkar. Bu oldukça nadir görülmekle birlikte, miyaz olmuş bir kişinin ölüm sonrası süre tahmini yapılırken bu miyaz bölgesindeki larvalar araştırmacıyı yanlış tahmine götürür (2,50).



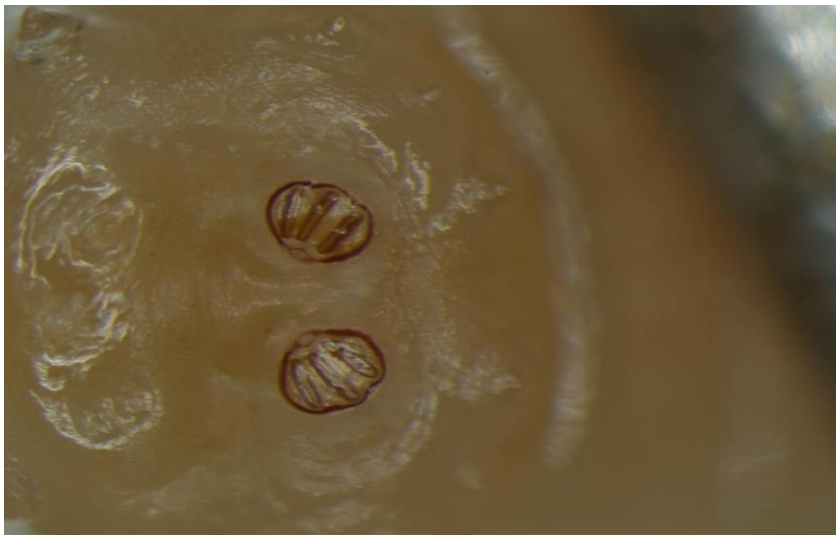
Şekil 5: *Lucilia sericata* dişi sineğinin yumurta bırakması

2.4.3. Postembriyonal gelişme

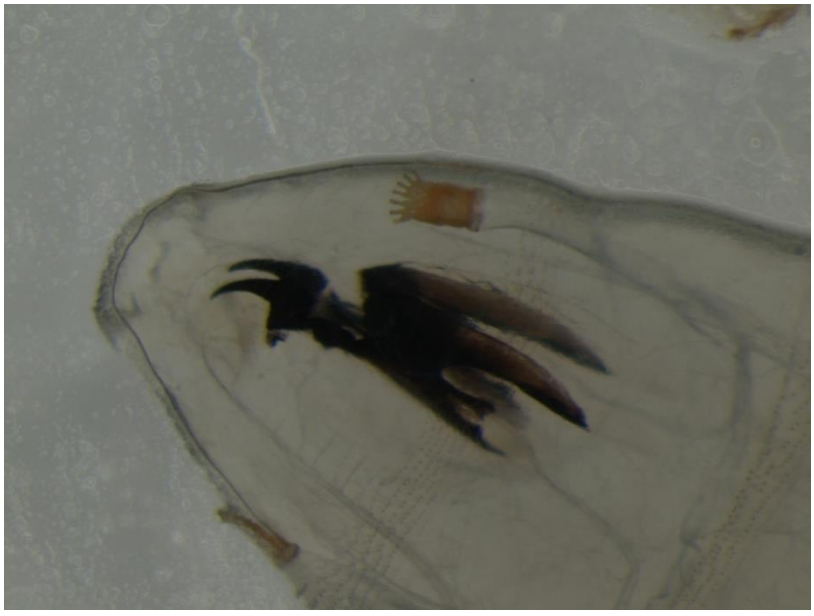


Şekil6: *Lucilia sericata* larvasının deri değişimi

Yumurtadan çıkan genç larvalar, ceseti tüketmeye başlarlar ve üç kez deri değiştirirler. Büyüme deri değiştirme ile olur. Eski kütikulanın yerine yenisi gelir. Deri değiştirme, larva evrelerini birbirinden ayırır. Üç larval evre morfolojik olarak ayırd edilebilir. Larvaların 12. segmentinin arka tarafında iki tane solunum deliği (stigma) görülür. Solunum deliklerinin içinde solunum yarıkları bulunur. Yarıklar 1, 2 veya 3 tane olabilir ki, bunların adeti larvanın 1., 2. veya 3. evrede olduğunu gösterir (2,43,51).



Şekil 7: *L.sericata* 3. evre larvada solunum yarıkları



Şekil 8: *L.sericata* 3. evre larvada sklerit ve ön stigma

Larvalar, başkalaşım gösteren diğer tüm böceklerde olduğu gibi, erginlere hiç benzemezler. Vücutlarının tümü 12 segmentten oluşur. Segment hareketleriyle sınırlı bir şekilde hareket ederler. Baş yoktur. Larvanın ön ucu daha ince ve sivrimsidir; arka ucu ise kalın ve küttür (51). İlk segmentin iç tarafında, yani sindirim kanalının başlangıç kısmında birbiri ile bağlanmış bir kaç sklerit bulunur. Bu skleritler baş-gırtlak aygıtı olarak bilinir. Kapalı yerlerde yaşadıklarından gözleri gelişmemiştir (43).

2.4.3.1 *Başkalaşım (Metamorfoz)*

Tamamen büyümüş olan larva, beslenmeyi bırakır ve cesetten uzaklaşmaya başlar. Bu evredeki larva beslenme sonrası üçüncü evre larva olarak adlandırılır (50). Larva döneminde elde ettikleri enerjilerini, pupa safhasından erişkin sineğe dönüşümde yani metamorfozda kullanmaktadırlar (49). Larvanın boyu kısalır, rengi koyulaşır, etrafı sert kitin tabaka ile kaplanır ve pupa haline geçer. Son larva evresi ile ergin arasında hareketsiz ve besin alınmayan evreye pupa evresi denir. Yine larvalar metamorfoz süresince oto dezenfeksiyon (bakterileri yok eden, aksi halde pupa safhası öncesi bakteriler elimine edilmezse çoğalarak, infekte olup pupayı öldürebilme) gibi önemli bir özelliğe sahiptirler. Larval evredeki birçok yapı tamamen ortadan kalkar. Ergine ait taslaklar büyüdükçe, larvaya özgü organların aynı ölçüde yıkılması gereklidir. Çözülen ve parçalanan hücreler çoğunluk fagositler tarafından hücre içi sindirime uğratılarak ortadan kaldırılır (43,52).



Şekil 9: *L.sericata* pupası



Şekil 10: Pupadan yeni çıkmış *L.sericata* sineği

Bazı tür sineklerin pupaları alın keseleri ile pupa örtüsünü patlatırlar. Bazı türler de boyuna ve enine yarıklarla pup örtülerinden çıkarlar. Alın kesesinin ritmik genişleme ve kasılma hareketlerinin, ayrıca arkaya doğru yönelmiş kılların ve üyelerin yardımıyla pupadan yavaş yavaş dışarıya çıkarlar. Pupadan çıkma yaklaşık 5 dakika sürer. Pupadan henüz çıkan sineğin, küçük yapılı, gri-beyaz renkli, alın keseleri katlanmış ve derileri yumuşaktır. Hava alma ile vücut hacimleri artar, kanatları gerilir, kutikulaları renklenir ve sertleşir. Böylece tam erginleşirler. Sonuçta yetişkin bir sinek ortaya çıkar.

2.4.4. Metamorfoz sonrası gelişme

2.4.4.1 *Olgunlaşma dönemi*

Birçok sinekte yumurtalıkların olgunlaşması ve yumurtanın gelişmesi için bir beslenme döneminin yaşanması gerekmektedir. Yumurtalıkların olgunlaşması için birkaç gün ile birkaç hafta arasında zamana gereksinme vardır. Dişi yumurta üretebilmek için proteine ihtiyaç duyar (43,52).

2.4.4.2 *Üreme dönemi*

Küçük bir grup hermafrodittir, diğerleri ayrı eşeylidirler. Eşeysel dimorfizm yaygındır.

Olgunlaşma devresini izleyen bu devrede, gruplara ya da bireylere bağlı olarak değişebilen eşeysel davranışlar söz konusudur (43,52).

2.4.4.3 *Yaşlılık dönemi*

Ergin yaşamın süresince sadece dış organlar ve üyeler değil, aynı zamanda iç organlarda aşınır. Hücrelerde büyük değişmeler meydana gelir. Ölüm beynin ölmesiyle değil, hücre metabolizmasının durmasıyla ortaya çıkar (43,52).

2.5. Sineklerin Gelişimini Etkileyen Çevresel Koşullar

Böceklerin gelişimini etkileyen çevresel koşullar sıcaklık, nem ve ışıktır.

2.5.1. Sıcaklık

Böcekler soğukkanlı hayvanlar oldukları için vücut sıcaklıklarını sabit tutamazlar. Vücut sıcaklıkları, bulundukları çevrenin sıcaklığına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Böceklerin, gelişim evresinin bir safhasından bir sonraki safhasına geçebilmek için belirli bir miktar ısıya gereksinimleri vardır. Vücut sıcaklıklarının değişmesi, oluşan kimyasal olayları, dolayısıyla madde değişimini etkisi altına alır. Hayvanın madde değişiminin hemen hemen sıfır olduğu; fakat en azından bir süre yaşamını sürdürdüğü en düşük sıcaklığa "Minimum yaşam sıcaklığı" denir. Böceklerde bir büyüme olabilmesi için sıcaklığın, minimum yaşam sıcaklığında veya bunun üzerinde olması gerekmektedir. Sıcaklık yükseldikçe madde değişimi hızlanır ve belirli bir sıcaklıkta en üst düzeye ulaşır, buna "Optimum sıcaklık" denir. Optimum sıcaklığın üzerindeki sıcaklıklarda yaşam bir süre daha devam ettirilebilir. Fakat belirli bir sıcaklığın üzerinde büyük olasılıkla enzim inhibisyonu ve sinirlerde oluşan bozulmalardan dolayı ölümün eşiğine gelinir. Bu noktaya "Maksimum yaşam sıcaklığı" denilir. Sıcaklık, maksimum yaşam sıcaklığına doğru yükseldikçe besin gereksinimi ve büyüme de artar. Maksimum sıcaklık aşıldığı zaman büyümede herhangi bir artış görülmez, besin alma durumu ise soğukta bulunan hayvanlardaki gibidir. Bu sınırlar türden türe değişiklik gösterir (43,52).

Böceklerde suyun tutulması en önemli sorunlardan biridir. Yüksek nem yüksek sıcaklık daha hızlı bir ölümü hazırlar. Buna karşın buharlaşma olanağı bulunan bir ortamda yüksek sıcaklığa dayanıklılık artar (43,52).

2.5.2. Işık

Besin bulmaya, çiftleşmeye ve yumurta bırakmaya zamanlama bakımından büyük katkıları olan ışığın en önemli etkisi, bir günde alınan ışık süresine göre hayvanın gelişmesinde ve işlevlerinde bazı önemli değişikliklerin ortaya çıkmasıdır (43,52)

2.5.3. Nem

Böceklerde suyun tutulması en önemli sorunlardan biridir. Yüksek nem yüksek sıcaklık daha hızlı bir ölümü hazırlar. Buna karşın buharlaşma olanağı bulunan bir ortamda yüksek sıcaklığa dayanıklılık artar (43,52).

2.6. Adli Entomolojik Açıdan Sineklerin Önemi

Sinekler, kutuplardan okyanuslara kadar hemen her ekosistemde hayatta kalmayı başarabilmiş canlılardır. Canlılar âleminin belki de en kalabalık sınıfıdır. Bu sınıfta 32 takım yer almaktadır. Dünyadaki hayvanların % 90 kadarını oluşturmaktadırlar (43).

Yüzlerce eklembacaklı türleri, özellikle sinekler (Diptera), kınkanatlılar (Coleoptera) ve onların larvaları, cesetlerden etkilenirler. Hayvanların beslenme rejimlerine bağlı olarak cesedin farklı çürüme evrelerinde bulunarak, cesede ait olan vücut üzerinden beslenirler ve cesedin içinde veya üstünde yaşarlar veya çoğalırlar. Çünkü eklembacaklılar (Arthropoda) çok geniş alanlara yayılmışlardır ve dünya üzerinde en önemli biyolojik gruptur (sayıca bitkilerden bile fazladırlar). Değişik türde ve çok sayıda böcekler, çok fazla sayıda cinayetin gerçekleştiği yerde bulunabilirler.

2.6.1 Adli entomolojide sineklerin biyolojisi

Her jeolojik devirde belirli bir hayvan grubu yaygın hale geçer ve tür sayısı bakımından büyük bir açılım gösterirler. Şimdiki zamanda böcekler egemen duruma geçmişlerdir. Bu nedenle

yaşadığımız zamana “Böcekler Devri” denir. Çünkü dünyada yaşadığı tahmin edilen 2.000.000 hayvandan 1.200.000`i eklembacaklılara aittir. Dünya çoğunlukla eklembacaklıların yaşadığı bir yerdir. Böcekler atmosferin belirli katmanlarından deniz tabanına ve toprağın çeşitli zonlarına kadar yayılmışlardır. Karasal yaşama en iyi uyum sağlamış omurgasızlardır (43,52). Eklembacaklılar grubunun yeryüzünde yaygın olma sebepleri aşağıda belirtilmiştir:

- Dış iskelet bulunmaması: Kitin yapıdaki dış iskelet; savunmada, dış etkenlerden korunmada ve su kaybının önlenmesinde çok fayda sağlayan bir özelliğe sahiptir.
- Eklemli üyelere sahip olmaları: Daha rahat hareket edebilmelerini sağlamaktadır.
- Solunum için Trake sistemine sahip olmaları: Oksijen, dokulara doğrudan iletilmektedir ve enerji en etkin şekilde kullanılmaktadır.
- Duyu organları çok iyi gelişmiştir: Bu özellikleri ile kara yaşamına çok iyi uyum sağlamaktadırlar.
- Çok iyi gelişmiş davranış modelleri görülmektedir: Savunma, avlanma, saklanma, eşleşme ve koloni yaşamı davranış modelleri iyi gelişmiştir. Bu özellikler de böcek grubunun her ortama ve iklime rahatlıkla adaptasyon göstermelerini sağlamaktadır.
- Metamorfoz (Başkalaşım) geçirmeleri: Beslenme ve barınmada tür içi rekabetin engellenmesine sebep olmaktadır.

Dünya üzerinde yaşayan organizmalar arasında en iyi adaptasyon sağlayan canlı grubu böceklerdir ve milyonlarca böcek türü vardır. Böceklerin insanlar ile ilişkileri çeşitli şekillerde olabilir. Aynı yaşam alanında bulunulabilirler, bir hastalık için vektör olabilirler, tarımsal zararlı olabilirler veya bazı böcekler de yumurtalarını ölü hayvanlar ve insanlar üzerine bırakabilirler. Eklembacaklılar; bitkileri, ağaçları, ölmüş bitkileri, ölmüş omurgalıları yerler. Eklembacaklılar, ölmüş insanların ve hayvanların vücutları ile beslenirler. Bu özellikleri ile adli entomolojinin ilgilendiği ve vakaları çözmede faydalandığı gruptur (24).

Ekosistem içinde organik maddeleri tekrar kullanışlı hale getirirler. Besin zincirinin önemli halkasını oluştururlar. Adli entomolojide en önemli eklembacaklı grubu sinekler (diptera) grubudur.

Sinekler (Diptera), dünyanın önemli ve farklı bir grubudur. Bütün dünyada yaygın olup yaklaşık olarak 128 familya ve 150.000 tanımlanan türü vardır ve sayılamıyacak kadar çok yeni tür keşfedilmeyi beklemektedir. Dünyadaki en çok bireyi kapsayan gruptur (10). Bu takımın en önemli özelliği, bir çift zar kanada sahip olmasıdır. Sinekler gündüz aktif olan canlılardır (53). Sinekler, leş ve cesetlerin ayrışmasında aktif rol oynarlar.

Holometabol (Tam başkalaşım) olduklarından larvaları hem görünüş hem de yaşam tarzı bakımından erginlerinden çok farklıdır. Vücutları çok fazla kitinize olmamıştır.

2.7. Adli Entomolojide Ölüm Zamanı Tespiti

Adli entomoloji veya adli böcek bilimi ya da medikokriminal entomoloji, adli bilimlere yardımcı olan ya da onun yetersiz kaldığı durumlarda, ceset üzerinde bulunan böcek ve diğer eklembacaklıların ergin ve larvalarından, maktülün ("cesedin") ölüm zamanını doğruya yakın ya da yaklaşık olarak tahmin etmeye çalışan bir bilim dalıdır (2).

Böcekler, özellikle sinekler, yumurtalarını veya larvalarını cesedin burun deliklerine, göz pınarlarına, anüs ve vajen gibi doğal boşluklara bırakırlar (15, 37, 54, 55). Yaralanmış ya da ölmüş birinin cesedinde ise yumurtalarını/larvalarını yara ağızlarına yerleştirirler (15, 56, 57). Çürüme nedeni ile vücuttaki yaralar belli olmayabilir ancak böceklerin yumurta ya da larvalarını yaralar üzerine bırakması ile yara yerleri de rahatlıkla belirlenebilir. Vücuttaki doğal deliklerin dışındaki kolonizasyon, özellikle el ve avuçtaki larvaların faaliyeti savunma yaralarının varlığını gösterir (15, 33).

Bazı ülkelerde adli entomoloji sadece bahar ve yaz aylarında kullanılmakta olup kış aylarında ve sonbaharda böcek aktivitesi azalmakta ve bu da sınırlayıcı olmaktadır (33). Bizim ülkemizde ise böcekler dört mevsim boyunca yaşam aktivitelerini sürdürebilmektedir.

Düzenli bir şekilde cesede gelen böcekler bir sıra halinde birbirlerini takip ederek, kendilerinden sonra gelecek olan türlere uygun ortamı hazırlarlar. Süksesyon olarak adlandırılan bu olayda, öylesine düzenli bir gelişleri vardır ki her birinin beslenme şekilleri bir diğerinden farklı olduğu için asla biri diğerinden önce gelmez (58). Cesetten yayılan kokuları alan Diptera (çift kanatlılar, sinekler) ordosuna ait türler cesede ulaşırlar. Cesede ilk önce gelenler Calliphoridae (Yapışkan sinekler) ailesine ait olan blowflies (mavi ve yeşil şişe sinekleri) türleri ve bunu takiben Sarcophagidae (Et sinekleri) familyasına ait olan fleshflies (leş sinekleri) türleridir (54, 59). Ceset üzerinde her zaman yumurta görülmeyebilir. Bazı türler ölümden hemen sonra cesedin bulunduğu alana gelir ama çok geç kolonize olurlar ya da gelen türler leşçil olmayan türlerdir. Bazı türlerse yumurta değil larva bırakır. Cesetler üzerindeki böcek aktivitesi, çürümenin çeşitli evrelerinde farklı dalgalar halinde olabilir (15,60).

2.7.1 Ölüm zamanının belirlenmesi

Cinayet veya şüpheli ölüm vakalarında ölümün gerçekleşmesinden sonra geçen zamanın (post–mortem intervalin–PMI) saptanması, pek çok olayın aydınlatılabilmesi ve toplum vicdanı için gereklidir (15,33).

Adli bilimler alanında, incelenen bir cesedin ölüm zamanını belirlemek için çeşitli yöntemlerden yararlanılır. Bunlar ölüm sonrası erken ve geç dönem değişikliklerin belirlenmesine dayanır. Erken dönem değişiklikler solunumun–dolaşımın olmaması, kasların gevşemesi, yüzün sararması, reflekslerin alınamaması, gözlerin parlaklığını kaybetmesi, göz küresinin gevşemesi, korneanın bulanıklaşması, kanın pıhtılaşması, otolizin gelişmesidir.

Ölüm sonrası geç dönem değişikliklerde ise, ölü lekeleri, ölü katılığı, su kaybı, ısı kaybı, çürüme, sabunlaşma, mumyalaşma görülür (40,61). Erken post–mortem dönemde ölüm belirtilerine dayanarak ölüm zamanı saatlerle ifade edilebilir (40,61). Ancak geç post–mortem belirtilerden biri olan ve böceklerin de yardımcı olduğu çürüme, çevre sıcaklığı ve cesedin durumuna bağlı olarak, nadiren 24 saatten itibaren de başlayabilir. Bu geç post–mortem dönemde PMI'in tahmini geleneksel adli tıp yöntemleriyle ancak günler ve hatta haftalarla ifade edilmektedir (40,61). Oysa larvaların büyüme hızlarına dayalı PMI tahmini yeni bir yöntemdir ve saatlerle ifade edilebilir doğruluktadır (59).

Ölüm zamanının belirlenmesinde entomolojik verilerden yararlanılarak yapılan çalışmalar iki sınıfa ayrılabilir. Bunlardan biri, cesede gelen artropodların süksesyonunu ve cesedin çürümesiyle ilgili evrelerin karşılaştırılmasıyla ölüm zamanının tahmin edilmesine dayanır. Diğer yöntem ise; cesede gelen böceklerin hayat döngülerinin araştırılması ve cesette bulunan yumurta, larva ve pupa yaşının hesaplanmasıyla ölüm zamanının tespit edilmesi esasına dayanır (37, 57, 59, 62, 35).

Ölüm sonrası zamanı (PMI) ölçme ve tanımlama, larvaların gelişim sürelerinin tespiti ile yapılabilmektedir. Böceklerin hayatında büyüme evrelerinin ne kadar sürede geçtiğinin bilinmesi, dişi sinek tarafından yumurtanın bırakılma zamanının hesaplanmasına yardımcı olur. Sineğe ait yumurta, larvaların ve pupanın yaş hesabı ile ölümün ne zaman gerçekleştiği tespit edilebilir.

Ceset üzerindeki böceklerin büyüme eğrileri hesaplanarak, ceset üzerinde ne kadar süredir yaşadıkları sorusuna cevap bulunabilinir. Larva boyu ve ağırlığı ölümden sonra geçen zaman hesaplanmasında kullanılmaktadır (57).

Yani ölüm sonrası zamanı tahmin etmede böcekler, adli entomoloğa çok şey anlatabilirler. Ancak sineğin ve sineğe ait büyüme evrelerinin yaşı doğru hesaplansa bile; kurbanın ölümü yumurta bırakılmadan önce gerçekleşmiş olabilir. Bu periyod, oldukça değişkendir ve sıcaklığa,

günün hangi saatinde, yılın hangi ayında öldüğü, cesedin açıkta olup olmadığı, cesedin su yada toprak içine gömülü olup olmadığı gibi faktörlere bağlıdır. Genel kural şudur: Sinekler, ortamın sıcaklığına bağlı olarak cesedin üzerine yaklaşık 24-48 saat içerisinde yumurta bırakırlar. Ceset, sinek larvalarının beslenmesi, büyümesi ve yaşamını devam ettirebilmesi için uygun bir ortamdır.

2.7.2. Ölüm anında cesedin yerinin belirlenmesi

Böcekler şehir içi, şehir dışı, ormanlık alan, çöl ya da sulak alanlar gibi farklı coğrafik ortamlarda yaşarlar. Cinayet vakalarında, cesedi saklamak amacı ile cesedin yeri değiştirilebilir. Cesedin yerinin değiştirilip değiştirilmediğini anlamak için her bölgeye ait böcek faunaları oluşturulmalıdır.

Cesedin etrafındaki lokal fauna ve ceset üzerindeki böcek faunası belirlenip, karşılaştırma yapılırsa cesedin ilk öldürüldüğü yerden hareket edilip edilmediği konusunda sinekler araştırmacılara bilgi verir. Araba parçalarında, radyatörde veya lastik üzerinde böceklere rastlanır. Sinek türlerinin bulunduğu yerlere ve dağılımlarına ait kroki çizilirse yani böceklere ait fauna haritaları oluşturulursa ve her sinek türünün biyolojisi iyi bilinirse şüphelinin nerede olduğuna dair bilgilere ulaşılabilinir.

Belli bir bölgede yaşayan böceklerin farklı bir bölgedeki ceset üzerinde bulunması, cesedin taşındığını kanıtlayabilir. Ancak bunun için bir ülkenin adli böcek faunası iyi bilinmelidir (15, 63, 64).

2.7.3. Sinek larvası kullanılarak DNA analizleri

Larvanın kursak içeriğinin Adli DNA analiz yöntemleriyle incelenmesi, larvanın son yemeği hakkında bilgi verebilir. Bu bilgiler olay yeri ile ilişkilendirilebilir ve kanıt karmaşası bu sayede giderilebilir. Böceklerin tanımlanmasında da aynı analiz yöntemleri kullanılmaktadır (65). Ölüm zamanının tayinini doğru değerlendirebilmek için doğru teşhis yapmak gerekir. Adli entomoloji açısından önemli olan diptera türlerinin yumurta ve larvalarının morfolojik olarak

tanınması son derece zordur (15,66) Teşhis edilecek böceklerin doğru tanımlanması için DNA analiz yöntemleri kullanılır.

2.8. Toksikoloji Bilimi

Toksikoloji kelime olarak ‘zehir bilimi’dir. Zehirin sözlük anlamı; ‘canlı organizmaya girdiğinde sağlığında bozulmaya, hatta ölüme yol açan mineral, bitkisel, hayvansal veya sentez yolu ile üretilmiş maddedir’.

Toksikoloji, kimyasallar ile biyolojik sistem arasındaki etkileşmeleri zararlı sonuçları yönünden veya kimyasalların zararsızlık limitlerini belirleyen bilim dalıdır.16. yüzyılda Paracelsus’un (1493-1541) zehiri tanımlarken kullandığı ‘ her madde zehirdir. Zehir olmayan madde yoktur; zehir ile ilacı ayıran dozdur’ şeklindeki ifade, bugünkü modern toksikolojinin de çıkış noktasıdır. Her kimyasalın doza bağımlı olarak toksik etki gösterebilmesi gerçeği toksikolojinin uğraş konusunu ilaç, kozmetik, tarım ilacı, gıda katkı maddeleri, ev temizlik malzemesi ve endüstriyel kimyasallar olarak çok geniş bir alana yaymaktadır.

Bilim ve teknolojide özellikle son 30-40 yılda yaşanan hızlı gelişme toksisite olarak adlandırılan, kimyasalların organizmada oluşturduğu hasarın belirlenmesi ve toksisite mekanizmalarının hücresel, biyokimyasal ve moleküler düzeyde aydınlatılmasında da yardımcı olmuştur. Her gelişen bilim dalı gibi toksikoloji bilimi de alt dallara ayrılarak gelişmesini sürdürmektedir.

2.8.1. Adli toksikoloji bilimi

Toksikoloji biliminin alanlarından biri Adli toksikoloji bilimidir. Adli toksikoloji, zehirlenme olgularının hukuksal boyutta incelendiği bir araştırma alanıdır. Adli toksikoloji, adaletin oluşması amacı ile zehirleri ve zehirlenmeleri inceleyen bir bilim dalıdır. Genel anlamda toksikoloji, zehirlenmelerin tanı ve tedavileri amacıyla zehirlerin etki mekanizmasını

incelemekle birlikte, adli toksikoloji canlıda ve ölüde ceza hukuku, medeni hukuk ve sigorta hukukunda ortaya çıkan tartışmalı hukuki ilişkileri araştırır. (67)

Bu özel amacı nedeni ile 'uygulamalı toksikoloji' olarak da tanımlanan adli toksikoloji; klinik semptomatoloji, patolojik anatomi, patolojik fizyoloji, biyokimya ve moleküler biyolojiden yararlanır. Ayrıca kimyasal, farmakolojik ve farmakognostik açıdan zehirlerin ve zehirlenmenin varlığını kanıtlamaya çalışır (69,70).

Mondini ve Luzzi'nin kayıtlarına göre ilk adli otopsi bir zehirlenme vakasını aydınlatmak üzere 1302 yılında Bartolomeo de Varignana (ölümü 1308) tarafından uygulanmıştır. 700 yılı aşkın bir süredir adli toksikoloji, adli bilimlerin ayrılmaz bir parçasıdır.

Reuter (1938), Kobert (1902) ve Lewin'e (1807) göre ' zehir' şu şekilde tarif edilebilir:

Zehirler; belirli koşullarda organizmanın doku ve hücreleri ile kimyasal ya da fiziksel etkileşime girerek, organizmanın sağlığına zarar veren, ayrıca ölüme neden olabilen anorganik ya da organik yapılı bileşiklerdir (67,68).

Clarman'ın 1971'de yaptığı tanım şu şekildedir:

Etki şekillerine, organizmanın cins, durum ve kişisel direncine bağlı olarak değişen, belirli bir konsantrasyonun üzerinde alındığında, bu organizmada biyokimyasal değişikliklere neden olan cansız madde veya madde karışımlarına 'zehir' denir. Biyokimyasal değişiklikler de kısa veya uzun süre içerisinde bir dizi semptom veya belirtinin ortaya çıkmasına neden olur.

Görüldüğü gibi değişik araştırmacıların yaptığı zehir tanımında, alınan zehirin etkisi ile zehir miktarı (doz), alınma yolu, ayrıca kişisel reaksiyon şekli arasındaki sıkı ilişki özellikleri vurgulanmaktadır.

Bir bileşiğin zehir olarak etki etmesi başlıca aşağıdaki niteliklerine bağlıdır:

- Çözünürlük; Bir bileşiğin emilebilmesi büyük ölçüde çözünebilirliği ile ilgilidir. Hiçbir şekilde çözünmeyen bileşikler, toksik katyonlar içerseler bile sindirim sisteminden emilime uğramadan geçerek organizmadan atıldıkları için zehir etkisi göstermezler. Örneğin; kuvvetle

toksik olan baryum iyonlarının çözünmeyen bir tuzu olan baryum sülfat, sindirim kanalının radyolojik incelenmesi amacı ile sıklıkla kullanılır ve zehirli değildir. Bu amaçla yanlışlıkla baryum karbonat kullanılması ağır intoksikayon tablolarına yol açar (67).

• Doz; İlaçlarda doz- etki arasındaki ilişki uzun yıllardan beri bilinen bir husustur. Aynı özellik bir maddenin zehir olarak etki etmesi için de geçerlidir. Hipertonik sodyum klorür çözeltisi ile mideleri yıkanan iki çocuğun bu işlem sonucu ölmesi (67,68) tehlikeli olabileceği düşünülmeyen bir kimyasal bileşiğin fazla miktarda kullanımının ölüme varan zehirlenmelere yol açabileceğini gösteren güzel bir örnektir.

• Alınma Şekli; Bir maddenin zehir olarak etki edebilmesi, alım yoluna büyük ölçüde bağlıdır. Örneğin parathion'un öldürücü dozu ağız yolu ile alındığında 300-500 mg olduğu halde, deri yolu ile emilimi için bunun 10 katı bir doz gerekir. Bazı bileşikle ise ağız yolu ile alındıklarında hiç etki etmezler. Örneğin proteinler, protein yapılı hormonlar ve protein olmaları nedeni ile enzimler bu tip bileşiklerdir. 51 aminoasitten oluşan insülin, ağız yolu ile alındığında mide barsak kanalında proteolitik yıkılmaya uğrar ve hipoglisemik etki göstermez. Buna karşılık parenteral yolla belirli bir ünitenin üzerinde kullanılan insülin ise ölüme neden olur.

• Derişim; Mide asiditesi normal olarak Ph 2 dolayındadır. Böyle olduğu halde yüksek derişimde hiroklorik asidin yutulması ağır yanıklara ve nekrozlara yol açar. Benzer şekilde, mufaklarda kullanılan % 5'lik asetik asid zararsız olduğu halde % 80'e ulaşan glasyal asetik asidin yutulması hızla ölüme neden olur.

• Emilim; Bir bileşiğin zehirleyici etkisi kimi zaman emilim hızına bağlıdır. Dolaşım sistemine giren bir maddenin organizma tarafından zehirsizleştirilmesi için gereken süre, emilim hızından daha kısa ise, alınan madde çok toksik olsa bile, zehirlenmeye yol açmaz. Zehirlenmelerde mide yıkanmasından sonra hayvan kömürü verilmesi aynı amaca yöneliktir. Midede kalan, ayrıca ince bağırsağa ulaşmış olan zehirli bileşik kömüre absorblanır, böylece emilmesine engel olunur. Öte yandan yağda çözünen zehirler ile birlikte alkol kullanımı yada zehirsizleştirmek

için süt verilmesi daha hızlı bir emilime yol açabilir. Alınan doz letal sınırı aşmamış olduğu halde, ölümün görülmesi emilimin hızlandırılmış olmasına bağlıdır.

• Atılım; Organizmaya yabancı pek çok bileşik böbrekler tarafından atılır. Atılmanın yavaşlamasına neden olan böbrek hastalıklarının varlığında, tedavi dozlarında bile entoksikasyon tablosu ile karşılaşılır. Bir bileşiğin organizmadan atılmasını etkileyen metabolik kusurların da bulunduğu unutulmamalıdır (Gray-Sendromu) (67).

2.8.2 Biyokimyasal toksikoloji

2.8.2.1. *İlaç ve zehirlerin organizmaya girişi, dağılımı ve atılması*

Bir ilaç veya zehir, ancak hedef organa ulaştığında etki gösterir. Bu nedenle önce organizmaya girmesi, kısacası emilime uğraması gerekir. Bu olayın tek istisnası, daha değdikleri yerde etki gösteren derişik asid ve bazlardır.

İlaç veya zehirler değişik yollarla alınabilir. Alınan yolla bağlı olarak dağılımı da değişir. Dağılımın özellikleri incelenerek paranteral ve enteral yol ayrımı yapılabilir.

Enteral yol ile ince barsaktan organizmaya giren bir bileşik, vena porta ile önce karaciğere ulaşır. Burada hızla metabolize olmaya başlar ve yıkılır. Parenteral yolla alınan bir maddenin ise vena porta dolaşımına katılması geciktiğinden (madde vena porta dolaşımına katılmadığından) enteral yolla alındığı koşullara oranla etkisi değişiktir (67).

2.8.2.1.1. *Atılım*

Kimyasal bir bileşiğin organizmada dağılımı ile birlikte, atılımı da başlar. Böbrek ve safra maddenin atıldığı temel yollar olduğu gibi, maddenin etkin olmayan ürünlere dönüştürülmesi de bir atma mekanizmasıdır. Zehirsizleştirme olarak adlandırılabilecek bu mekanizma büyük ölçüde karaciğerde yer alır.

Kimyasal maddelerin uğradığı değişiklikler büyük ölçüde karaciğerde gerçekleşmekle birlikte, başka organlarda da buna katılır. Tepkimelerin çoğu karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulum ve mikrozomlarındaki enzimlerce katalizlenir. Metabolik değişik yolların ara

basamaklarında görev yapan ve yüksek ölçüde substrat özgüllüğü gösteren enzimlere karşın, karaciğer mikrozomlarındaki bu enzimler karşılaştıkları hemen hemen tümü suda zor çözünen özellikteki yabancı maddeler arasında bir seçim yapmazlar. Bunları genellikle yükseltgeyerek, daha polar bir şekile dönüştürür, böylece sudaki çözünürlüklerini arttırırlar. Daha sonra bu maddeler ya kan dolaşımına katılır, ya da safra ile atılırlar.

Karaciğer hücrelerinin bu maddeleri glukuronik asid, sülfat asidi veya glisinle konjugasyonu da sudaki çözünürlüğü arttıran birer işlemdir. Sudaki çözünürlüğün sağlanması, yabancı maddenin idrar yolu ile atılabilmesi için mutlaka gereklidir.

Karaciğer, çeşitli ve miktar bakımından en fazla biyotransformasyon yapan enzimleri içeren yapıdır. Enzimler bu organın düz endoplazmik retikulumuna lokalize olmuşlardır. Bu şebekenin fraksiyonları karaciğer homojenatlarından santrifüjleme yolu ile izole edilmiştir ve genel olarak mikrozomlar olarak adlandırılırlar. Karaciğer fonksiyonu, akut ve kronik karaciğer parankiması hastalıkları, yaşlanma, hepatotoksik ilaçlarla yetersiz duruma gelmişse ilaçların detoksikasyonu azalacağı için ilaçlar daha güçlü ve toksik etkiler gösterebilirler (67,68).

2.9. Adli Entomotoksikoloji Bilimi

Adli entomoloji ve toksikoloji arasında özel bir alan olan entomotoksikoloji, cesede ait doku ve vücut sıvısı yokluğunda, cesetlerden beslenen böceklerdeki toksik maddeleri kalitatif ve kantitatif metotlar ile tespit ederek, şüpheli ölümlerin nedenlerini araştırır (71). Entomotoksikoloji, böceklerden toksik maddelerin belirlenmesi ile toksik maddelerin böcek gelişimine etkilerini araştırır. Böcekler, toksikolojik analizlerde kullanılarak güvenilir verilerin elde edilmesini sağlar. Toksik maddeler kimyasal ve analitik özelliklerine göre adli toksikolojik metodlar ile tayin edilirler. Şüpheli ölümlerin aydınlatılmasında adli bilimlere yardımcı olmasından dolayı bu alana ilgi artmıştır (4,5,6,8).

Entomotoksikoloji, Adli Bilimler'de yeni bir araştırma alanıdır. Entomotoksikoloji çalışmaları, zehirlenme sonrası dokularda bulunan ilaç ve zehirlerin tanımlanabilmesi için leşle beslenen böceklerin toksikolojik analizini kapsar. Ölüme neden olan etken madde ile ilgili araştırmalarda, doku ve biyolojik sıvı örneği bulunamadığında, kemik iliği ve saç gibi dokular, bunlar da elde edilemediği durumlarda toksikolojik analiz için Dipterler (Sinekler) ve diğer Artropodlar (Eklembacaklılar) güvenilir alternatif materyallerdir. Böcekler homojenize edildikten sonra, Radyoimmünassay (RIA), Gaz Kromatografisi (GC), İnce Tabaka Kromatografisi (TLC), Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi–Kütle Spektrometrik (HPLC–MS) ve Gaz Kromatografisi–Kütle Spektrometrik (GC–MS) analizleri gibi genel toksikolojik analiz prosedürleri ile kolaylıkla analiz edilebilirler.

Entomotoksikoloji ayrıca, ilaç ve zehirlerin artropodların gelişimi üzerindeki etkilerini de inceleyerek ölüm sonrası zamanı (postmortem intervali) (PMI) hesaplar. İlaca bağlı (başlıca eroin ve kokain) ölümlerdeki artışın yanı sıra kasıtlı veya kazayla zehirli madde alımına bağlı ölümlerde ölüm nedeni olan toksik maddenin tanımlanması ve doğrulanması gereksinimi, adli bilimlerde bu dala ilgiyi artırmaktadır (15).

Bu çalışmada, entomotoksikolojinin "Adli Bilimlere" olan katkıları araştırılarak tartışılacaktır. Ayrıca, ilaç ve toksinlere bağlı ölümlerde artropod gelişimi değerlendirilerek ölüm zamanı tayini çalışmaları da, entomotoksikolojinin ilgi alanı içindedir. Böcekler çok kolay homojenize olurlar ve genel toksikolojik analiz prosedürleriyle kolaylıkla analiz edilebilirler (4,5,6,8).

2.9.1. Adli entomotoksikolojinin tarihçesi

Mathiew Orfila, modern toksikolojinin babasıdır. Orfila, insan kadavrasına gelen böceklerin dağılımı ile ilgili ilk sistematik çalışmayı yapmıştır (14). 1970'lere kadar entomoloji bilimi toksikolojik analizlere başlamıştır.

Son 30 yıldır, ABD ve Avrupa'da kriminal araştırmalarda böceklerin analizi önem kazanmıştır. Entomoloji ve Entomotoksikoloji, adli bilimler araştırmalarının ilgi çeken ve gelişmeye müsait disiplinleri olmuştur. Çünkü;

- Ölüm zamanı hesaplamaları,
- Ölüm mevsiminin araştırılması,
- Ölümün meydana geldiği lokal coğrafi özellikler,
- Ölümden sonra cesedin taşınıp taşınmadığı,
- Vücuttaki spesifik travma bölgelerinin saptanması,
- İlaç kullanılıp kullanılmadığı (madde bağımlılığının tanısı),
- Olay yeri veya cesette oluşturulan değişiklikler,
- Çocuk istismarı,
- Tecavüz olaylarının aydınlatılmasında arthropodlar önemli materyallerdir (72).

Leonardo da Vinci (1452-1519) "geçiş" adı verilen bir teknik üzerinde çalışmıştır. Zehirli enjeksiyon yaparak öldürdüğü hayvanların organlarını çıkarıp zehri ekstrakte etmiş ve bu organlardan elde ettiği zehiri başka hayvanlara vermiştir. Tekrar edilen her bir geçişte zehrin gücünün arttığı ileri sürülmüştür (8).

Adli toksikoloji çalışmalarının ilki ABD'de, 1918 yılında New York'ta kimyacı Alexander O. Gettler'in laboratuvarında gerçekleşmiştir. Gettler ilk olarak intoksikasyonda kan-alkol seviyesini belirlemiş ve Gettler'le arkadaşları 1918'de alkol tüketimi ile trafik kazaları arasındaki ilişkiyi ortaya koymuşlardır (8).

Zehirlenmeye bağlı ölümlerde zehirlerin toksikolojik analiziyle ilgili çalışmalar ilk kez, ölüm zamanının araştırılması amacıyla 1958'de sıçanlar üzerinde yapılmıştır (73).

1970'lerin sonlarında Sohal ve Lamb, bakır, çinko ve demir gibi metallerin Muscidae familyasından ergin Musca domestica (Linnaeus)'da biriktiğini göstermişlerdir (74). Aynı şekilde, metil cıva içeren balıklarla beslenen Calliphoridae türlerinin yetişkin, pupa ve

larvalarında cıva saptanmıştır. Cıva, balıkla beslenen Diptera türlerinin larvalarında da bulunmuştur (75).

Dipterlerde tayini yapılan maddeler şunlardır:

Metaller (civa,çinko,bakır,demir) (74,75), Organik fosfatlar (8), Trisiklik antidepresanlar (76), Barbitüratlar (30), Benzodiazepinler (77,78), Metamfetamin (13), 3,4–metilendioksi metamfetamin (MDMA) (8), Opiyatlar (Morfin (79,81), Kokain (80), Eroin (8), Analjezikler (Asetaminofen) (30).

Bu entomotoksikolojik deneyimler daha sonra adli olayların aydınlatılması amacıyla kullanılmıştır. İlk kez 1977'de Finlandiya'nın kırsal kesiminde bulunan ve bir kadına ait olduğu tespit edilen çürümüş kadavradan alınan Diptera türlerinin larvalarında yapılan toksikolojik analiz sonucu bulunan civa, cesedin hangi bölgeden geldiği hakkında olası bir bilgi olarak değerlendirilmiş, özellikle serbest cıva kirliliği olan bir bölgeden olabileceği üzerinde durulmuştur (78).

Entomotoksikolojik analizlerle madde bağımlılığı ve suistimalinin de tanımlanabildiği 1980'de yapılan araştırma ve analizlerle ortaya konmuştur. Beyer ve arkadaşları, reçeteli ilaçlardan olan barbitüratları, 22 yaşındaki bir kadının çürümüş kadavrasından alınan larvalarda saptamışlardır. Ölümden sonra çürümenin gelişmesiyle orantılı olarak toksikolojik analiz için gerekli organik sıvı ve dokulardan yararlanmak zorlaşabilir veya gerekli biyolojik materyal bulunamayabilir. Oysa, Calliphoridae türlerinin larvalarında GC ve İTK analizleriyle fenobarbital varlığı saptanmıştır (30).

Miller ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada taze, 4 ve 6 günlük iskelet kas dokuları ile larva ve pupa gelişim dönemlerinde ölçülen Amitriptilin, Nortriptilin, Propoksifen ve Asetaminofen konsantrasyonları karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalı araştırmalarda, insan dokuları ve larvalarda bulunan bazı ilaç konsantrasyonları arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (83).

Kintz ve ark. kadavra serebral dokusu ve larvalarda, “Bromazepam” ve “Levomepromazin” düzeylerini araştırdıklarında, larvalarda ilaçlar saptanabilirken kadavra dokusunda ise tamamen bozunduğunu göstermişlerdir. Aynı araştırıcılar, ölümünden yaklaşık 10 gün sonra bulunan eroin bağımlısı bir kişinin kadavrasından alınan kan, karaciğer, kalp, böbrek ve beyin dokuları ile Calliphoridae türlerinin larvalarında morfin ve fenobarbital saptamışlardır. Her iki materyal de GC ve Floresan Polarizasyon İmmünoassay (FPIA) yöntemleri kullanılarak analiz edilmişlerdir. FPIA ile yapılan analizlerde her zaman pozitif sonuçlar alınmıştır (78).

Bu araştırmalar sonucunda, entomotoksikolojik çalışmaların leş sinekleri ve kınkanatlıların besin kaynakları konusunda da bilgi verdiği söylenebilir. Örneğin; Phoridae familyasına ait türler ilaç konsantrasyonlarının yüksek oranda bulunduğu yumuşak organlara yönelirken Dermestidae türleri kurumuş deri üzerinde beslenmektedir (83).

Nolte ve ark., ölümünden yaklaşık 5 ay sonra tamamen iskeletleşmiş halde bulunan 29 yaşında bir ilaç bağımlısının cesedinden toplanan Dipter larvalarını kokain intoksikasyonunu araştırmak üzere toksikolojik analize almışlardır. Kokain stabil olmamasına ve hem enzimatik hem de enzimatik olmayan mekanizmalarla hızla metabolize olmasına karşın kendisi ve ana metaboliti benzoilekgonin larva ve cesetten alınan materyallerde saptanabilmiştir. Bununla birlikte, kas örneklerinde, doku dekompoze ürünleriyle bir karışıklık söz konusu olduğundan GC ile kantitatif analiz yapılamamıştır. Dolayısıyla, bu olayda olduğu gibi bazı durumlarda larvalar, herhangi bir dekompoze ürünle karışmadığından en güvenilir ve uygun materyallerdir (80). Kokain, morfin ve diğer ilaçlar, ölümü izleyen yıllar sonrasında ve hatta binlerce yıllık mumyalarda bile saçta bulunan protein matriksinde tanımlanabilmektedir. Bu bileşiklerin pupa kınındaki protein matriksinde de birikebildiği düşünülmektedir (80,81).

İlaç veya zehirlerin larvalarda biriktiği ve absorbe olan miktarları eliminasyon oranını geçtiğinde kantitatif olarak değerlendirilebildiği gösterilmiş olmakla birlikte bu maddelerin larvadaki metabolizma ve larva gelişimi üzerindeki etkileri henüz tam olarak

aydınlatılamamıştır. Ölüm zamanının hesaplanmasında larvaların (kurtçukların) kullanımından önce ilaç ve zehirlerin Diptera gelişimi üzerindeki etkilerinin çok iyi ortaya konmuş olması gerekmektedir.

Malation zehirlenmesine bağlı bir ölümde tüm deliller 8 günlük bir ölüm zamanını göstermesine karşın, *C. megacephala* ve *C. rufifacies*'in gelişme devrelerine bakılarak ölüm zamanının minimum 5 gün olduğuna dair verilen raporun yanlışlığını ilk kez Goff, dikkatli bir incelemeyle ortaya koymuştur. Malation, kurtçukları öldürmemişti ancak, gelişmelerini geciktirmişti. Bununla birlikte, entomolojik incelemelerle ölüm zamanı hesaplarında, cesedin açık ya da kapalı bir alanda bulunması ve bulunduğu çevredeki sinek ve böcek çeşitliliği de göz önünde bulundurulmalıdır. Bu olguda, sadece iki tür sinek larvasının bulunması araştırıcıları dokularda malation bulunmasının sinek ve böcek saldırısını geciktirici olduğunu düşündürmüştür (84).

Carvalho ve ark., diazepam intoksikasyonuyla ilgili bir araştırmalarında, ilk birkaç saatin larva gelişimi üzerinde bir etkisi olmamasına karşın 18. saatten sonra diazepamın larva gelişimini kontrol grubuna göre hızlandırdığını gözlemişlerdir. Yani, pupalaşma için gereken süre kısalmıştı. Ayrıca, ilaca maruz kalan larvaların ağırlığı da kontrol grubundakilerden yaklaşık 2 kat daha fazlaydı (77).

Bu veriler ışığında araştırıcılar, pupalaşma süresince ölüm zamanı hesaplamalarında hatanın 47 saate kadar değişebileceğini, bu durumun larva gelişim süresiyle birlikte ele alındığında ise 77 saate kadar değişen bir hesap hatasına neden olabileceğini bildirmişlerdir (77).

Eroin bağımlılarının kadavralarına yerleşen böceklerin pupalarındaki morfin düzeylerinin, yetişkinlerden daha yüksek olduğu ortaya konmuştur (85,86). Larvaların beslenme sonrası evrelerinde ilaçlar elimine olmaya başlar. Bu, metamorfoz öncesi bir atılımdır. Larval atılımın diğer bir göstergesi pupa kozasında az miktarda morfin saptanmasıdır. Özellikle pupa kozaları ölümden yıllar sonra dahi değerlendirilebilecek toksikolojik öneme sahip değerli materyallerdir. Bu tip çalışmalar GC/MS tekniği kullanılarak yapılır ve GC/MS tekniği

morfinin larvadaki metabolizmasını da anlamamıza yardımcı olur. Bu şekilde, ilaçların larvalardaki değişimlerini kıyaslamak da mümkün olur (86).

2.9.2 Adli entomotoksikolojinin adli bilimlerdeki önemi

Sankhla ve ark., 2017' de yayınladıkları derlemede; Entomotoksikoloji'yi, 'Ceset ile beslenen eklembacaklılar grubundaki başlıca sinek ve böceklerin toksinlerinin incelenmesidir' şeklinde tanımlamışlardır. Bu derlemede; aynı zamanda bir ceset içindeki uyuşturucuların, bu cesetden beslenen böceklerin gelişme oranını etkileyebildiği de vurgulanmıştır.

ABD ve dünyanın geri kalan ülkelerinde uyuşturucuya bağlı ölümlerde bir artış olduğu tespit edilmiştir. Adli Entomotoksikoloji alanı, son 10 yıldır dünyada hızla büyüyor. Şu an, böceklerde ilacın keşfi kesinlikle mümkündür. Henüz bütün toksikolojik analizler için böcekler kullanılamasa da; ölüm sonrasında sadece iskeletleşmiş kalıntılar kaldığında, bir toksikoloğun bilgi elde edebilmesi için tek umudu pupa olabilir.

Ölüm zamanı hesaplamaları, toksikolojik analizle tanımlanan maddenin larva ve pupa gelişimi üzerindeki etkileri göz önünde tutularak yapılmalıdır (87).

Böceklerde metal ve ilaçların biriktiğini gösteren öncü çalışmaların ardından, gerçek anlamda entomotoksikolojinin adli bilimlerde bir bilim dalı olarak gelişmeye başlaması, ölüm zamanı ve ölüm nedeninin belirlenmesinde dipterlerden yararlanılması ve ilaçların diptera gelişimi üzerine olan etkileri ile ilgili araştırmaların son on yılda yoğunlaştığı görülmektedir (6,8).

İlaç ve bağımlılık yapan maddelerin dipteradaki metabolizmalarıyla ilgili bilgilerin artmasıyla, ölüm olgularının aydınlatılmasında entomotoksikolojik verilerin önemi de yadsınamaz şekilde artacaktır.

Sonuç olarak;

1. Larvalar kolaylıkla toplanabilen ve laboratuvar koşullarında saklanabilen materyaller olup, dokulara göre daha az kontamine olma olasılığı vardır. Eğer, çürümüş bir cesette larvalara

ulaşma veya toplama sıkıntısı varsa birçok toksikolojik analiz için pupalardan da yararlanmak mümkündür.

2. Postmortem interval hesaplamalarında, yanlışlıklardan kaçınmak için ilaçların diptera gelişimi üzerindeki etkileri ile ilgili araştırmalara gereksinim vardır; maruz kalınan ilaç miktarı ve maruziyet süresi larva gelişimi için önemli faktörlerdir. Bu nedenle, Entomotoksikoloji, klasik adli yöntemleri destekleyen yeni teknikler geliştirmek zorundadır.

3. Adli araştırmalarda, doku çürümesi başlamış ve biyolojik sıvı alınamıyorsa, ilaç veya zehir alımına bağlı ölümlerde özellikle, ölen kişi yalnız yaşayan biriyse, ölüm zamanı ve nedenini belirlemek güçleşir. İlaçların, leşle beslenen böcekler üzerindeki etkilerinin araştırılması ve veri olarak değerlendirilmesi ölüm zamanı hesaplamalarında yararlı bir bilgi kaynağı olacaktır. Entomotoksikoloji, cesedin bulunduğu zamanla ölüm zamanı arasındaki minimum ve maksimum zaman aralığını anlamaya yardımcı olur (88-90).

4. Her ne kadar vücut organ ve sıvıları bulunmadığında larva (kurtçuk) kullanımı yararlıdır dense de organ ve biyolojik sıvı bulunduğu durumlarda bile kurtçuklardan yararlanılması gerektiği savunulmaktadır. 1990'larda Pascal Kintz, hem doku ve organlar hem de kurtçuklarda yaptığı analizlerden 5 olgunun sadece 4'ünde ilaç pozitif sonuç verirken kurtçuklarda yapılan analizlerin tümünde pozitif sonuç alınmıştır (10).

5. Ölümle ilgili adli araştırmalar; Olay Yeri İnceleme Uzmanları, Entomologlar, Adli Patologlar, Adli Tıp Uzmanları, Adli Toksikologlar, Antropologlar gibi farklı disiplinlerden uzmanların işbirliğini gerektirir (91). Açıklanamayan veya şüpheli ölümler genellikle yasal yollarla araştırılır. Oysa yukarıda adı geçen bilim dallarının yardım ve katkısı olmadan ölümle ilgili bulgulara ulaşmak yetersiz kalabilir. Eğer cesedin üstünde böcekler bulunmuşsa diğer biyolojik delillerle birlikte böcekler de değerlendirmeye alınmalıdır (92). Böceklerin cesedin çürümesine olan etkileri çok iyi bilinmesine karşın ne yazık ki yıllarca, kadavra otopsiye alınmadan önce ceset üzerinde bulunan diğer pisliklerle birlikte sinek ve böceklerden de

temizlenmiştir. Bu nedenle, olay yeri incelemelerinde, adı geçen uzmanların birlikte çalışması yararlıdır.

Adli Entomotoksikoloji; cesede ait doku ve vücut sıvısı yokluğunda, cesetlerle beslenen böceklerdeki toksik maddeleri kalitatif ve kantitatif metotlar ile tespit ederek, şüpheli ölümlerin nedenlerini araştırır ayrıca ölüm sonrası zamanın (PMI) doğru hesaplanmasına yardımcı olur. Bu bilimden yararlanabilmek için kullanılabilecek en önemli materyal böcektir.

2.9.3. Postmortem ilaç redistribüsyonu

İlaç dağılımı, lipofiliklik, pKa, enerjiye bağlı taşıma ve ilacın doku afinitesi gibi bir dizi faktöre dayanır (93). PMR ile ilgili olarak, iki önemli nokta vardır. İlk olarak; lipofilik ilaçlar ve organik bazlar, akciğerler, karaciğer ve miyokard gibi katı organlarda yoğunlaşacaktır. Bu ölümden sonra pasif difüzyon için bir konsantrasyon gradyanı sağlar. İkincisi, bir hücrenin içeriği büyük ölçüde sulu olup ölümden sonra asidik hale gelir. Bazik bir ilaç gittikçe artan bir asidik ortamda giderek daha fazla iyonize olacağından, hücre erimesinden sonra, bazik ilaçlar çözündükleri asidik sıvı içinde taşınmaları sonucunda daha kolay dağılacaktır.

TCA' lar, PMR konsepti için belki de en kapsamlı araştırılmış ilaçtır, hatta diğer ilaçlarla karşılaştırılmasında kontrol grubu olarak bile kullanılmaktadır. Çok miktarda dağılım gösterirler, baziktirler ve oldukça lipofiliktirler. TCA' lar akciğerlerden yeniden dağılabilir ve pulmonervenöz sistem aracılığıyla sol kalp odalarına konsantre olabilir. Ek olarak, miyokardiyuma bağlanabilir ve bu nedenle sol ve sağ kalp odalarına salınabilir.

2.9.4. Karaciğer

Karaciğer postmortem toksikolojide kullanmak için saklanabilen bir doku olmuştur ve bu dokudaki sonuçlar kandaki toksikoloji verilerini desteklemektedir (94).

Karaciğerde, birçok toksik madde kandan daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur (95). Karaciğer yangın veya ayrışma nedeniyle kan bulunmadığında veya az bulunduğunda, ölüm sonrası zamanda toksikolojik analizler için önemli bir biyolojik dokudur. Karaciğerin, geniş bir

dozaj aralığı olan trisiklik antidepresanlar ve fenotiyazin nörol eptiklerinin belirlenmesinde de özellikle uygun olduğu bilinmektedir.

Karaciğer ve akciğer dokusu, ilacın yapısına ve ilacın difüzyonunun komşu dokulardan mı yoksa kan beslemesinden mi kaynaklandığına bağlı olarak ilaç konsantrasyonunda farklılıklar gösterir. Örneğin, karaciğerin sol lobunun sağ lobdan daha yüksek ilaç konsantrasyonları sergileme olasılığı daha yüksektir.

2.9.5. Morfin

Morfin, afyonun başlıca alkaloididir ve opioidlerin prototipidir. İlk olarak 1806 yılında Friedrich Wiiheim Adam Sertürner, izole ettiği bu yeni alkaloide``principium somniferum`` adını vermiştir. Daha sonra bu alkaloidin adı morfin olarak değiştirilmiştir.

Morfinin etki mekanizması, diğer opioidler gibi yapı-aktivite ilişkisine dayanır. Morfin, T-şeklinde pentasiklik sert bir yapıya sahiptir. Bu yapı üç boyutlu olup 2 optik izomeri vardır. Analjezik etkisinden sorumlu olan L- izomeridir.

Kimyasal ismi: (5α, 6α) -7,8-Didehidro – 4,5 – epoksi – 17-metilmorfinan-3,6-diol monohidrat (96).

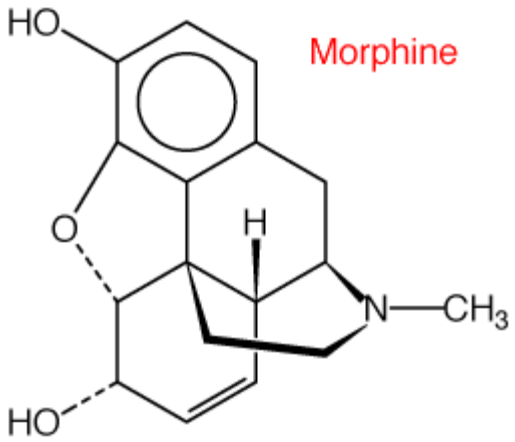
Molekül formülü: $C_{17}H_{19}NO_3$

Molekül ağırlığı: 285,4 g/mol

Kütle Spektrumu:

M / z 285, 162, 42, 215, 286, 124, 44, 284'te ana iyonlar; kodein 299, 42, 162, 124, 229, 59, 300, 69; norcodeine 285, 81, 215, 148, 286, 164, 110, 115; normorfin 271, 81, 150, 201, 148, 110, 272, 82.

Açık Formülü:



Morfin güçlü bir ağrı kesicidir. Ameliyat sonrası ağrıyı hafifletmek için yaygın olarak kullanılır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından ileri kanserle ilişkili orta ila şiddetli ağrıyı tedavi etmek için önerilmektedir (97).

Saklanması zor bir materyaldir. Morfin donmuş olarak saklandığında numunelerde nispeten kararlıdır, ancak birkaç günden daha uzun süre 48 ° C veya daha yüksek sıcaklıklarda veya ölüm sonrası numunelerde saklandığında önemli kayıplar gösterir (94). Deri altı uygulamasından sonra hızla emilir (96). İntramüsküler uygulamadan sonra iyi absorbe edilir.

Etki başlaması 15-30 dakikadır. ‘’Peak” etkiye 45-90 dakika içinde ulaşır. Oral uygulamada etki 15-60 dakika arasında başlar; ancak gastrointestinal sistem absorpsiyon her zaman tahmin edilebilir durumda değildir. İntravenöz uygulama en güvenilir ve en hızlı etki başlangıcını sağlar, ilk 1 dakikada başlar, 5-20 dakika içinde ‘’peak” etkisi görülür. Analjezi dozu 0,05- 0,2 mg/kg (ıv) uygulanım sonrası 1,2-2,5 dakikalık ilk hızlı distribüsyon fazı başlar, uygulamadan sonraki 10 dakika içinde ilacın % 96-98’ i plazmadan temizlenir.

Morfin, dokulara büyük miktarlarda bağlandığından dağılım volümü nispeten geniştir. İntravenöz uygulandığında hızla plazmadan uzaklaşır ve plazma konsantrasyonları ile farmakolojik aktivitesi arasında korelasyon göstermez. Intramüsküler ve subkutan uygulandığında, plazmaya olan dağılım daha yavaş ve sürekli olmaktadır. Serbest morfin

seviyeleri karaciğerde en yüksektir (98). Femoral kan, karaciğer, beyin omurilik sıvısı ve vitreus mizahında eroin metabolitlerinin postmortem dağılımı. Morfinin büyük kısmı karaciğerde, fenolik hidroksil grubu üzerinden glukuronata bağlanarak morfin-3-glukuronata dönüştürülür; bu inaktif bir metabolittir. Az bir kısmı ise alkolik hidroksil grubu üzerinden morfin-6-glukuronata dönüşür ve analjezik etkilere sahiptir, solunum depresyonuna sebep olabilir.

8 yaşında bir kız, yatmadan önce yanlışlıkla morfin almış ve ertesi sabah ölü olarak bulunmuştur. Kandaki morfin konsantrasyonu 0.128 mg / L, safradaki, 135 mg / L idi ve mide içeriğinde 16 mg / L konsantrasyonunda (toplam 2,3 mg) morfin bulundu. Ölüm nedeni solunum depresyonu ile sonuçlanan morfin zehirlenmesi olarak belirlendi (99).

Morfin özellikle böbrekler tarafından % 75-85 oranında morfin 3-glukuronid ve % 5-10 oranında morfin 6-glukuronid olarak atılır. Böbrek hastalığı olanlar uzamış etkilerden dolayı risk altındadır. Monoaminoksidaz inhibitörü kullananlarda morfin konjugasyonu bozulabilir. Bu morfinin artmış etkilerine sebep olur. Morfinin eliminasyon yarı ömrü 2-4 saattir. Morfin uzun etkili bir opioiddir. Analjezik etkisi ortalama 1-3 saat sürer ama bu etki 6 saate kadar uzayabilir. Morfinin eliminasyon yarı ömrü fentanilinkinden kısadır ama klinik etkileri uzun sürer. Spinal veya epidural morfinin etki başlangıç süresi daha yavaştır (15-60 dakika) ve intramüsküler/intravenöz uygulamayla kıyaslandığında etki süresi daha uzundur (6-24 saat). Yetişkinler için tahmini minimum oral öldürücü doz 200 mg'dır, ancak bağımlılar 10 kat fazla miktarıtolere edebilir. Morfin başlangıçta kandan oldukça hızlı bir şekilde elimine edilir ve özellikle toksik etkilerin elde edilen tolerans derecesine bağlı olması nedeniyle kan konsantrasyonlarının yorumlanması zordur.

Fazla miktarda kontrollü morfin tableti tüketen 46 yaşında bir kadın. Tahmin edilen alımdan 60 saat sonra, morfin, morfin-3-glukuronid ve morfin-6-glukuronid plazma konsantrasyonları

sırasıyla 0.655, 6.504 ve 1.157 mg / L; idrarda morfin ve metabolitlerinin geri kazanımı, en az 2500 mg oral alımına eşdeğer 6.8mmol olmuştur (100).

Morfin hidroklorürün (M) çözünürlük limitleri, su içinde 50mg / ml, % 5 dekstroz ve % 22 NaCl'de 30 mg / ml, 22 ° C'de sırasıyla 30 ve 20 mg / ml'ye düşen değerler olarak belirlenmiştir. 4 ° C ağrı (101) . M çözeltilerinin NaCl veya dekstroz ile izotonizasyonu, oda sıcaklığında herhangi bir çözünürlük problemine neden olmamıştır. 4 ° C M çözeltilerinde 20 mg / ml'nin üzerindeki bir konsantrasyonda depolanırken, yeniden çözülmesi zor olan beyaz bir çökelti oluşmuştur. Rezervuarın türü ve çözeltinin bileşimi, morfinin bozulması üzerinde sadece küçük bir etkiye sahiptir. Bu çalışma, konsantre morfin çözeltilerinin, test edilen tüm koşullar altında 3 ay boyunca stabil olduğunu, ancak çökeltilmeyi önlemek için 22 ° C'de saklanması gerektiğini gösterir (102).

2.9.6. Amitriptilin

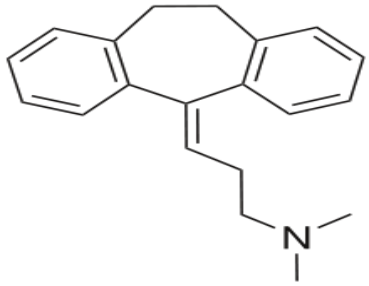
Sedatif etkisi olan bir trisiklikantidepresan ilaçtır. Klinik antidepresif mekanizması belirsizdir fakat çeşitli nörotransmitterlerin (serotonin ve norepinefrindahil olmak üzere) nöral membrandan geri emilimini blokladığı görülmüştür. Çeşitli ruhsal rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmakla birlikte (büyük ölçüde depresyon tedavisinde) kronik ağrı sendromu, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu, migren, nöropatik ağrı ve uyku düzensizliklerinde kullanılıp kardiyovasküler sistemde ve çevresel ve sinir sistemindeki yüksek doz zehirlenmelerinde adı sıkça geçen bir trisiklikantidepresandır

3- (10,11-dihidro-5H-dibenzo [a, d] siklohepten-5-iliden) -N, N-dimetil-1-propanamin

$C_{20}H_{23}N$=277.4

pK_a =9.4 (25°).

Açık formülü



Kütle Spektrumu: m/z'deki temel iyonlar 58, 59, 202, 42, 203, 214, 217, -; 10-hidroksiapirriptilin 58, 42, 69, 41, 30, 215, 202, 59; 10-hidroksinortriptilin 44, 45, 26, 218, 215, 203, 202, 42; nortriptilin 44, 202, 45, 220, 218, 215, 91, -.

Terapötik konsantrasyon: Plazmada, genellikle 0.1 ila 0.2 mg / L (birleşik amitriptilin ve nortriptilin).

Plazma konsantrasyonları 0.05 ila 0.43 mg / L (ortalama 0.17) orta düzeyde sarhoşluğa neden olur. Konsantrasyonları 0.3 mg / L'den daha yüksek olan plazmalar ciddi toksik semptomlarla ilişkilidir. Ölümcül kan konsantrasyonu aralığı 0,55 ila 16,1 mg / L'dir (ortalama 3,3). Aşırı doz amitriptilin dozuna atfedilen 7 ölümde, postmortem konsantrasyonlar, mg / L veya mg / kg (ortalama);

Amitriptilin	Nortriptyline
Kan 0.43–8.30	0.29–6.50
Karaciğer 10,4–243	4,2–456 (103)

Aşırı dozda amitriptilin alınarak gerçekleşen intahar vakasında, vücudun bulunmasından 21 saat sonra ve ilacın alımından yaklaşık 28,5 saat sonra alınan 10 kan örneğinde 2.5 ile12 mg/L amitriptilin, 0.7 ila 3.1 mg / L nortriptilin ve 81 ila 244 mg / L salisilat saptanmıştır; 10 saat sonra, konsantrasyonlar sırasıyla 1 ila 39 mg / L, 0.6 ila 7.0 mg / L ve 86 ila 310 mg / L olarak ölçülmüştür. Doku örneklerinden karaciğerde ilaç konsantrasyonları en yüksek olduğu saptanmıştır (amitriptilin 301 mg / kg, salisilatlar 670 mg / kg). (104). Biyoyararlanımı % 30

ile % 60 arasındadır ve aşırı dozda artan 9 ile 36 saatlik bir yarı ömre sahiptir (105). Protein bağlanması plazmada % 91 ila 97'dir.

2.10- LC-MS/MS

LC-MS/MS (high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry) tekniğinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan moleküller kütle dedektörü ile analiz edilmektedir. İyonlaşma odasında iyonlaştırılan ve birincil paralanmaya uğratılan moleküller, birinci kuadrupol filtrede m/z (kütle/yük) oranına göre ayrılır. Tayin yapılacak iyon filtreden geçer, diğerleri kalır. Filtreden geçen iyon moleküller collision gas adı verilen yüksek saflıkta özel bir gaz ile parçalanmaya tabi tutulur. İkinci kuadrupol filtrede parçalanma sonucu oluşan iyonlardan ikincil iyon detektöre ulaşır ve bu iyon üzerinden teşhis ve miktar tayini yapılır.

Aynı kütle/iyon (m/z) oranına sahip pek çok molekülün mevcut olmasına karşın aynı parçalanma iyonlarına sahip molekül doğada 1/10000' dir. Bu nedenle LC/MS/MS tekniği neredeyse babalık testi kadar özgün bir test olmasının yanı sıra çok düşük konsantrasyonlarda maddenin miktar tayininin yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca sonuçlarının doğrulanmasına da gerek duyulmamaktadır.

Standart HPLC tekniğinde madde sadece alıkonma süresine (rt) göre teşhis edilirken LC/MS/MS teknolojisi ile alıkonma süresine (rt) ek olarak "ham ve ürün" iyonlarla değerlendirilmektedir.

Madde enjeksiyondan sonra Guard (koruyucu) kolondan geçerek yağlar ve diğer kolon tıkayıcı maddelerden korunarak analitik ayırmanın gerçekleştirileceği kolondan mobil faz karışımı içinde geçer. Kolonda elüsyon gerçekleşirken maddeler kolon duran fazına olan farklı ilgilerine göre kolonda birbirlerinden ayrılır. Ayrımı gerçekleştirilmek istenen maddelerin özelliğine göre optimum mobil faz karışımı kullanılarak (A ve B mobil fazların en uygun karışım oranları),

piklerin birbirinden ayrılması sağlanır. Kolonla etkileşimde ve madde bileşenlerinin birbirinden etkin olarak ayrılmasında en etkili faktörlerden biri polarite, diğeri de pH' tır. Maddenin hangi oranda non-iyonize formda bulunacağı ortamın pH' ına bağlı olduğundan, suya tampon özelliği olan uçucu tuzlar katılabilmektedir. Zira maddenin alıkonma zamanı ortamın pH değerine bağlıdır. Mobil fazlar degaze edilerek sisteme hava veya başka gazların girmesi engellenir.

Kolondan çıkan madde (sıvı) MS' in iyon kaynağına gelir. Orada (ESI) Elektron Sprey İyonizasyon sistemi ile iyonlaşır. Mobil faz içindeki madde/maddeler, atmosferik basınçta mobil fazla birlikte iyonlaşma odasına yüksek voltajlı bir iğneden püskürtülürken iyonlaşır, yüklü damlacıkların içindeki yüklü tanelerin açığa çıkması için, sıcak kurutucu gaz damlacıkları kurutur (106). Damlacıklar küçüldükçe, içindeki yük konsantrasyonu artar. Bir yandan da, iyonlar arasındaki itme kuvveti dekoheziv kuvvetleri aşınca, iyonlar gaz faza geçer. Yüklü iyonlar açığa çıkar ve voltaj açısından farklı bir levhaya doğru hızlandırılır. Bu levhanın ortasındaki kapiller örnekleme deliğinden geçerek MS detektöre yönlendirilir. İyonlaşmayanlar atık borusuna gider (önemsiz miktarda).

Electrospray pozitif veya negatif modda çalışabilir. Pozitif modda [M+H]+ temel ionunun yanısıra, [M+nH]n+ ve mobil faz kopozisyonuna bağlı olarak [M+Na+]+ gibi iyonlar da oluşabilir. Negatif mod, en çok, kararlı sodyum tuzları oluşturabilen asidik ilaçlara uygundur. Örn: [M-H]-, [M-nH]n- and [M+I-]-

Örnek, quadrupollerden geçerek parçalanmak üzere MS'e girer. Bir quadrupol, bir kare düzlem boyunca sıralanmış 4 paralel çubuktan oluşur. Analit iyonları quadrupolün oluşturduğu karenin içine yönlenir. Çubukların ortasında elektromanyetik alan üretmek üzere çubuklara voltajlar uygulanır. Bu elektromanyetik alanlar verilen bir zaman aralığında, hangi m/z oranina sahip iyonlarin filtreden geçeceğini belirler. Quadrupoller, en basit ve en az pahalı kütle analizörleridir.

Yapısal bilgi edinmek için, analit iyonları nötral moleküllerle çarpıştırılarak collision induced dissociation (CID=collisionally activated dissociation (CAD)) olarak adlandırılan bir parçalanmaya uğrarlar. Çarpışmaya enerji eklemek ve daha fazla parça elde etmek için, analit iyonlarına voltaj uygulanır.

Multiple-stage MS lerde; kapiller boruya, (Q_0) giren örnek, burada parçalanır, birinci quadrupol (Q_1) prekürsör iyonu (örn: [M+H]+) seçmek için kullanılır. CID, çarpışma hücresi denilen (Q_2) de gerçekleşir. Q_2, gazla dolu bir odada radyofrekanslı bir quadrupoldür. Q_2, seçilen prekürsör iyondan farklı parçalar elde edildiği hücredir. Q_3 sadece tek bir ikincil iyonu filtre eder. Sadece bu iyon detektöre ulaşır ve bu iyondan kantitatif tayin, hem prekürsör hem de ikincil iyon gözlenerek te kalitatif tayin gerçekleştirilebilir. Birincil parçalanmadan elde edilen prekürsör iyonun ikinci kez parçalanması ve bu parçalanmadan elde edilen o analite özgü karakteristik iyonun izlenmesi işlemine MRM (Multi reaction Monitoring = Çoklu Reaksiyon İzleme) denir. MRM işleminin hassasiyeti, oluşan ikincil iyonun miktarını belirler. Q_3'ten dedektöre gelen iyonlar sayılır.

Quadrupol kütle analizörleri iki moda çalışır: scan modu ve SIM modu. Scan modunda, kütle analizörü geniş bir aralıktak farklı m/z oranlarına sahip iyonları izler. SIM modunda ise, sadece belli m/z oranına sahip parçaları izler. Daha duyarlı olmakla birlikte, daha az iyon hakında bilgi verir. Scan mod, tipik olarak önceden tüm analit kütlelerinin bilinmediği zaman, kantitasyon için de kullanılır. SIM mod ise, hedef bileşiklerin tayini ve izlenmesi amacıyla kulanılır.

Bu çalışmada, morfin ve amitriptillin önce Q_0 da parçalandıktan sonra Q_1 de prekürsör iyonu olarak 345 m/z oranına sahip parça seçilmiş ve sadece bu parça filtreden geçip Q_2 ye gelebilmiştir. Q_2 de parçalanan 345 iyonundan elde edilen iyonlar Q_3 te filtrelenmiş ve ikincil iyon olarak seçilen 299 iyonu izlenerek kantitatif analizler gerçekleştirilmiştir.

2.11. Validasyon

Bir cihazın, metodun veya sistemin performansının belirlenen koşullara uygun olduğunu göstermek için yapılan test ve ölçme işlemleridir. Diğer bir deyimle validasyon bir cihazın, metodun veya ölçüm sisteminin belirlenen amaca uygun olduğunun test edilerek yazılı kayıtlarla onaylanmasıdır.

2.11.1. Metot validasyonu

Neden yapılır:

- Çeşitli alanlarda birçok karar, yapılan kimyasal ölçümlerin sonucuna dayanılarak verilir. (örneğin Adli Toksikoloji)
- Doğru karar verebilmek için analitik ölçüm sonucunun doğru ve güvenilir (tekrarlanabilir) olması gerekmektedir.
- Bir metotla yapılan ölçümün sonuçları birçok faktöre bağlıdır. (Laboratuvar koşulları, cihaz, kullanılan kimyasal madde, standart, operatör deneyimi).
- Bu nedenle metodun ölçüm sonucuna etki eden parametreleri tek tek ölçülerek ölçüm sonucuna etkileri belirlenmeli ve ölçülmelidir.

Ne zaman yapılır:

- Herhangi bir metot bir laboratuvarda ilk defa uygulanacağı zaman,
- Bir analiz için yeni metot geliştirildiği zaman,
- Kullanılmakta olan metotta değişiklik yapıldığı zaman,
- Valide edilmiş bir metot başka bir laboratuvarda kullanılacağı zaman veya farklı bir kişi veya farklı bir cihazla kullanılacağı zaman,
- İki metodu karşılaştırmak için,
- Kalite kontrol testleri sonunda metodun performansında zamanla bir değişme olduğu anlaşıldığında.

Nasıl yapılır:

- Validasyon protokolu ve validasyon için SOP (Strateji Oluşturma Planı) hazırlanır.
- Metodun uygulama amacı, kapsamı belirlenir.
- Metodun performans parametreleri ve kriterleri belirlenir.
- Validasyon deneyleri tanımlanır.
- Kullanılacak cihazların performansının metot için yeterli olup olmadığı doğrulanır.
- Kullanılacak maddelerin (kimyasal, standartlar) kalitesi belirlenir.

2.12. Metot Validasyonu Parametreleri:

- Kesinlik (Precision): Tekrarlanabilirlik, geri üretilebilirlik
- Doğruluk (Accuracy): Geri kazanım
- Tayin Limiti (Limit of detection, LOD)
- Ölçüm Limiti (Limit of quantitation, LOQ)
- Seçicilik / Spesifik olma (Selectivity / Specificity)
- Lineerite ve Ölçüm Aralığı (Linearity / Range)
- Sağlamlık (Ruggedness / Robustness)

2.12.1. Validasyon parametrelerinin belirlenmesi:

- Validasyonu yapılacak performans parametreleri metodun uygulama amacına ve kapsamına bağlı olarak belirlenir.
- Örneğin safsızlık analizi yapılacak bir metotta lineer ölçüm aralığının belirlenmesine gerek yoktur.
- Metot validasyonuna başlamadan önce kullanılacak cihazın performansının test edilmesi ve uygunluğunun saptanması gerekir (Cihaz Validasyonu)

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Gereç

'Adli bilimlerde *Lucilia sericata* larvalarının entomotoksikolojik çalışmalarda kullanılması' isimli projenin araştırma deneylerinde *L.sericata* sinek larvalarını kullanmadan önce, çalışmanın amaç ve kapsamını içeren bir bilgi formu ile İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu' na başvurularak Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu' ndan yazılı izin alınmıştır (Ek-1). Etik kurul izin belgesi 27.08.2008' de alınmıştır ve bu belgenin sayısı 98'dir. Ayrıca bu tez çalışması (Proje no: 2688), İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Ek-2).

3.1.1. Adli Entomoloji Çalışmalarında Kullanılan Gereçler

Adli entomoloji çalışmaları için kullanılan cihazlar ve gereçler aşağıda verilmiştir.

Tablo I. Araştırmada kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka Model
İnkübatör	Nüve EN 400,Elektro-mag M7040R
Mikroskop	Olympus SZX10 stereo mikroskop
Klima	Fujitsu
Nem alma cihazı	Trotec
Su distilasyon cihazı	Marienfeld
Karıştırıcı	Siemens
Hassas terazi	Denver Instrument
Isıtıcılı manyetik karştırıcı	Biosan
Otoklav	Nüve OT 4060

Tablo II. Araştırmada kullanılan gereçler

Gereçler	
40x40 cm tel kafes	Balon joje (2000 ml)
Kafes için tül	Steril petri kabı
Lupe (büyüteç)	Agar agar (MERCK)
Polymyxin B ve Kanamycin antibiyotik	Kurutma kâğıdı
Ciğer özütü	Portüp
SodyumKlorür	Steril falkon tüp
Formaldehit	Deney tübü
SodyumHipoKlorit	Mezür
Glukoz	Pens
Talaş	Eldiven

3.1.2. Adli Entomotoksikoloji Çalışmalarında Kullanılan Gereçler

Adli entomotoksikoloji çalışmaları için kullanılan cihazlar ve gereçler aşağıda verilmiştir.

Tablo III. Araştırmada kullanılan cihazlar ve gereçler

Cihazlar Ve Gereçler
LC-MS-MS (Zivak Tandem Gold)
Vorteks (Yellow Line TTS2)
Etüv (Termal Laboratuar Aletleri)
Santrifüj (Hettich Universal 320R)
Mikropipet (Eppendorff 20µL,100 µL, 200 µL, 1000 µL, 10 mL)
Evaporatör (Heidolph- Laborata 4003 Control)
Bandelin Sonorex ultrasonik su banyosu
-20^{o}C'de Buzdolabı (Arçelik)
+4 ^{o}C'de Buzdolabı (Sharp Deodorizer)
- 80^{o}C'de Buzdolabı (Hettich Freezer)
pH-metre (Thermo-Orion 3 STAR)
Kombine pH elektrot (Thermo Orion 9157BNMD)
Örnek zenginleştirici (Techne Dri-Block DB-3D sample concentrator)
±0,1 mg hassasiyette dijital terazi (Precisa XB220 A)

Bidistile su cihazı (Milli-Q)
Manyetik karıştırıcı (IKA)
Pastör Pipeti
Kapaklı Falkon Tüpler (15 mL ve 50 mL)
Cam Tüpler (5 mL)
Beher (10 mL, 25 mL, 50 mL)
Balonjoje (10 mL, 25 mL, 50 mL, 1000 mL)
1,5 mL'lik vial (LC-MS-MS cihazı için)
Plastik steril enjektör
Kromofil 45/25-0,45 mikron enjektör filtresi
Steril petri kabı (15 cm)
Luna 3 µ C18 (2) Phenomenex 100A 50,0x2,00 mm kolon
Tavuk Karaciğeri
Eldiven

Tablo IV. Araştırmada kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal Maddeler	
Metanol (Sigma)	Borat Tamponu (Ph: 9,00)
Etilasetat (Merck)	Amitriptilin (190 g/L) (Sigma)
Asetonitril (Merck)	Morfin (550 g/L) (Sigma)
Sodyum Klorür (NaCl) (Merck)	Amitriptillin referans standardı
Formik Asit (Sigma)	Morfin referans standardı
Amonyum Format (Merck)	Diklorometan (Sigma) (ön denemeler için)
Borik Asit	Kloroform (Sigma) (ön denemeler için)
Potasyumklorid	Hekzan (Merck) (ön denemeler için)
Sodyum Hidroksit (NaOH) (0,1 N) (Merck)	Heptan (ön denemeler için)
Distile su	

Borat tamponunun (Ph: 9,00) hazırlanışı aşağıda anlatılmaktadır.

1. 1000 ml' lik balon jojeye 6,2 g borik asit, 7,5 g potasyumklorid ve 420 ml 0,1 N NaOH aktarılır.

2. Bu karışım, magnetik karıstırıcıda iyice karıstırılır.

3. PH'ı ölçülür, PH'ı 9,00 olana kadar distile su eklenir.

*** Tüm çözücüler HPLC saflığındadır.

*** Kullanılan maddeler ≥99 saflıktadır ve ticari formdadır. Sulu çözeltiler bidistile su kullanılarak hazırlanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Adli entomoloji çalışmalarında uygulanan yöntemler

Deney çalışmaları, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi bünyesinde yer alan, TÜBİTAK Kamu Kurumları Araştırma ve Geliştirme Projelerini Destekleme Programı (1007 Programı) kapsamında kurulmuş olan Biyoterapi Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarında yürütülmüştür. İsrail'de bulunan Hebrew Üniversitesi Hadassah Tıp Fakültesi Parazitoloji bölümünden tıbbi entomolog Kosta Mumcuoğlu tarafından sağlanan *Lucilia sericata* pupaları özel olarak 40 x 40 x 40 cm hazırlanmış etrafı tül ile sarılı tel kafesler içinde 8-10 gün süre içerisinde erişkin form haline getirilmiştir. Burada oluşturulan sinek kolonisi % 20 lik şekerli su ortamı ile beslenmektedir. Bir kafes içerisinde 1000 ile 1500 sinek yaşamaktadır. Bu kafesler, ortam sıcaklığının 24 °C / 24 saat gündüz ritmi ve nemin %50 olduğu laboratuvar koşullarında tutulmuştur. Petri kapları içerisine konulan tavuk ciğeri kafeslerin içerisine bırakılarak ergin dişi sineklerin yumurtlamaları sağlanır. Elde edilen yumurtalar, blendırda parçalanarak homojen hale getirilen tavuk ciğeri ortamına alınarak gelişimleri incelenmiştir.

3.2.1.1 *Sinek kolonisinin devamlılığının sağlanması*

9 cm çapındaki petri kabı içerisine konulan bir parça tavuk ciğeri sinek kafesinin içerisine yerleştirilir ve 3-4 saat sonra yumurtalar ile birlikte geri alınır. Yumurtalar ciğer üzerinden toplanarak 15 cm çapındaki petrilerde yer alan ciğer-agar ortamına aktarılır ve 30 °C de 5 gün inkübasyona bırakılır.

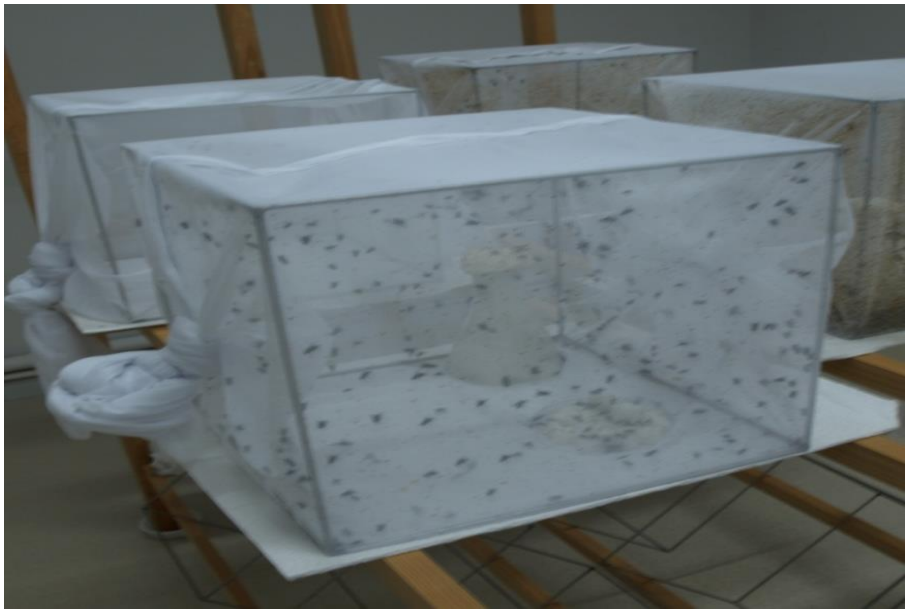
Plastik bir kap (13 x 8 x 20) içerisine ahşap talaşlar yerleştirilir. Başkalaşım sırasında kabın içerisine ihtiyaç duyulan havanın girebilmesi için, kabın kapağına genişçe bir delik açılır ve bu kısım tül ile kapatılır. 5 günlük inkübasyon periyodunun ardından, beslenme sonrası 3.evre olan larvaları (gezici larva) içeren petri kapları plastik kabın içerisine talaşların üzerine konulur. Larvalar beslendikleri ortamı terkederler ve talaşın içine doğru hareket ederler. Larvalar besiyerini terk ettikten sonra petri kabı kaldırılır. Larvalar pupa olana kadar 7 gün boyunca 24 °C'de inkübe edilir. İnkübasyon peryodunun ardından pupalar talaştan ayıklanır ve başka bir plastik kaba (9 cm çap/5 cm yükseklik) alınır ve yeni bir sinek kafesine yerleştirilir. Her bir kafes 40 x 40 x 40 cm ebatlarında olup 1000-1500 sinek içermektedir. Koloninin devamlılığı için, kafesin içerisinde sürekli % 20 lik şekerli su bulunmaktadır ve haftada en az iki kez dişi sineklerin yumurtlamaları ve protein ihtiyaçlarını karşılamaları için kafeslerin içerisine tavuk ciğeri konulmaktadır.



Şekil 11: *L.sericata* sineklerinin bulunduğu laboratuvar



Şekil 12: Erişkin *L.sericata* sineklerinin yaşadığı kafesler



Şekil 13: Erişkin *L.sericata* sineklerinin yaşadığı kafesin yakından görünümü

3.2.1.2. *Örnek hazırlama ve büyüme eğrileri oluşturma*

3.2.1.2.1 *Morfin katılarak hazırlanmış ciğer ile beslenen örneklerin hazırlanması ve büyüme eğrilerinin oluşturulması*

1.Kasaptan alınan taze kesilmiş tavuk karaciğeri soğuk zincirde laboratuara getirildi. Denemelere başlamadan önce analiz sırasında pratik olarak kullanılması için karaciğerler belirli miktarlarda hazırlandı ve daha sonra enzimlerin inhibe olmaması amacıyla herhangi bir işlem yapılmadan -80 ^{o}C'de buzdolabında bekletildi.

2. Dört farklı konsantrasyonda morfin (0,125 mg, 0.75 mg, 1,75mg, 2.5 mg), 4 adet 250 g kıyılmış tavuk ciğerine koyulur, karıştırıcıda homojen oluncaya kadar karıştırılarak 4 adet örnek doku hazırlanır. Kontrol örneği(C_0) 250 g kıyılmış ciğere hiçbir madde koyulmadan oluşturulur.

3. 9 cm çapındaki petri kabı içerisine konulan yaklaşık 30 g tavuk ciğeri (kimyasal madde katılmadan hazırlanan ciğer örneği), 24°C/ 24 saat gündüz ritmi uygulanan laboratuvar koşullarında, içinde %20 lik şekerli su ortamı ile beslenen 1500 ergin sineğin bulunduğu 40x40x40 cm tel kafes içerisine bırakılır.

4. Yaklaşık 30 dakika içinde ergin dişi sineklerin ciğer üzerine yumurta bırakması beklenir. Dişi bireyler yumurtalarını bıraktıktan sonra, hazırlanan 5 örnek dokunun, her birinin üzerine, *Lucilia sericata* yumurtalarından yaklaşık 400'er adet bırakılır.

5. Üzerine 400'er adet yumurta konulan 5 örnek dokunun bulunduğu petri kaplarının her biri, 15x20 cm ölçülerindeki, içi talaşla kaplı 5 ayrı plastik kutu içerisine konulur. Larvaların hava alabilmeleri için plastik kutuların kapaklarının orta kısmı kesilerek alınır ve boş olan kısımlar tül ile kapatılır.

6. Dişi bireyler yumurtalarını bıraktıktan yaklaşık 16-22 saat sonra yumurtalar açılır ve yumurtalardan larvalar çıkar.

7. Larvalar örnek dokularla beslenirler. Her gün belirli saatlerde örnek dokular kontrol edilerek her dokudan günde iki kere, rasgele 10'ar tane larva alınır. Alınan bu larvalar bol distile su ile yıkanıp kurutulduktan sonra yaklaşık -20°C'deki soğutucuda 5 dakika dondurularak öldürülürler.

8. Öldürülen larvalardan ortalama boy ve ağırlık ölçüleri hesaplanarak sineğin büyüme eğrileri oluşturulur.

3.2.1.3. Amitriptilin katılarak hazırlanmış ciğer ile beslenen örneklerin hazırlanması ve büyüme eğrilerinin oluşturulması

1. Kasaptan alınan taze kesilmiş tavuk karaciğeri soğuk zincirde laboratuvara getirildi. Denemelere başlamadan önce analiz sırasında pratik olarak kullanılması için karaciğer küçük parçalara bölündü ve daha sonra enzimlerin inhibe olmaması amacıyla herhangi bir işlem yapılmadan -80 ^{o}C' de buzdolabında bekletildi.

2. Dört farklı konsantrasyonda amitriptilin (C_1=500.00, C_2=3000.00, C_3=7000.00, C_4=10000.00 ng/g), 4 adet 250 g kıyılmış tavuk ciğerine koyulur, karıştırıcıda homojen oluncaya kadar karıştırılarak 4 adet örnek doku hazırlanır. Kontrol örneği (C_0) 250 g kıyılmış ciğere hiçbir madde koyulmadan oluşturulur.

3. 9 cm çapındaki petri kabı içerisine konulan yaklaşık 30 g tavuk ciğeri (kimyasal madde katılmadan hazırlanan ciğer örneği), 24°C/ 24 saat gündüz ritmi uygulanan laboratuvar koşullarında, içinde % 20 lik şekerli su ortamı ile beslenen 1500 ergin sineğin bulunduğu 40x40x40 cm tel kafes içerisine bırakılır.

4. Yaklaşık 30 dakika içinde ergin dişi sineklerin ciğer üzerine yumurta bırakması beklenir. Dişi bireyler yumurtalarını bıraktıktan sonra, hazırlanan 5 örnek dokunun, her birinin üzerine, *Lucilia sericata* yumurtalarından yaklaşık 400'er adet bırakılır.

5. Üzerine 400'er adet yumurta konulan 5 örnek dokunun bulunduğu petri kaplarının her biri, 15x20 cm ölçülerindeki, içi talaşla kaplı 5 ayrı plastik kutu içerisine konulur.

6. Larvaların hava alabilmeleri için plastik kutuların kapaklarının orta kısmı kesilerek alınır ve boş olan kısımlar tül ile kapatılır.

7. Dişi bireyler yumurtalarını bıraktıktan yaklaşık 16-22 saat sonra yumurtalar açılır ve yumurtalardan larvalar çıkar.

8. Larvalar örnek dokularla beslenirler. Her gün belirli saatlerde örnek dokular kontrol edilerek her dokudan günde iki kere, rasgele 10'ar tane larva alınır. Alınan bu larvalar bol distile su ile yıkanıp kurutulduktan sonra yaklaşık -20°C'deki soğutucuda 5 dakika dondurularak öldürülürler.

9. Öldürülen larvalardan ortalama boy ve ağırlık ölçüleri hesaplanarak *Lucilia sericata* sineğinin büyüme eğrileri oluşturulur.

Entomoloji çalışmalarında yukarıda anlatılan yöntem uygulanmıştır.

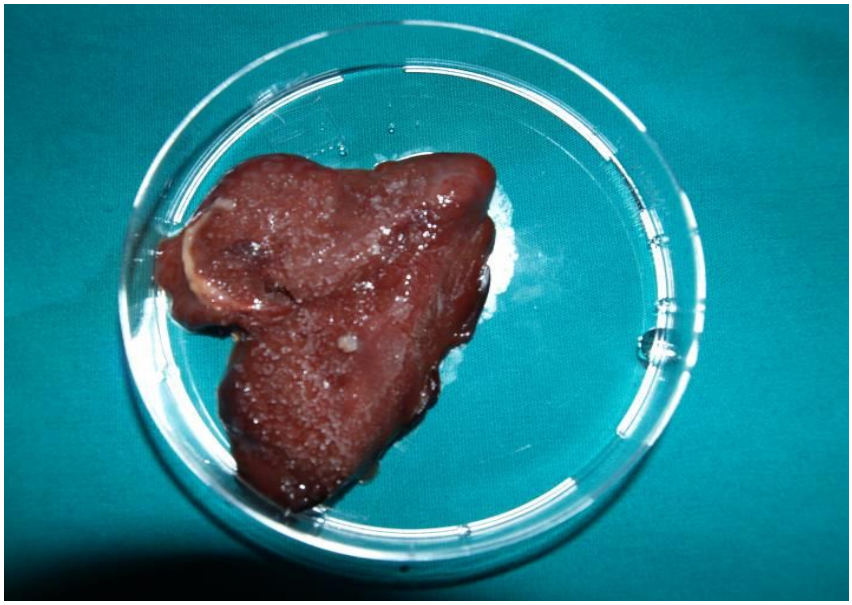
Örneklerin yumurta, larva ve pupa evrelerine ait gelişimleri Olympus marka SZX10 model stereo mikroskop altında incelenmiştir. Günde iki kere belirli saatlerde, larvaların boy ve ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Örneklerin boy ölçümlerinde X ve Y eksenlerini ölçen çapraz çizgili, 0,1 mm ünite mikrometrik oküler kullanılmıştır. Örneklere ait ağırlık ölçümleri, hassas terazi kullanılarak tespit edilmiştir.

1 mikrometrik oküler aralığının kaç milimetre olduğunu bulabilmek için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

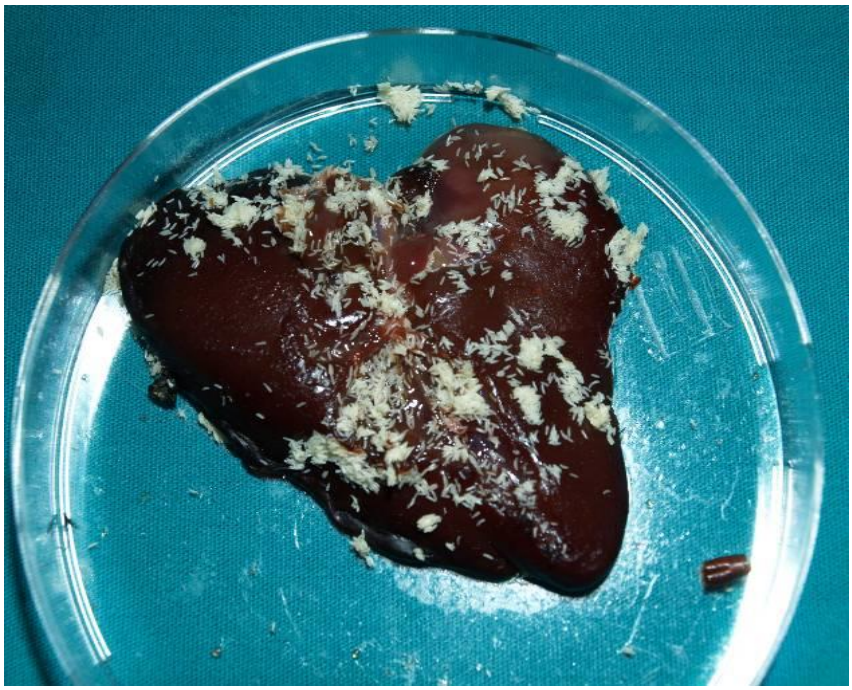
$$\text{Aralık} = \frac{\text{Oküler büyütmesi x Kullanılan mikrometre}}{\text{Objektif Büyütmesi}}$$



Şekil 14: Ergin L.sericata sineklerinin yaşadığı kafesin içten görünümü



Şekil 15: Sinek kafesine yumurta almak için bırakılan ciğer



Şekil 16: L. sericata yumurtalarının bırakıldığı ciğer



Şekil 17:*L.sericata* yumurtaları



Şekil 18: Deneylerde ortam olarak kullanılan taze tavuk ciğeri



Şekil 19: Ciğerlerin karıştırıcıda parçalanması



Şekil 20: Ciğerler karıştırıcıda parçalanarak homojen hale getirilmektedir.



Şekil 21: Homojenize edilmiş ciğer.



Şekil 22: 400 *L. sericata* yumurtasının aktarıldığı homojenize edilmis ciğer.



Şekil 23: Talaşlı ortama bırakılan, 400 *L. sericata* yumurtasının aktarıldığı homojenize edilmiş ciğer



Şekil 24: *L. sericata* yumurta ve larvalarının hava alması için tül ile kaplanmış yaşam ortamları



Şekil 25: *L. sericata* larvalarının yaşadığı ve beslendiği çürümüş ciğer



Şekil 26: *L. sericata* larvalarının yaşadığı ve beslendiği çürümüş ciğer

3.2.2. Adli entomotoksikoloji çalışmalarında uygulanan yöntemler

Araştırma konusunun adli entomotoksikoloji deneyleri, İstanbul Üniversitesi Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü bünyesinde olan Adli toksikoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.1. *Çalışma çözeltilerinin hazırlanması*

Araştırmada kullanılan tüm standart çözeltilerinin hazırlanması aşağıda anlatılmıştır.

- **Morfin stok çözeltisi (1 mg/mL):** 10 mg morfin HCl tartıldı, aktarıldığı balon jojede 10 mL olacak şekilde metanol ile tamamlandı.
- **Amitriptillin stok çözeltisi (1 mg/mL):** 10 mg morfin HCl tartıldı, aktarıldığı balon jojede 10 mL olacak şekilde metanol ile tamamlandı.
- **Morfin ara stok çözeltisi (10 µg/mL):** Hazırlanan morfin stok çözeltisinden 100 µL alındı, balon jojede 10 mL olacak şekilde metanol ile tamamlandı.
- **Amitriptillin ara stok çözeltisi (10 µg/mL):** Hazırlanan amitriptillin stok çözeltisinden 100 µL alındı, balon jojede 10 mL olacak şekilde metanol ile tamamlandı.

• **Karışım ara stok çözeltisi (10 µg/mL):** Hazırlanan her bir stok çözeltiden 100 µL alındı, balon jojede 10 mL olacak şekilde metanol ile tamamlandı.

Çalışılan örneklerin kalibrasyon eğrisinin çizilebilmesi için 1 ng/mL ile 3 µg/mL arasında amitriptillin çalışma çözeltileri aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır. 1 ng/mL ile 2 µg/mL arasında morfin test çözeltileri de, aşağıda amitriptillin için verilen seyreltmeler kullanılarak hazırlanmıştır.

• **3 µg/mL amitriptillin kalibrasyon çözeltisi:** 10 µg/mL olacak şekilde hazırlanan amitriptillin ara stok çözeltisinden 3 mL alındı, balon jojede 10 mL olacak şekilde metanol ile tamamlandı.

• **2 µg/mL amitriptillin kalibrasyon çözeltisi:** 10 µg/mL olacak şekilde hazırlanan amitriptillin ara stok çözeltisinden 2 mL alındı, balon jojede 10 mL olacak şekilde metanol ile tamamlandı.

• **1 µg/mL amitriptillin kalibrasyon çözeltisi:** 10 µg/mL olacak şekilde hazırlanan amitriptillin ara stok çözeltisinden 1 mL alındı, balon jojede 10 mL olacak şekilde metanol ile tamamlandı.

• **500 ng/mL amitriptillin kalibrasyon çözeltisi:** 10 µg/mL olacak şekilde hazırlanan amitriptillin ara stok çözeltisinden 500 µL alındı, balon jojede 10 mL olacak şekilde metanol ile tamamlandı.

• **250 ng/mL amitriptillin kalibrasyon çözeltisi:** 10 µg/mL olacak şekilde hazırlanan amitriptillin ara stok çözeltisinden 250 µL alındı, balon jojede 10 mL olacak şekilde metanol ile tamamlandı.

• **100 ng/mL amitriptillin kalibrasyon çözeltisi:** 10 µg/mL olacak şekilde hazırlanan amitriptillin ara stok çözeltisinden 100 µL alındı, balon jojede 10 mL olacak şekilde metanol ile tamamlandı.

• **50 ng/mL amitriptillin kalibrasyon çözeltisi:** 10 µg/mL olacak şekilde hazırlanan amitriptillin ara stok çözeltisinden 125 µL alındı, balon jojede 25 mL olacak şekilde metanol ile tamamlandı.

• **10 ng/mL amitriptillin kalibrasyon çözeltisi:** 10 µg/mL olacak şekilde hazırlanan amitriptillin ara stok çözeltisinden 10 µL alındı, balon jojede 10 mL olacak şekilde metanol ile tamamlandı.

• **1 ng/mL amitriptillin kalibrasyon çözeltisi:** 10 µg/mL olacak şekilde hazırlanan amitriptillin ara stok çözeltisinden 2,5 µL alındı, balon jojede 25 mL olacak şekilde metanol ile tamamlandı.

***Taze hazırlanan tüm çözeltiler +4 ºC'de buzdolabında saklandı.

3.2.2.2. *Örnekleme ve örnek hazırlama*

3.2.2.2.1. *Ciğer ve larvadan morfin analizi için örnek hazırlama ve büyüme eğrileri oluşturma:*

Morfin katılarak hazırlanmış ciğer ile beslenen örneklerin hazırlanması ve büyüme eğrilerinin oluşturulması aşağıda sırası ile anlatılmıştır.

1. Kasaptan alınan taze kesilmiş tavuk karaciğeri soğuk zincirde laboratuara getirildi. Denemelere başlamadan önce analiz sırasında pratik olarak kullanılması için karaciğerler belirli miktarlarda hazırlandı ve daha sonra enzimlerin inhibe olmaması amacıyla herhangi bir işlem yapılmadan -80 ºC'de buzdolabında bekletildi.

2. Dört farklı konsantrasyonda morfin (5 mg, 12.5 mg, 25 mg, 50 mg), 4 adet 250 g. kıyılmış tavuk ciğerine koyulur, karıştırıcıda homojen oluncaya kadar karıştırılarak 4 adet örnek doku hazırlanır. Kontrol örneği(C_0), 250 g homojen ciğere hiçbir madde koyulmadan oluşturulur.

3. 9 cm çapındaki petri kabı içerisine konulan yaklaşık 30 g tavuk ciğeri (kimyasal madde katılmadan hazırlanan ciğer örneği), 24°C/ 24 saat gündüz ritmi uygulanan laboratuvar

koşullarında, içinde %20'lik şekerli su ortamı ile beslenen 1500 ergin sineğin bulunduğu 40x40 cm tel kafes içerisine bırakılır.

4. Yaklaşık 30 dakika içinde ergin dişi sineklerin ciğer üzerine yumurta bırakması beklenir. Dişi bireyler yumurtalarını bıraktıktan sonra, hazırlanan 5 örnek dokunun, her birinin üzerine, *Lucilia sericata* yumurtalarından yaklaşık 400'er adet bırakılır.

5. Üzerine 400'er adet yumurta konulan 5 örnek dokunun bulunduğu 15x20 cm ölçülerindeki petri kaplarının her biri, içi talaşla kaplı 5 ayrı plastik kutu içerisine konulur.

6. Larvaların hava alabilmeleri için plastik kutuların kapaklarının orta kısmı kesilerek alınır ve boş olan kısımlar tül ile kapatılır.

7. Dişi bireyler yumurtalarını bıraktıktan yaklaşık 16-22 saat sonra yumurtalar açılır ve yumurtalardan larvalar çıkar.

8. Larvalar örnek dokularla beslenirler. Her gün belirli saatlerde örnek dokular kontrol edilerek her dokudan günde iki kere, rasgele 10'ar tane larva alınır. Alınan bu larvalar bol distile su ile yıkanıp kurutulduktan sonra yaklaşık -20°C'deki soğutucuda 5 dakika dondurularak öldürülürler.

9. Öldürülen larvalardan ortalama boy ve ağırlık ölçüleri hesaplanarak sineğin büyüme eğrileri oluşturulur.

10. Örnekleme: Toksikolojik analiz için; 117 (±0,5) saatin sonunda (yumurta evresinden beslenen 3. Larva evresine kadar olan süre), her ciğer örneğinden ve bu ciğer örnekleri ile beslenen 3.evre larvalar toplanır

11. Ekstraksiyon işlemi: Analiz için yaklaşık 500 mg larva alınır (117 (±0,5) saatlik), distile su ile yıkanır.

12. Yaklaşık 0.500 g larva ve ciğer, % 0,9 NaCl çözeltisi ile homojenize edilir ve orijinal bir LLE extraksiyon prosedürü geliştirilir. Her örneğin organik fazı alınır, azot altında uçurularak organik tabaka kurutulur ve üzerine metanol eklenir. Ekstrakt ESI LC-MS/MS ile analiz edilir.

3.2.2.2.2. *Ciğer ve larvadan amitriptilin analizi için örnek hazırlama ve büyüme eğrileri oluşturma:*

Amitriptilin katılarak hazırlanmış ciğer ile beslenen örneklerin hazırlanması ve büyüme eğrilerinin oluşturulması aşağıda sırası ile anlatılmıştır.

1. Kasaptan alınan taze kesilmiş tavuk karaciğeri soğuk zincirde laboratuara getirildi. Denemelere başlamadan önce analiz sırasında pratik olarak kullanılması için karaciğer küçük parçalara bölündü ve daha sonra enzimlerin inhibe olmaması amacıyla herhangi bir işlem yapılmadan -80 ^{o}C' de buzdolabında bekletildi.

2. Dört farklı konsantrasyonda amitriptilin (C_1=500.00, C_2=3000.00, C_3=7000.00, C_4=10000.00 ng/g), 4 adet 250 g kıyılmış tavuk ciğerine koyulur, karıştırıcıda homojen oluncaya kadar karıştırılarak 4 adet örnek doku hazırlanır. Kontrol örneği (C_0) 250 g kıyılmış ciğere hiçbir madde koyulmadan oluşturulur.

3. 9 cm çapındaki petri kabı içerisine konulan yaklaşık 30 g tavuk ciğeri (kimyasal madde katılmadan hazırlanan ciğer örneği), 24°C/ 24 saat gündüz ritmi uygulanan laboratuvar koşullarında, içinde %20'lik şekerli su ortamı ile beslenen 1500 ergin sineğin bulunduğu 40x40 cm tel kafes içerisine bırakılır.

4. Yaklaşık 30 dakika içinde ergin dişi sineklerin ciğer üzerine yumurta bırakması beklenir. Dişi bireyler yumurtalarını bıraktıktan sonra, hazırlanan 5 örnek dokunun, her birinin üzerine, *Lucilia sericata* yumurtalarından yaklaşık 400'er adet bırakılır.

5. Üzerine 400'er adet yumurta konulan 5 örnek dokunun bulunduğu 15x20 cm ölçülerindeki petri kaplarının her biri, içi talaşla kaplı 5 ayrı plastik kutu içerisine konulur.

6. Larvaların hava alabilmeleri için plastik kutuların kapaklarının orta kısmı kesilerek alınır ve boş olan kısımlar tül ile kapatılır.

7. Dişi bireyler yumurtalarını bıraktıktan yaklaşık 16-22 saat sonra yumurtalar açılır ve yumurtalardan larvalar çıkar.

8. Larvalar örnek dokularla beslenirler. Her gün belirli saatlerde örnek dokular kontrol edilerek her dokudan günde iki kere, rasgele 10'ar tane larva alınır. Alınan bu larvalar bol distile su ile yıkanıp kurutulduktan sonra yaklaşık -20°C'deki soğutucuda 5 dakika dondurularak öldürülürler.

9. Öldürülen larvalardan ortalama boy ve ağırlık ölçüleri hesaplanarak sineğin büyüme eğrileri oluşturulur.

10. Örnek hazırlama: Toksikolojik analiz için; 117(±0.5) saatin sonunda(yumurta evresinden beslenen 3. Larva evresine kadar olan süre), her ciğer örneğinden ve bu ciğer örnekleri ile beslenen 3.evre larvalardan toplanır.

11. Ekstraksiyon işlemi: Analiz için yaklaşık 500 mg larva alınır (117(±0.5) saatlik), distile su ile yıkanır.

12. Yaklaşık 0.500 g larva ve ciğer, % 0,9 NaCl çözeltisi ile homojenize edilir ve orijinal bir LLE extraksiyon prosedürü geliştirilir. Her örneğin organik fazı alınır, azot altında uçurularak organik tabaka kurutulur ve üzerine metanol eklenir. Ekstrakt ESI LC-MS/MS ile analiz edilir.

3.2.2.3. *Larva ve ciğer örneklerinden organik toksik maddelerin ekstraksiyon prosedürü*

1. Entomotoksikolojik analiz için, ciğer örneklerinden (117 (±0.5) saatlik) , yaklaşık 500 mg alınır ve analize kadar -20°C'de saklanır.

2. Bu ciğer örnekleri ile beslenen *Lucilia sericata* larvalarından (117 (±0.5) saatlik), yaklaşık 500 mg alınır.

3. Alınan bu larvalar, olası bir kontaminasyonun önlenmesi için bol distile su ile yıkanıp kurutulduktan sonra yaklaşık -20°C'deki soğutucuda 5 dakika dondurularak öldürülürler ve analize kadar bu sıcaklıkta saklanırlar.

4. Daha sonra toksikolojik analiz yapmak için; örnekler dondurucudan çıkarılır ve olası bir kontaminasyonun önlenmesi için distile su ile yıkanır ve kurutulur.

5. Larvalar makas ile kıyma haline getirilir.

6. Yaklaşık 0,5 g larva ve ciğer; 2 mL (% 0,9) NaCI çözeltisi, 2 mL fosfat tampon çözeltisi (Na_2HPO_4 0.28 M, NaOH ile pH 9.2 ayarlanır), 10 mikrolitre internal standart karışımı ve 10 mL organik ekstraksiyon çözücüsü (kloroform/izopropanol/n-heptan, 50:17:33; v/v) eklenerek, homojenize edilir.

7. Karışım 10 dakika, 200 devir/dakikada çalkalanır.

8. 10 dakika 840xg'de santrifüj edilir.

9. Organik faz uzaklaştırılır ve 5 ml HCl (0.2 N) ile muamele edilir.

10. Çalkalama ve satrifüj işlemleri tekrar uygulanır.

11. Sulu faz alınır, 0,5 ml amonyum hidroksit çözeltisi (% 25) ile nötralize edilir.

12. 2ml fosfat tampon çözeltisi ile pH 9.2'ye ayarlanır.

13. 5 ml organik ekstraksiyon çözücüsü eklenir.

14. Çalkalama ve santrifüjleme işlemlerinden sonra, organik faz alınır.

15. Azot gazı altında uçurulur.

16. 1 mM format tampon çözeltisinin (pH 3.0) 100 mikrolitrede karışım hazırlanır.

17. 11,5 mikrolitre ekstrakt ESI LC-MS/MS ile analiz edilir.



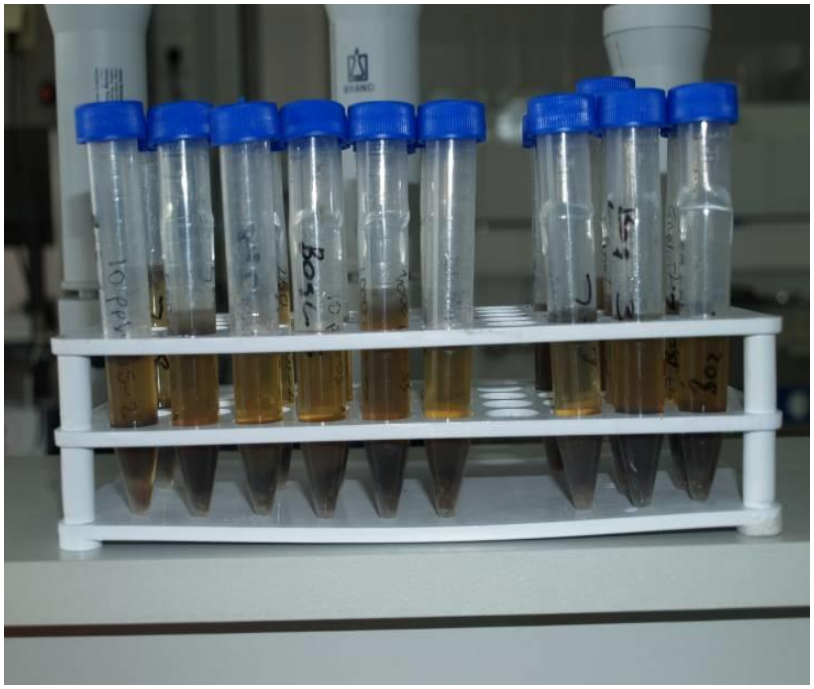
Şekil 27: Toksikolojik analiz için larvaların distile su ile yıkanması



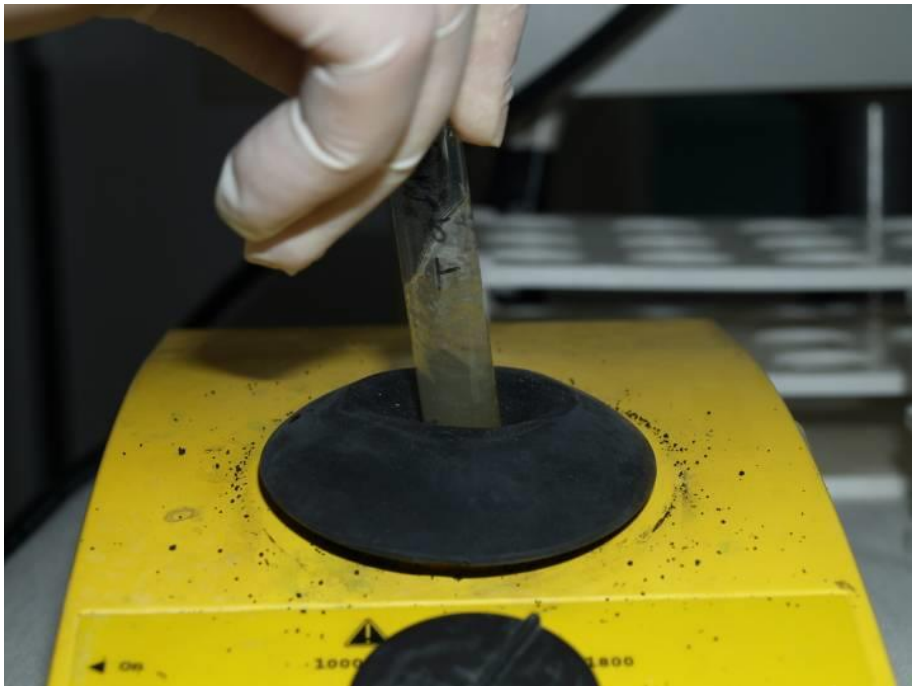
Şekil 28: Toksikolojik analiz için larvaların distile su ile yıkanıp kurutulmuş larvalar



Şekil 29: Toksikolojik analizde kullanılan 0.5 g larva (Beslenen 3. evre larvalar)



Şekil 30: Larvadan amitriptilin ve morfin ekstraksiyonu için homojenize edilmiş karışımlar



Şekil 31: Larvadan amitriptilin ve morfin ekstraksiyonu için homojenize edilmiş karışımların vortekslenmesi



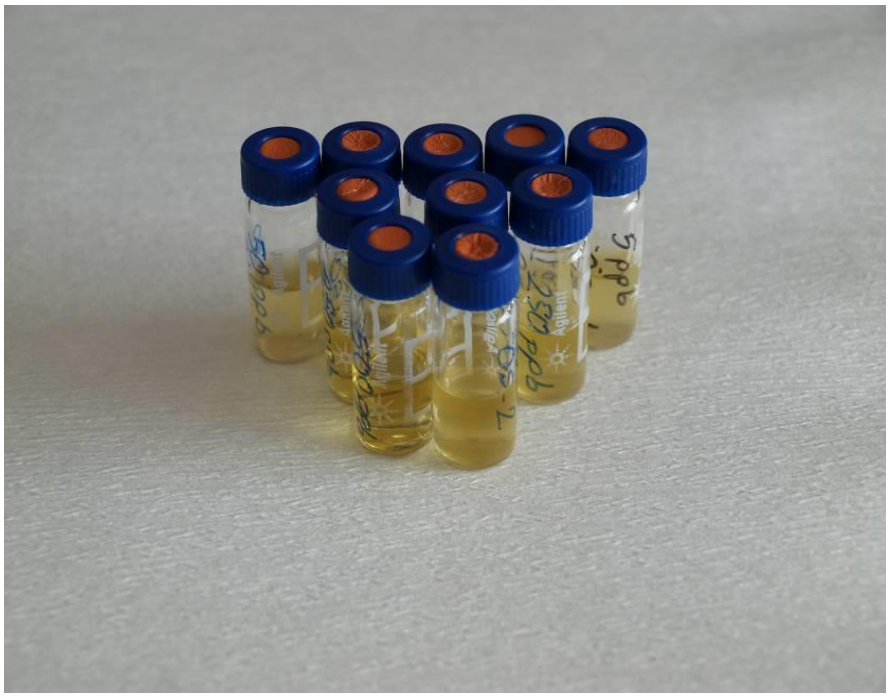
Şekil 32: Çalkalama ve santrifüj işlemlerinden sonra organik fazları alınacak karışımlar



Şekil 33: Azot gazı altında uçurulmuş karışımlar



Şekil 34: Ekstraktın süzülerek viallere aktarılışı



Şekil 35: ESI LC-MS\ MS cihazında analiz edilecek vialler



Şekil 36: LC-MS\MS'de amitriptilin ve morfin tayini

3.2.2.4.*LC-MS-MS analizi*



Şekil 37: LC-MS\MS cihazı

Cihazla ilgili ölçüm parametreleri, amitriptillin ve morfin için tek tek optimize edilmiştir. Eksternal standart yöntemine göre çalışılmıştır. Ölçümler, manuel integrasyonla elde edilen pik alanları esas alınarak gerçekleştirilmiştir.

LC-MS-MS cihazında kullanılan mobil fazlar aşağıda belirtilmiştir.

Morfin analizi için hazırlanan mobil fazlar:

- Mobil A: 5 mM Amonyum Format, Suda
- Mobil B: 5 mM Amonyum Format, Metanolde

Mobil A fazının Hazırlanması**:** 0,3153 g saf amonyum format tartıldı ve 1 L suda çözüldü.

Mobil B Fazının Hazırlanması: 0,3153 g saf amonyum format tartıldı ve 1 L metanolde çözüldü.

Amitriptilin analizi için hazırlanan mobil fazlar:

- Mobil A: % 0,01 formik asidin sudaki çözeltisi
- Mobil B: Asetonitril

***Kolon: Luna 3 µ C18 (2) Phenomenex 100A 50,0x2,00 mm

Tablo V: Morfin analizi için pompa programı

Zaman	% A	%B	Akış (ml/dk)
0:00	80,0	20,0	0,3
0:30	80,0	20,0	0,3
3:00	40,0	60,0	0,3
6:00	40,0	60,0	0,3
8:00	80,0	20,0	0,3
12:00	80,0	20,0	0,3

Tablo VI: Amitriptilin analizi için pompa programı

Zaman	% A	%B	Akış (ml/dk)
0:00	20,0	80,0	0,3
0:30	20,0	80,0	0,3

3.2.2.4.1. *Cihaz parametreleri*

Dedektör Voltajı: 1600 V

CID Gaz Basıncı: 2,40 mTorr

ESI needle voltajı (+): 5500 Volt

ESI shield voltajı (+): 600 Volt

Drying (Kurutma) Gazı Sıcaklığı: 400 ºC

İyon Kaynağı Sıcaklığı (API housing Temperature): 65 ºC

Nebulizer Gaz Basıncı (Azot Gazının Basıncı): 55,0 psi

Kurutma Gazı Basıncı: 35,0 psi

Taşıyıcı- Kurutucu gaz: Azot (≥%99,999)

Parçalama Gazı: Argon (≥%99,999)

Enjeksiyon Hacmi: 10 µl

Tablo VII: Morfin ve Amitriptilinin MS-MS Parametreleri

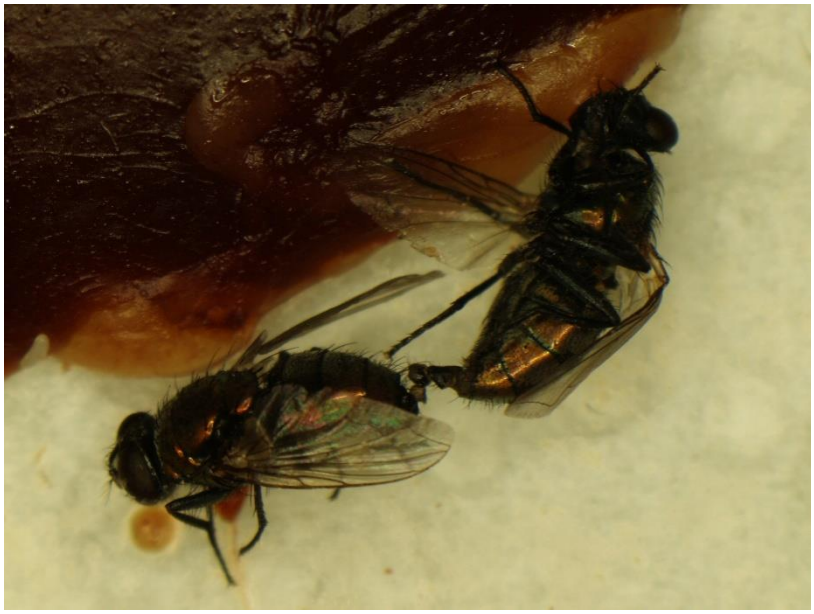
	Q1	**Q3**	**Kapiller Voltajı**	**Parçalama Enerjisi**	**Veri Alma Süresi (dk)**
Morfin	(+) 286,1	201,1	100,0 V	22,00V	0,2
Amitriptilin	(+) 278,91	91,0	60,0 V	8,00V	0,2

4. Bulgular

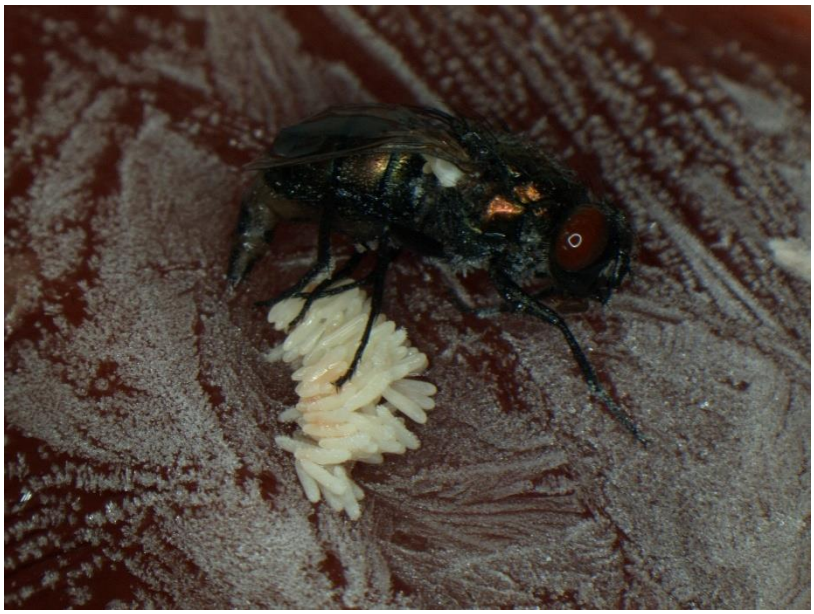
4.1 Adli Entomoloji Çalışmalarına Ait Bulgular

L.sericata sineğine ait tüm büyüme evreleri mikroskop altında incelenmiş, görüntüleri kayıt edilmiştir (Şekil 38-92) ve *L. sericata* sineğine ait büyüme evrelerinin süreleri hesaplanmıştır (Şekil 97 (a),(b)). *L.sericata* sineğine ait yumurta, larva ve pupalarının boy ve ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Aynı zamanda boş ciğer (hiçbir kimyasal madde katılmadan hazırlanmış ciğer) ve morfin veya amitriptilin katılarak hazırlanmış ciğer ile beslenen *L.sericata* larvalarının büyüme evreleri gözlenmiş ve büyüme evre süreleri hesaplanmıştır (Şekil 97 (a),(b)).

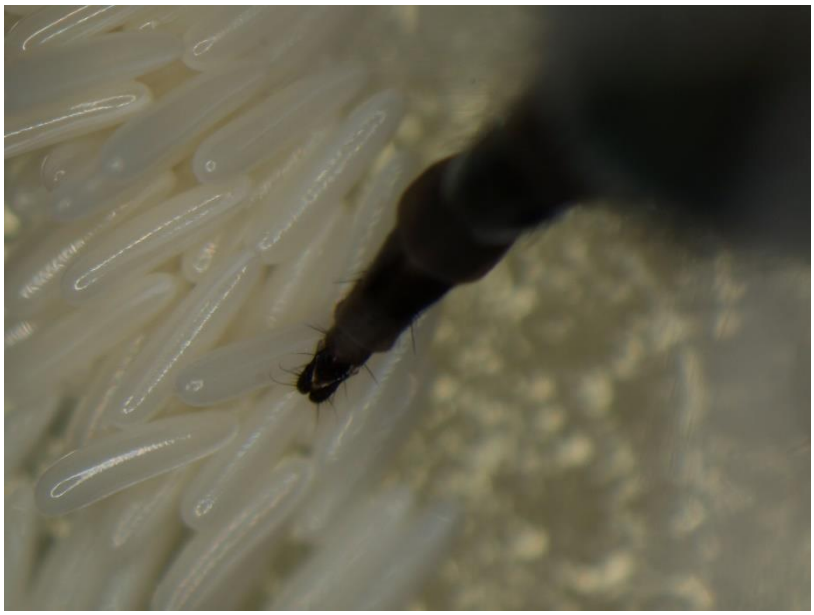
L.sericata sineğinin hayat döngüsüne ait şekiller aşağıda verilmiştir.



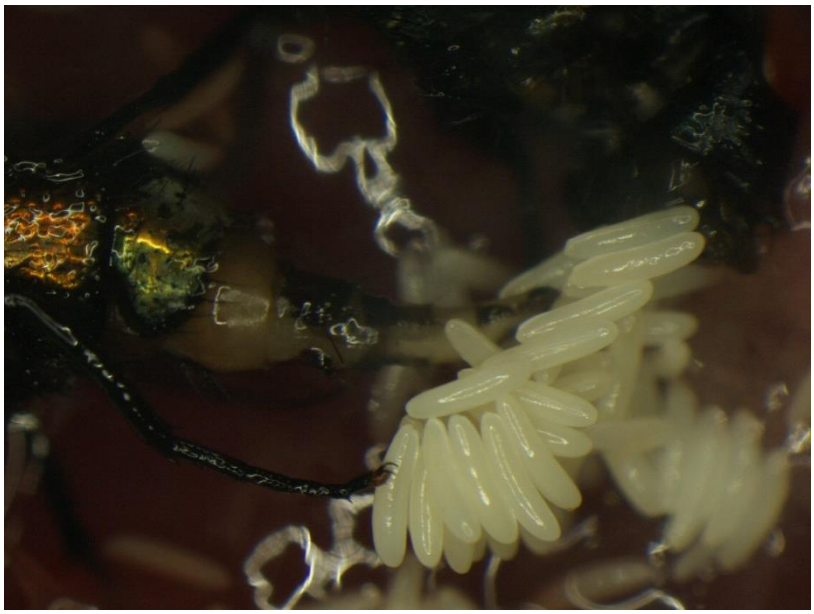
Şekil 38: *L.sericata* ergin sineklerinin çiftleşmesi



Şekil 39: *L.sericata* dişi sineğinin yumurta bırakması



Şekil 40: *L.sericata* dişi sineğinin posteriorundan yumurta bırakılması



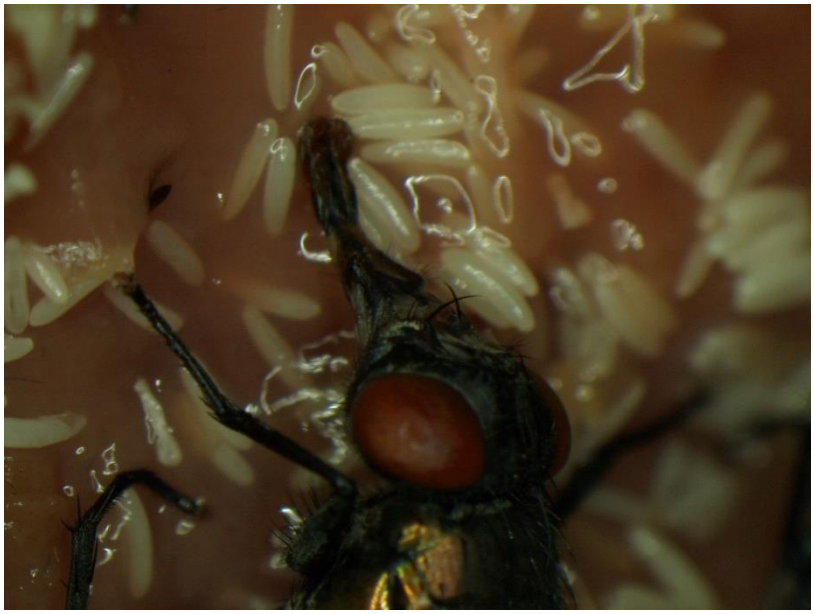
Şekil 41: *L.sericata* dişi sineğinin posteriorundan yumurta bırakılması



Şekil 42: *L.sericata* dişi sineğinin yumurta bırakması



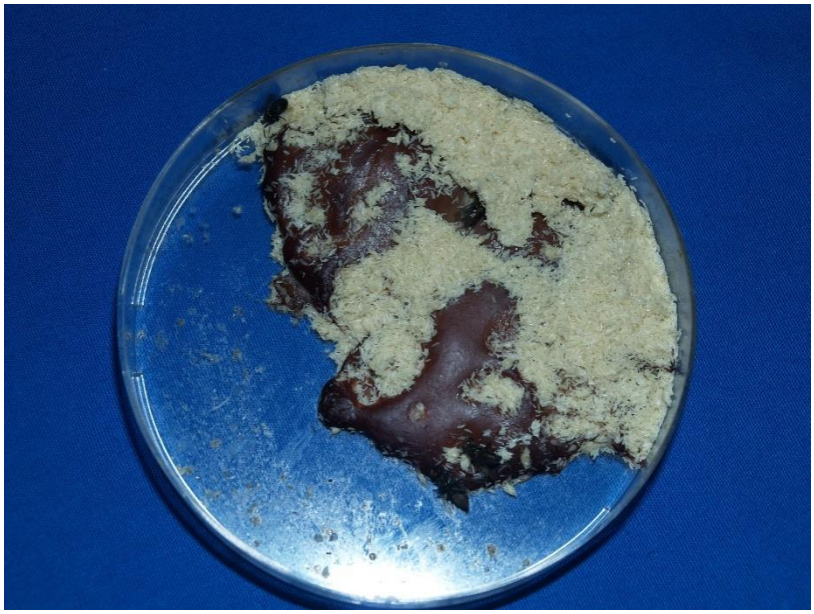
Şekil 43: *L.sericata* dişi sineğinin yumurta bırakması



Şekil 44: *L.sericata* dişi sineğinin beslemesi



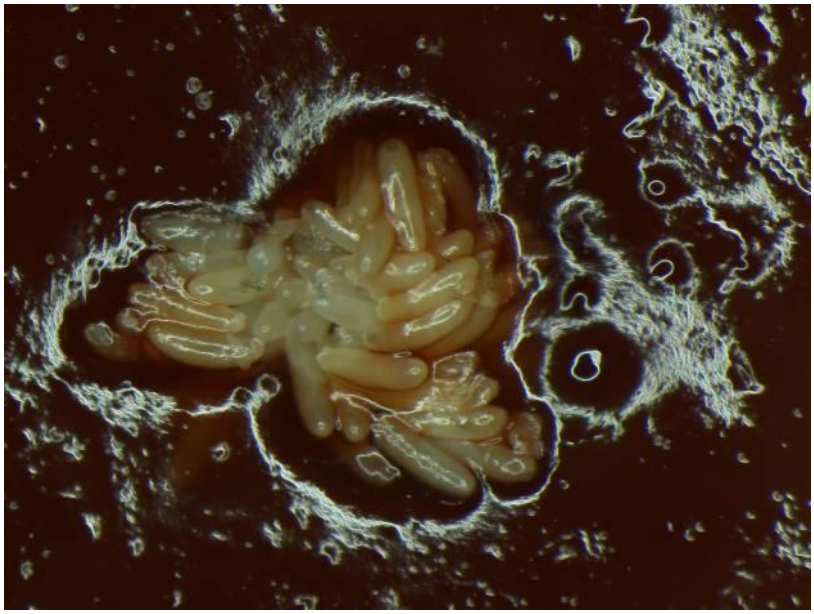
Şekil 45: *L.sericata* sineklerinin ciğer üzerine yumurta bırakmaları ve ciğer ile beslenmeleri



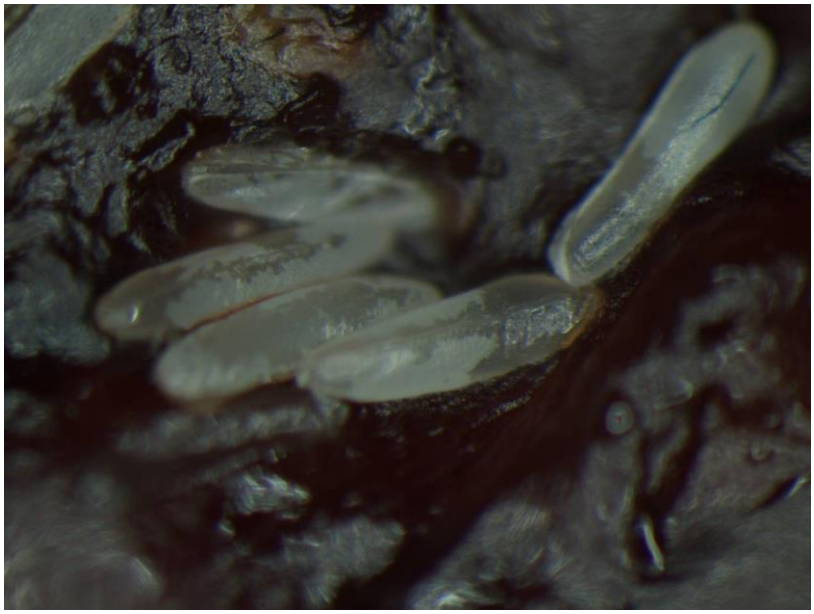
Şekil 46: Ciğer üzerine bırakılmış *L.sericata* yumurtaları



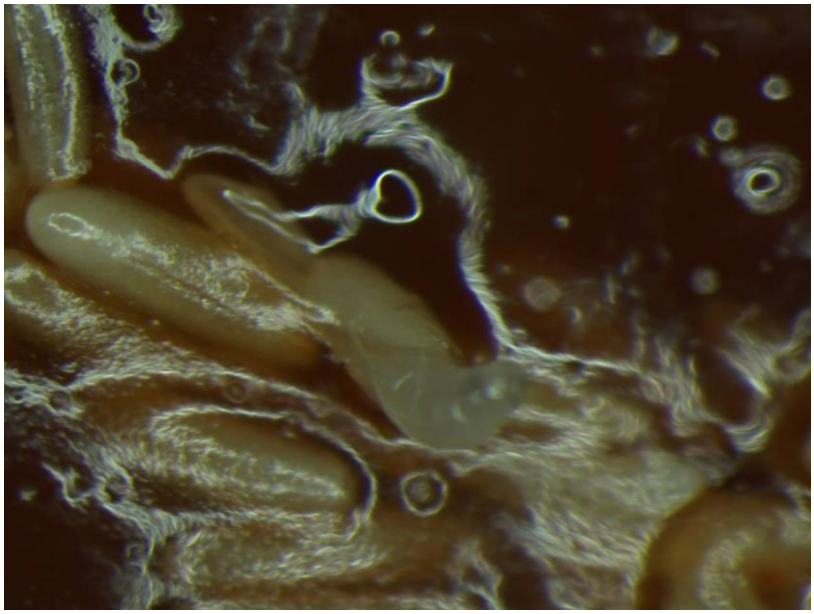
Şekil 47: 400 *L. sericata* yumurtasının aktarıldığı ciğer



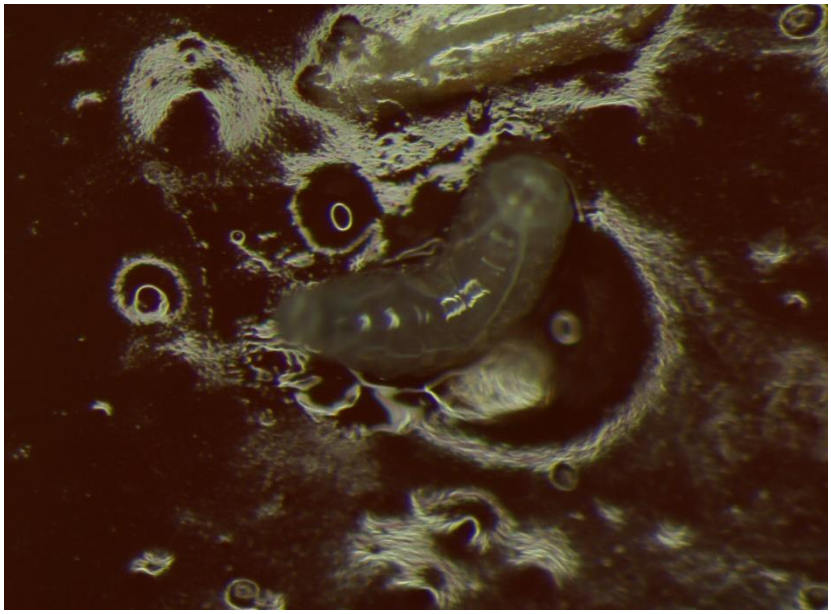
Şekil 48: *L. sericata*' ya ait olgunlaşmış yumurtalar



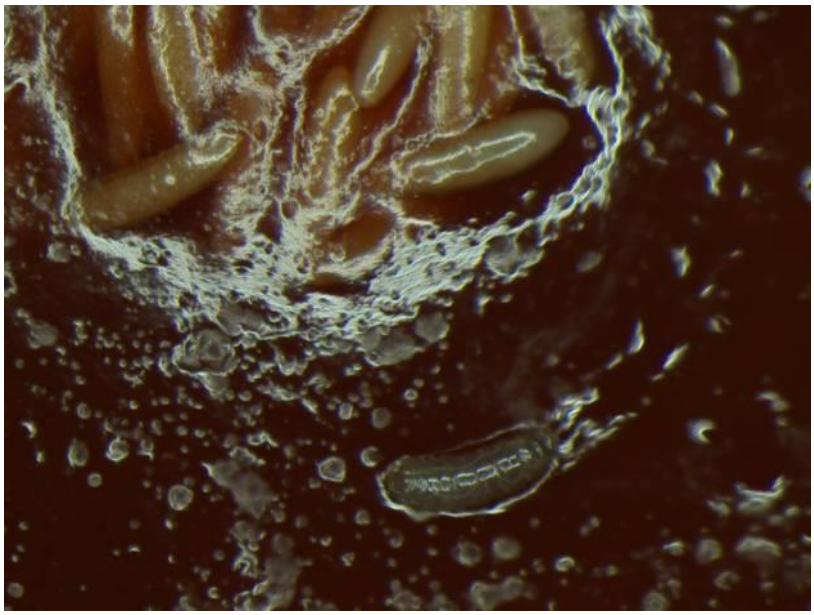
Şekil 49: *L. sericata'* ya ait olgunlaşmış yumurtalar



Şekil 50*: L. sericata* yumurtalarından 1. evre larva çıkışı



Şekil 51: *L. sericata* 1. evre larva



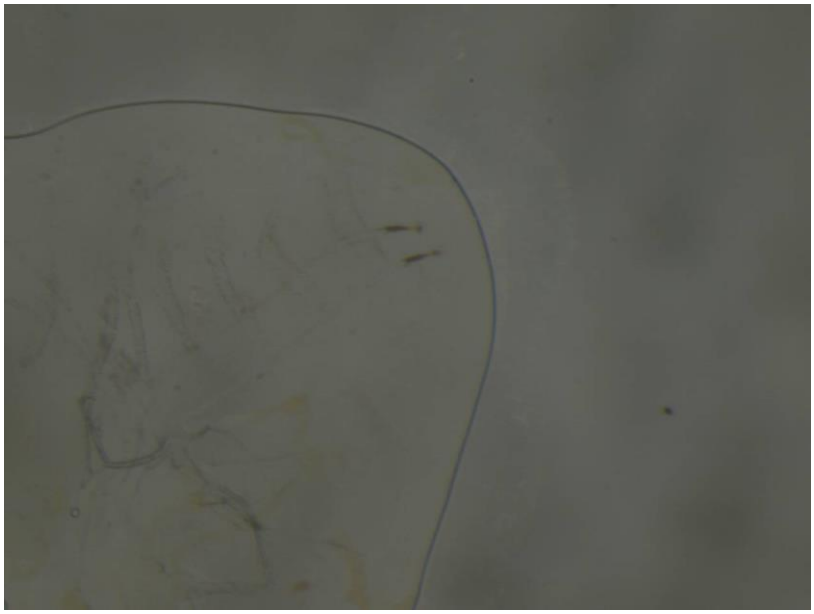
Şekil 52: *L. sericata* 1. evre larvanın besine ilerleyişi



Şekil 53: *L. sericata* boş yumurtaları



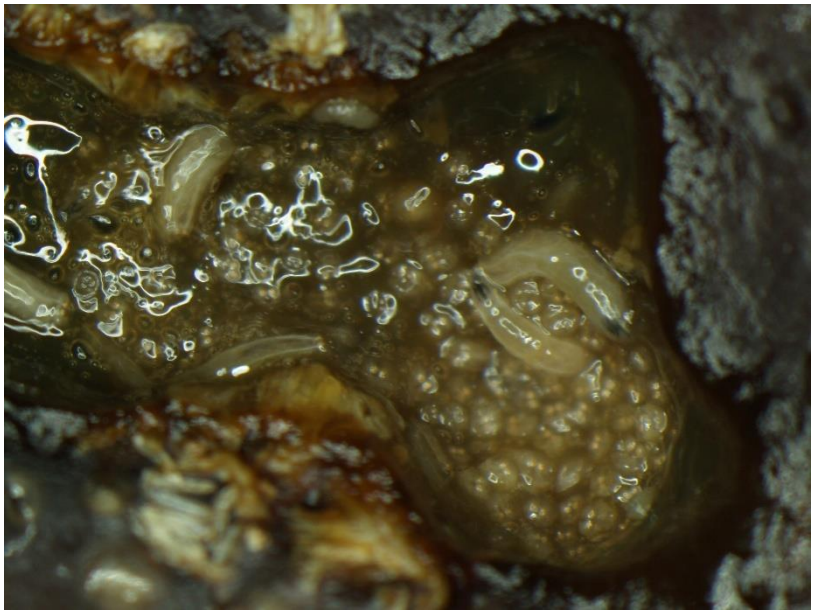
Şekil 54: *L. sericata* 1. evre larva



Şekil 55: *L. sericata* 1. evre larvaya ait solunum yarıkları



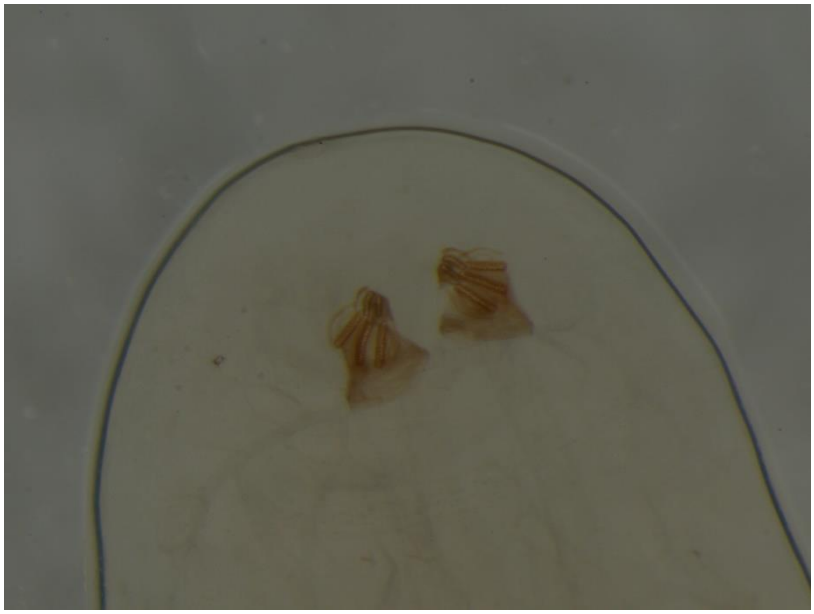
Şekil 56: *L. sericata* 2. evre larva



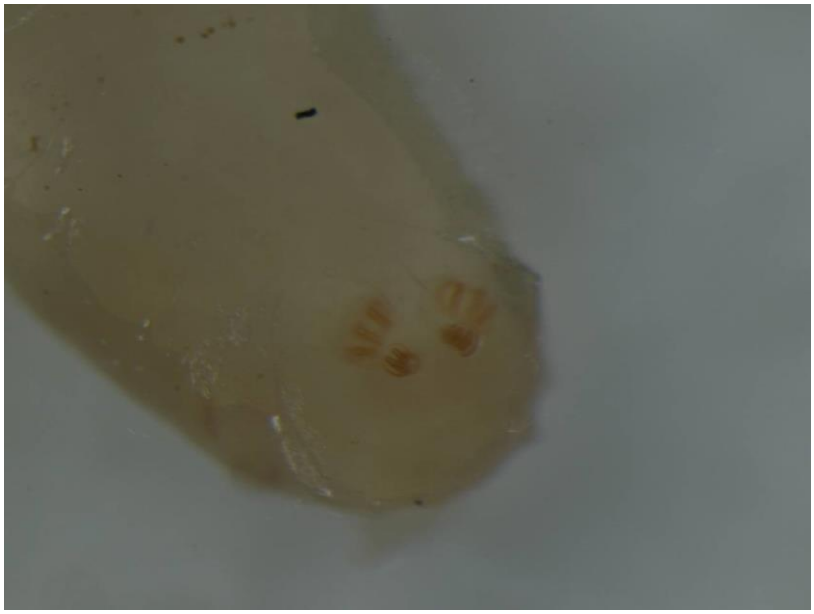
Şekil 57: *L. sericata* larvalarının ciğer içinde beslenmeleri



Şekil 58: *L. sericata* 2. evre larvaya ait solunum yarıkları



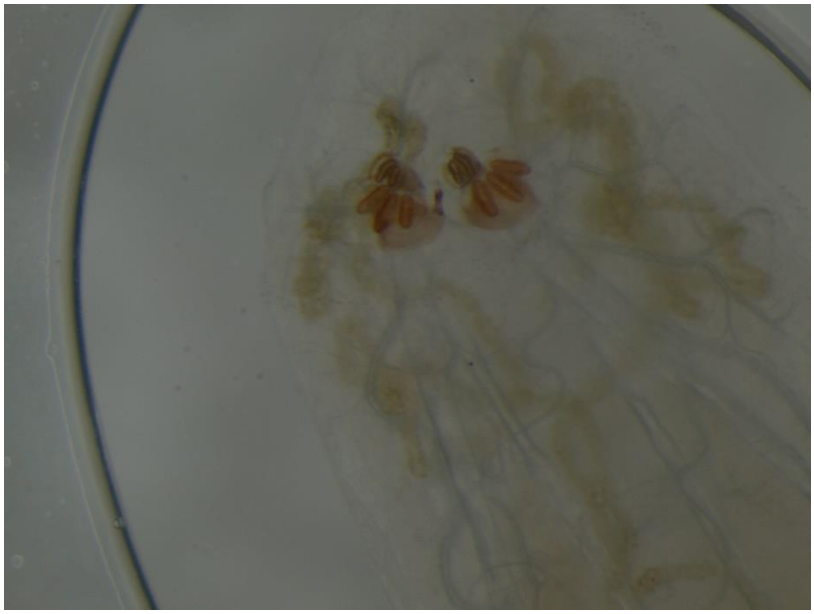
Şekil 59: *L. sericata* 2. evre ‘den 3. evreye geçişte solunum yarıkları



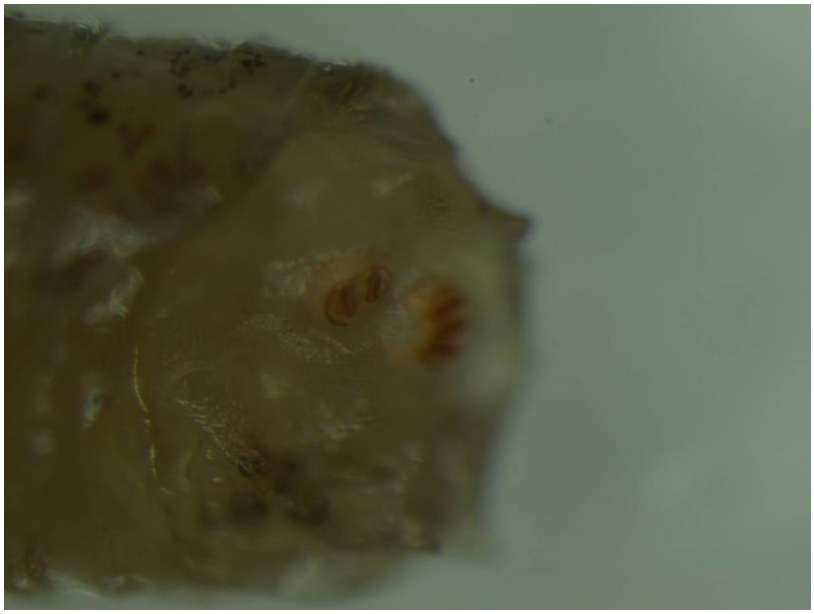
Şekil 60: *L. sericata* 2. evre ‘den 3. evreye geçerken deri değişimi



Şekil 61: *L. sericata* 2. evre ‘den 3. evreye geçişte solunum yarıkları



Şekil 62: *L. sericata* 2. evre ‘den 3. evreye geçişte solunum yarıkları



Şekil 63: *L. sericata* 2. evre larvadan 3. evre larvaya geçerken deri değişimi



Şekil 64: *L. sericata* 2. evre larvadan 3. evre larvaya geçerken deri değişimi



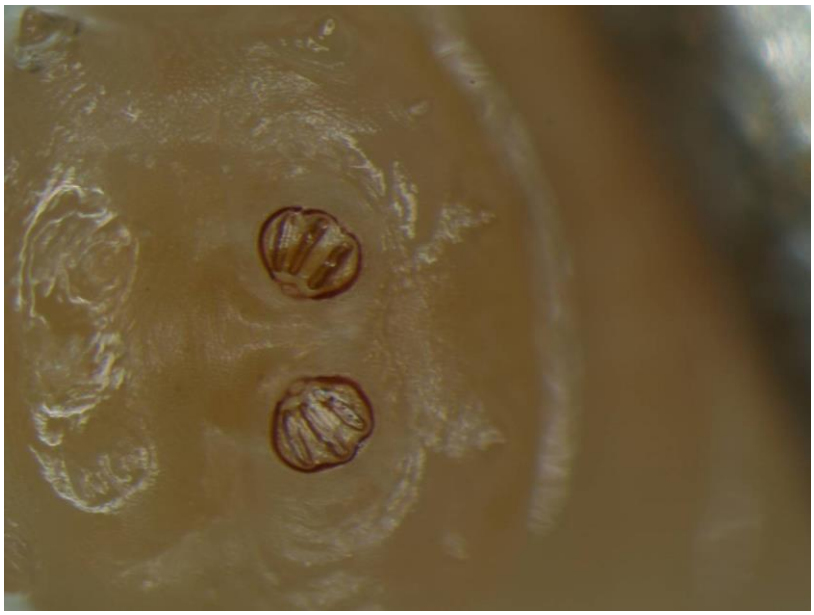
Şekil 65: *L. sericata* 2. evre larvadan 3. evre larvaya geçerken deri değişimi



Şekil 66: *L. sericata* 2. evre larvadan 3. evre larvaya geçerken deri değişimi



Şekil 67: *L. sericata* 3. evre larvaya ait solunum yarıkları



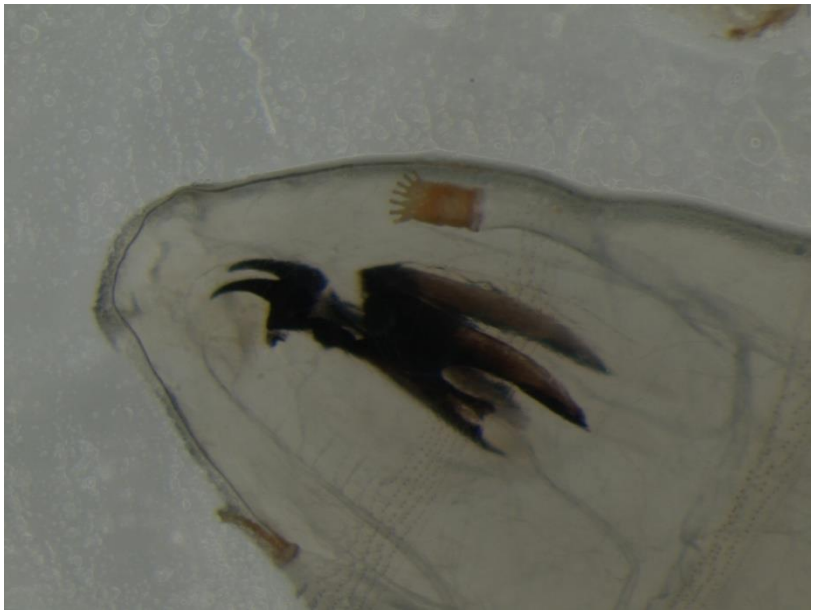
Şekil 68: *L. sericata* 3. evre larvaya ait solunum yarıkları



Şekil 69: *L. sericata* 3. evre larvaya ait solunum yarıkları



Şekil 70: *L. sericata* beslenen 3. evre larva



Şekil 71: *L.sericata* 3. evre larvada siklerit ve ön stigma



Şekil 72: *L. sericata* beslenen 3. evre larva



Şeki 73: *L. sericata* beslenen 3. evrenin deri değişimi



Şekil 74. *L. sericata* gezici evre larva (pupa öncesi 3. evre larva)



Şekil 75. *L. sericata* larvasının deri değişimi



Şekil 76: Talaşa geçen *L.sericata* 3. evre larvaları



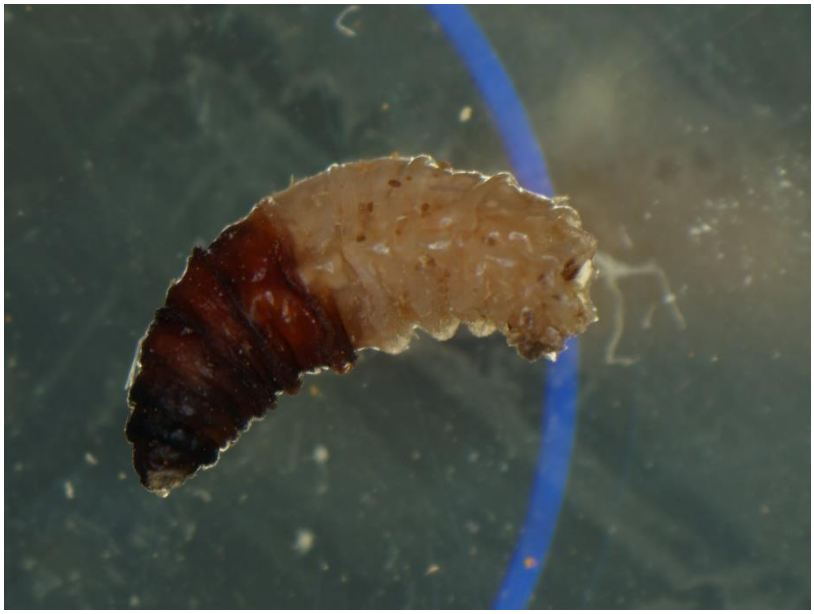
Şekil 77: Beslenme sonrası ciğerin durumu



Şekil 78: Talaşa geçen *L.sericata* 3. evre larvalarının pupa öncesi görünümü



Şekil 79: Talaşa geçen *L.sericata* 3. evre larvalarının pupa öncesi renk değişimi



Şekil 80: *L.sericata* gezici larvanın pupa olurken renk değişimi



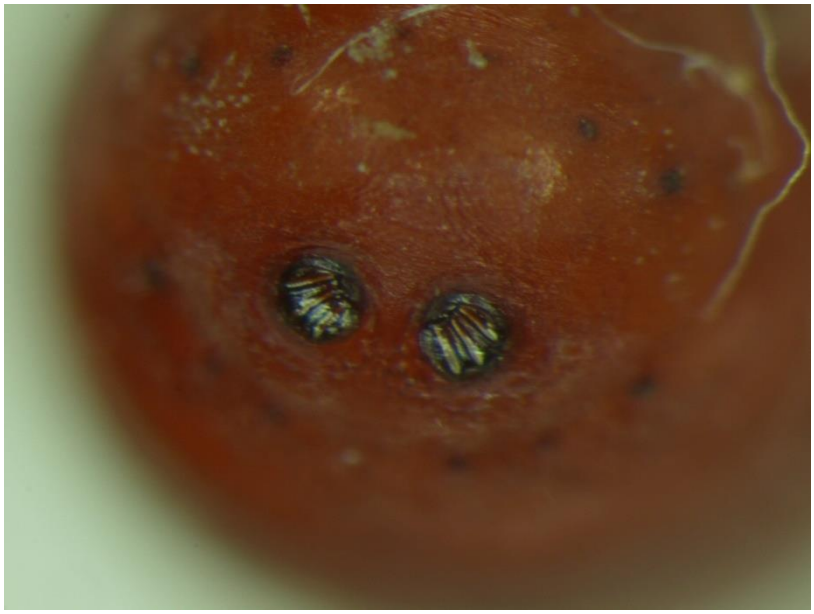
Şekil 81: Gezici *L.sericata* larvasının pupaya dönüşümü



Şekil 82: *L.sericata* pupaları (genç pupalar)



Şekil 83: *L.sericata* pupaları



Şekil 84: *L.sericata* pupasındaki solonum yarıkları



Şekil 85: *L.sericata* pupaları



Şekil 86: *L. sericata*' ya ait Pupa



Şekil 87: *L. sericata* pupasından sinek çıkışı



Şekil 88: *L. sericata* pupasından sinek çıkışı



Şekil 89: *L. sericata* pupasından sinek çıkışı



Şekil 90: *L. sericata*' ya ait pupa içinde sineğin duruşu



Şekil 91: Pupadan yeni çıkmış *L.sericata* sineği (kül renginde, kanatları buruşuk)



Şekil 92: Pupadan yeni çıkmış kül rengi *L. sericata* sineği(kanatları açılmış ve sertleşmiş)



Şekil 93: Orjinal rengini almış *L. sericata* sineği



Şekil 94: *L. sericata* sineğinin abdomeni (karnı)



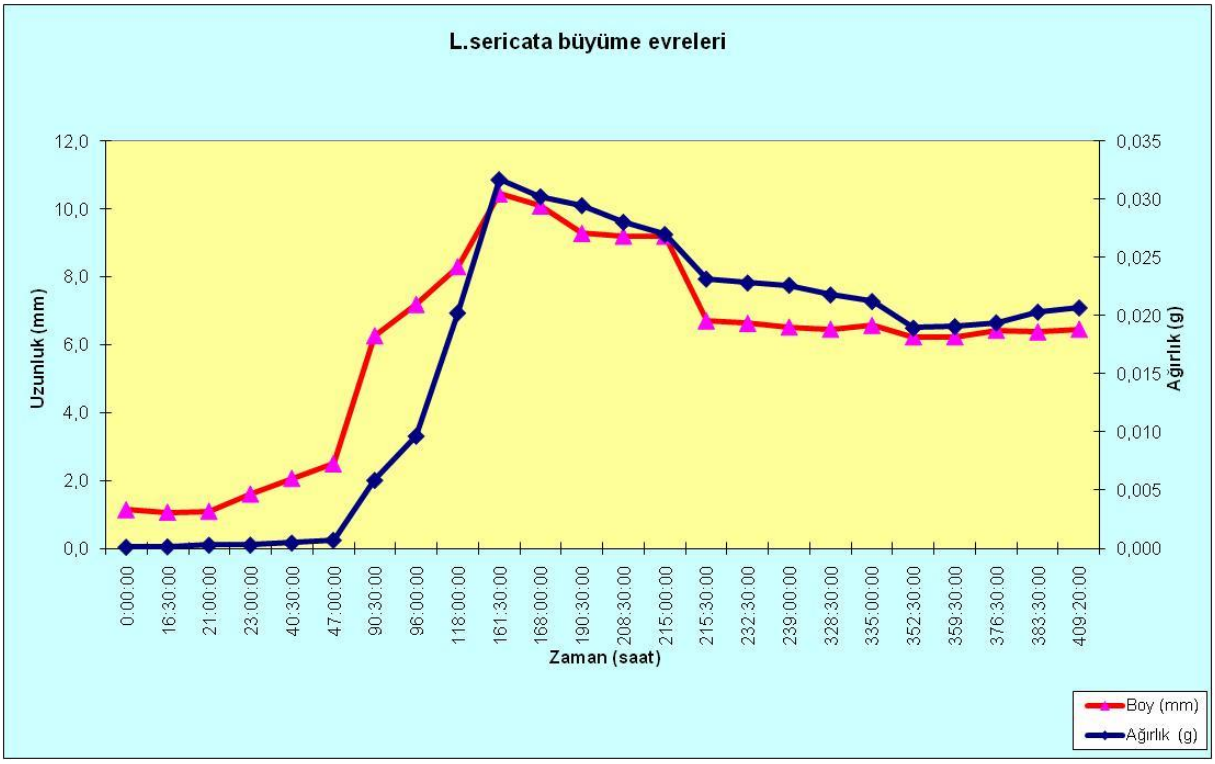
Şekil 95: *L. sericata* sineğinin kanatları



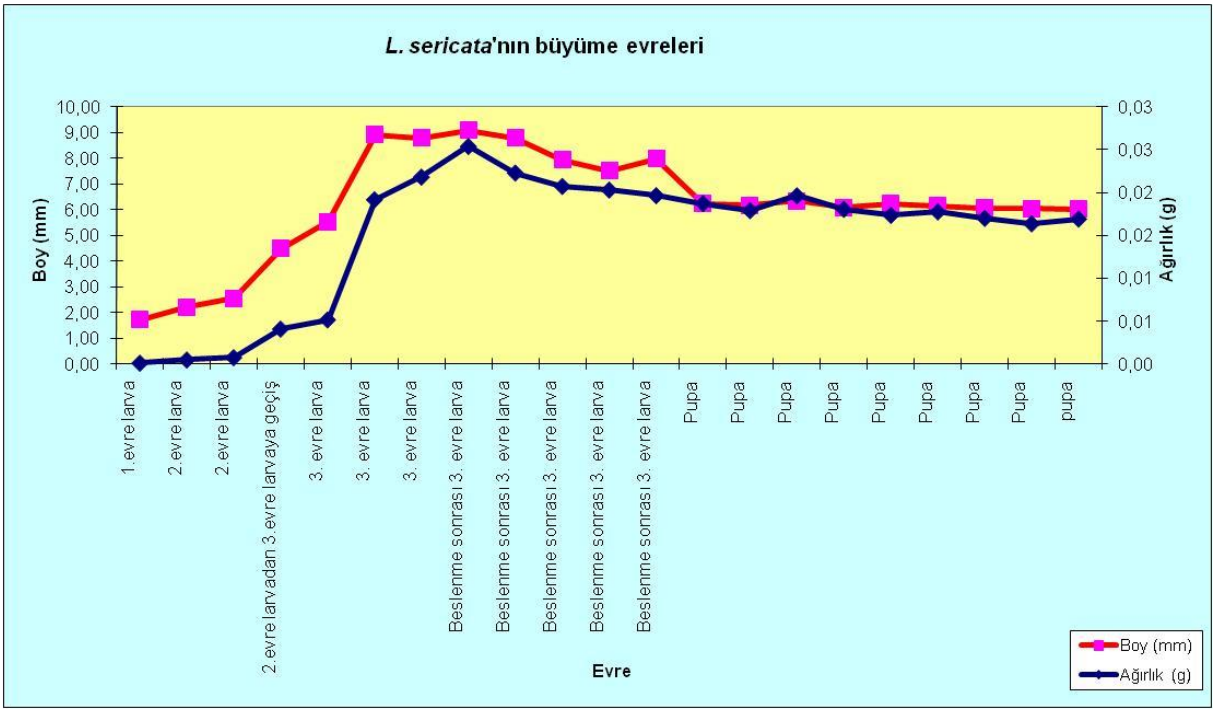
Şekil 96: *L. sericata* sineği

Yumurtadan çıkan genç larvalar, ceseti tüketmeye başlarlar ve üç kez deri değiştirirler. Büyüme deri değiştirme ile olur. Eski kütikulanın yerine yenisi gelir. Deri değiştirme, larva evrelerini birbirinden ayırır. Üç larval evre morfolojik olarak ayırt edilebilir. Larvaların 12. segmentinin arka tarafında iki tane solunum deliği (stigma) görülür. Solunum deliklerinin içinde solunum yarıkları bulunur. Yarıklar 1,2 veya 3 tane olabilir ki, bunların adeti larvanın 1., 2. veya 3. evrede olduğunu gösterir (2,43,51).

Tamamen büyümüş olan larva, beslenmeyi bırakır ve cesetten uzaklaşmaya başlar. Bu evredeki larva beslenme sonrası üçüncü evre larva olarak adlandırılır (50). Larva döneminde elde ettikleri enerjilerini, pupa safhasından erişkin sineğe dönüşümde yani metamorfozda kullanmaktadırlar (49). Larvanın boyu kısalır, rengi koyulaşır, etrafı sert kitin tabaka ile kaplanır ve pupa haline geçer. Son larva evresi ile ergin arasında hareketsiz ve besin alınmayan evreye pupa evresi denir. Larval evredeki birçok yapı tamamen ortadan kalkar. Ergine ait taslaklar büyüdükçe, larvaya özgü organların aynı ölçüde yıkılması gereklidir. Çözülen ve parçalanan hücreler çoğunluk fagositler tarafından hücre içi sindirime uğratılarak ortadan kaldırılır (43,52). Pupadan ergin sinek çıkar.

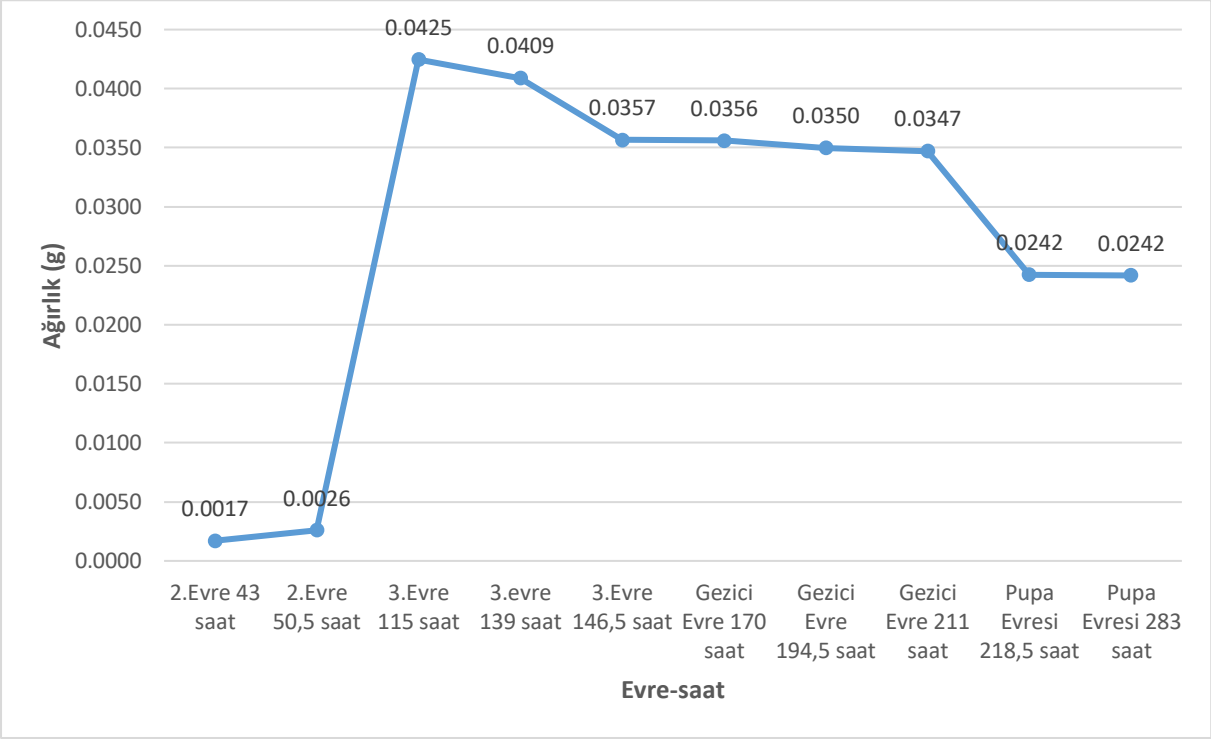


Şekil 97 (a): *L.sericata* larvalarının ortalama ağırlık ve ortalama boy uzunluklarının saatlere göre karşılaştırılması

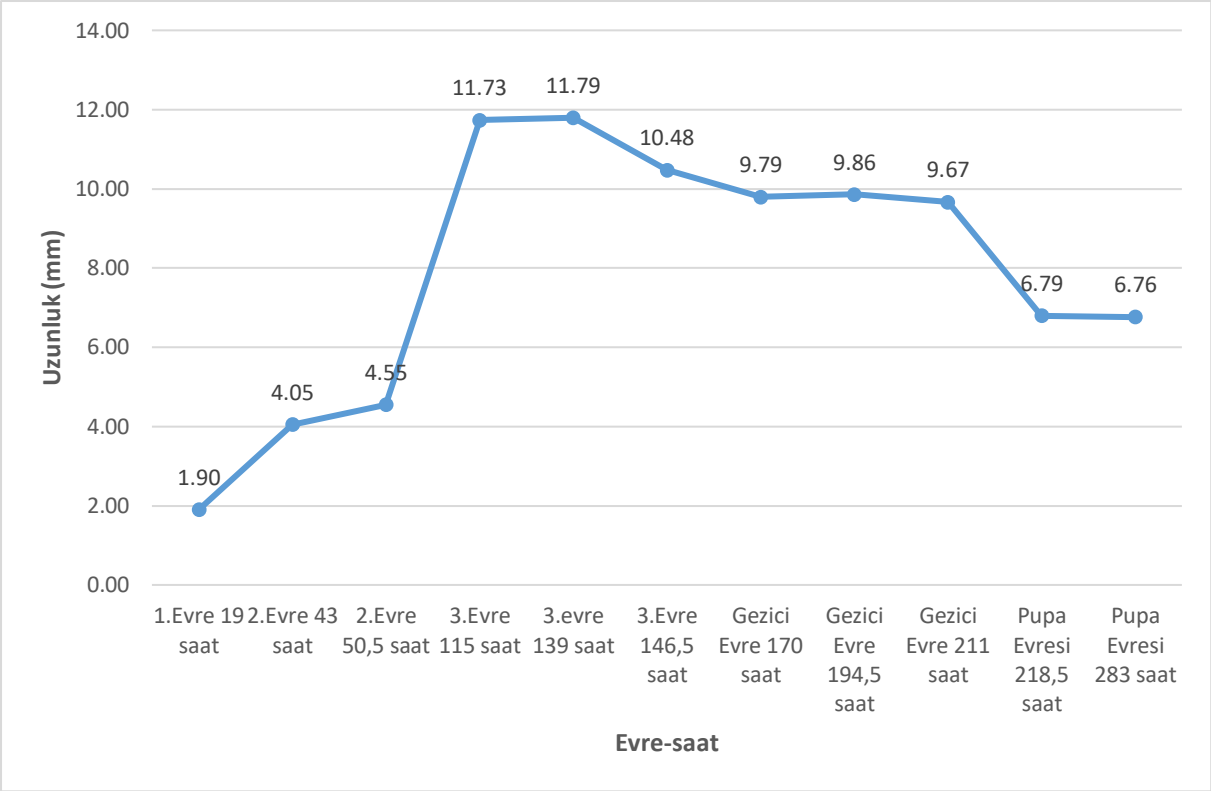


Şekil 97 (b): *L.sericata* larvalarının ortalama ağırlık ve ortalama boy uzunluklarının büyüme evrelerine göre karşılaştırılması

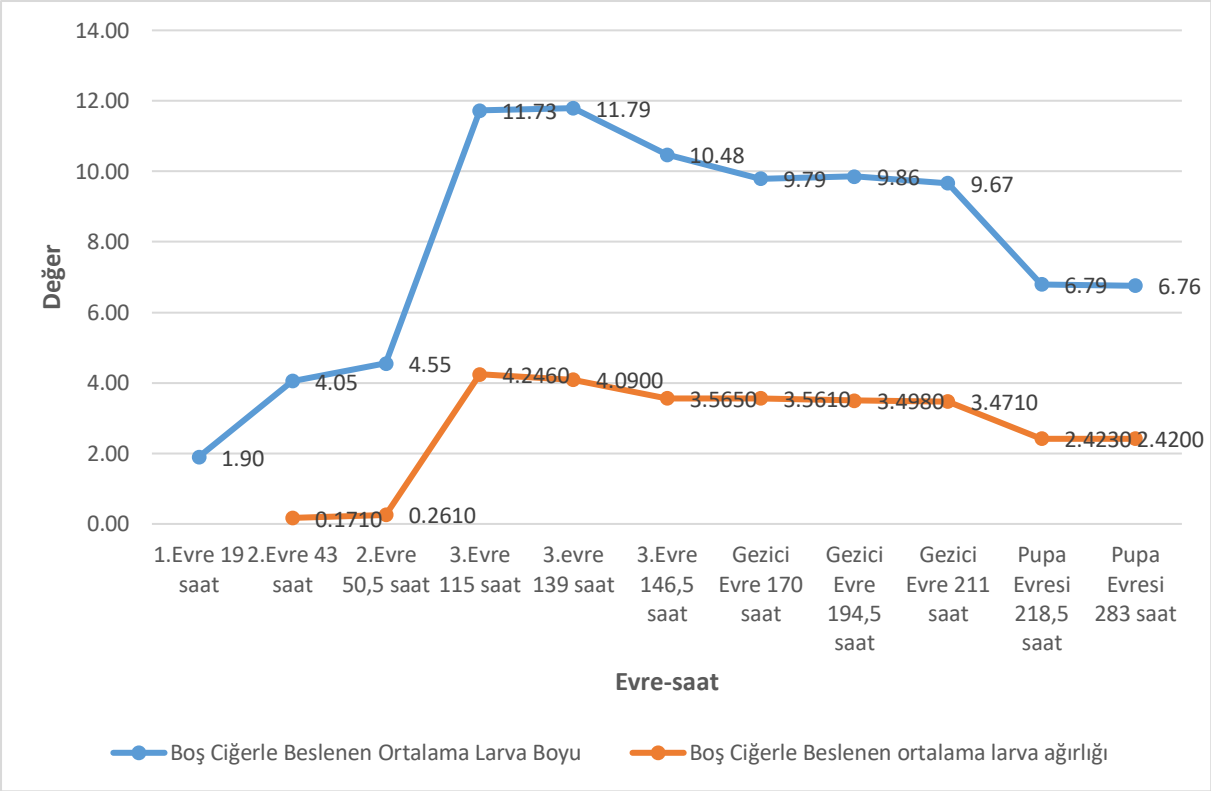
L. sericata erişkinlerinin 7-8 gün içinde yumurta vermeye başladığı, 15 günde yumurta sayısının en yüksek düzeye ulaştığı ve bir dişi sineğin 30 dakikada ortalama 400 yumurta bıraktığı gözlenmiştir. Yumurtadan ilk larva çıkışının 16 saatte başladığı; larvaların I.evresinin 24 saat, II. evresinin 50.5 saat, III. evresinin 72 saat, gezici evrenin 53 saat, pupa evresinin 168 saat sürdüğü tespit edilmiştir. Larvaların boy ve ağırlığının III. evrede en yüksek değere ulaştığı tespit edilmiştir. *L.sericata'* nın erişkininin ömrünün 35 gün ve hayat döngüsünün ortalama 50 gün olduğu belirlenmiştir (Şekil 97 (a), Şekil 97 (b)).



Şekil 98 (a): Boş ciğer (Kimyasal madde katılmamış ciğer) ile beslenen L.sericata larvalarının ortalama ağırlığı (g)



Şekil 98 (b): Boş ciğer (Kimyasal madde katılmamış ciğer) ile beslenen *L. sericata* larvalarının ortalama boy uzunlukları (mm)

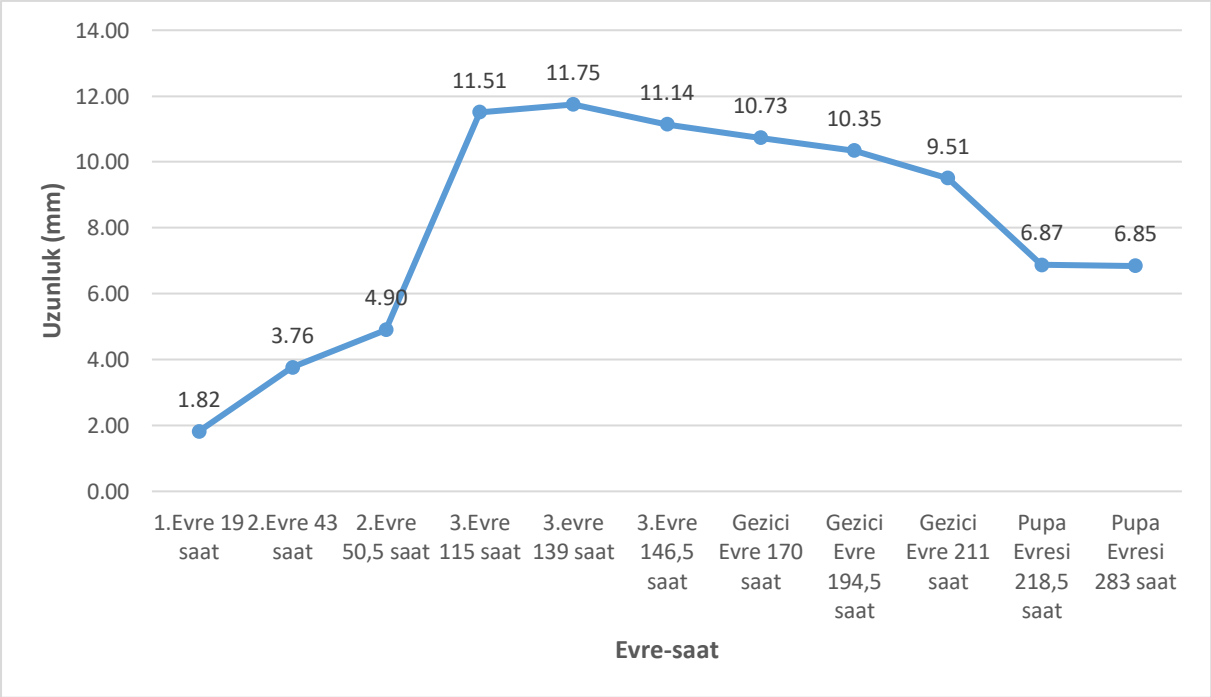


Şekil 98 (c): Boş ciğer (Kimyasal madde katılmamış ciğer) ile beslenen *L.sericata* larvalarının ortalama boy uzunluklarının (mm) ve ortalama ağırlıklarının (g) karşılaştırılması

Boş ciğer (Kimyasal madde katılmamış ciğer) ile beslenen *L. sericata* larvalarının ortalama boy uzunlukları (mm) ve ortalama ağırlıkları (g) karşılaştırıldığında; larvaların ortalama ağırlık ve ortalama boy uzunluklarının tüm evrelerde birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Beslenmenin en fazla olduğu 3. evrede *L. sericata* larvalarının büyüme değerleri en yükseğe çıkmaktadır ancak beslenmenin yapılmadığı gezici evre ve pupa evrelerinde ağırlık ve boy ölçülerinin azalmakta olduğu, daha sonra bu değerlerin sabit kaldığı tespit edilmiştir (Şekil 98 (c)).

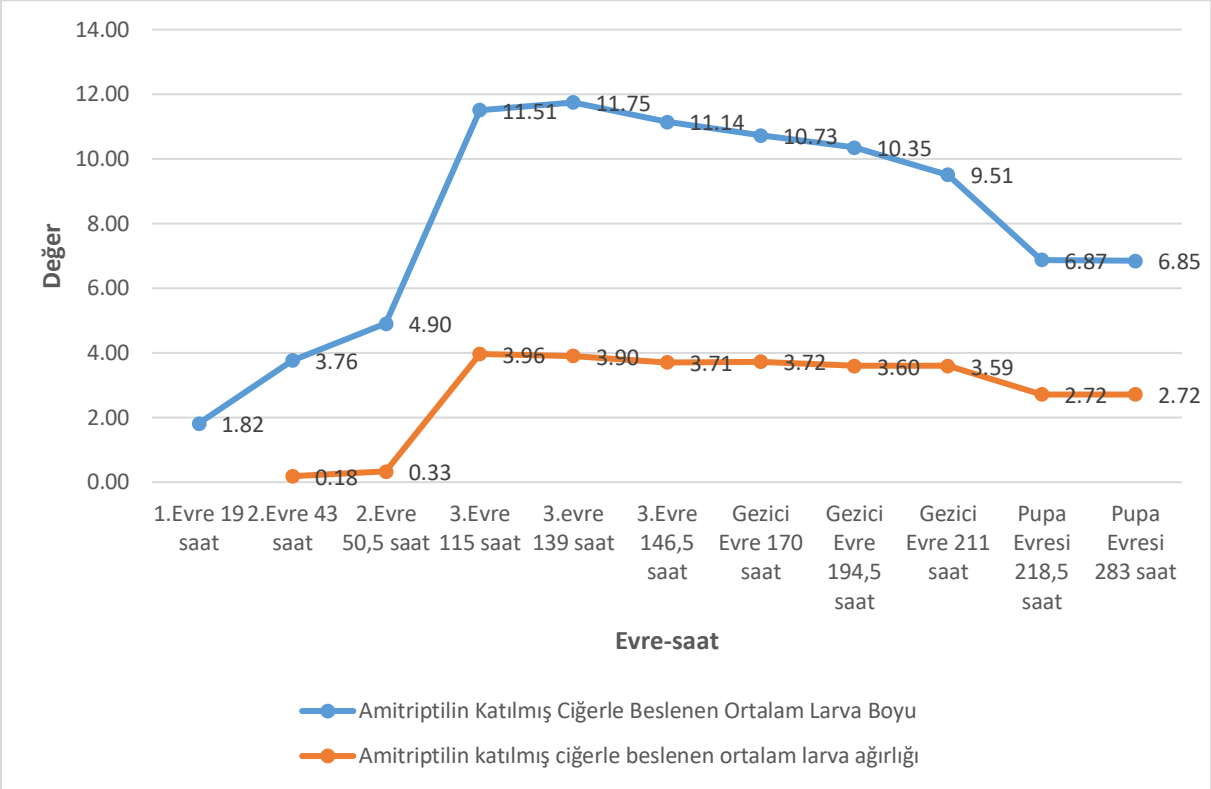


Şekil 99 (a): Amitriptilin katılarak hazırlanmış ciğer ile beslenen *L.sericata* larvalarının ortalama ağırlıkları (g)

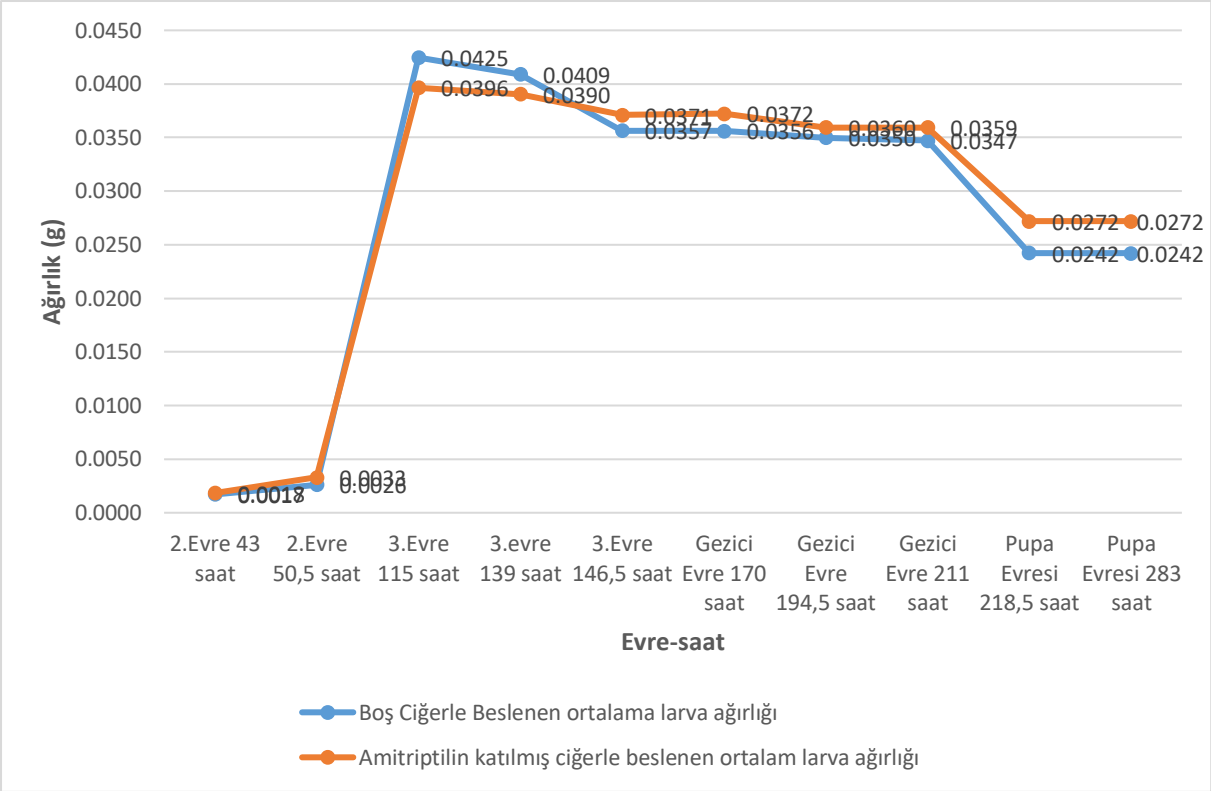


Şekil 99 (b): Amitriptilin katılarak hazırlanmış ciğer ile beslenen *L. sericata* larvalarının ortalama boy uzunlukları (mm)

L. sericata larvalarının 139. saatte ve 3. evrede; 11,75 mm değeri ile en yüksek boyda olduğu görülmektedir (Şekil 99 (b)).

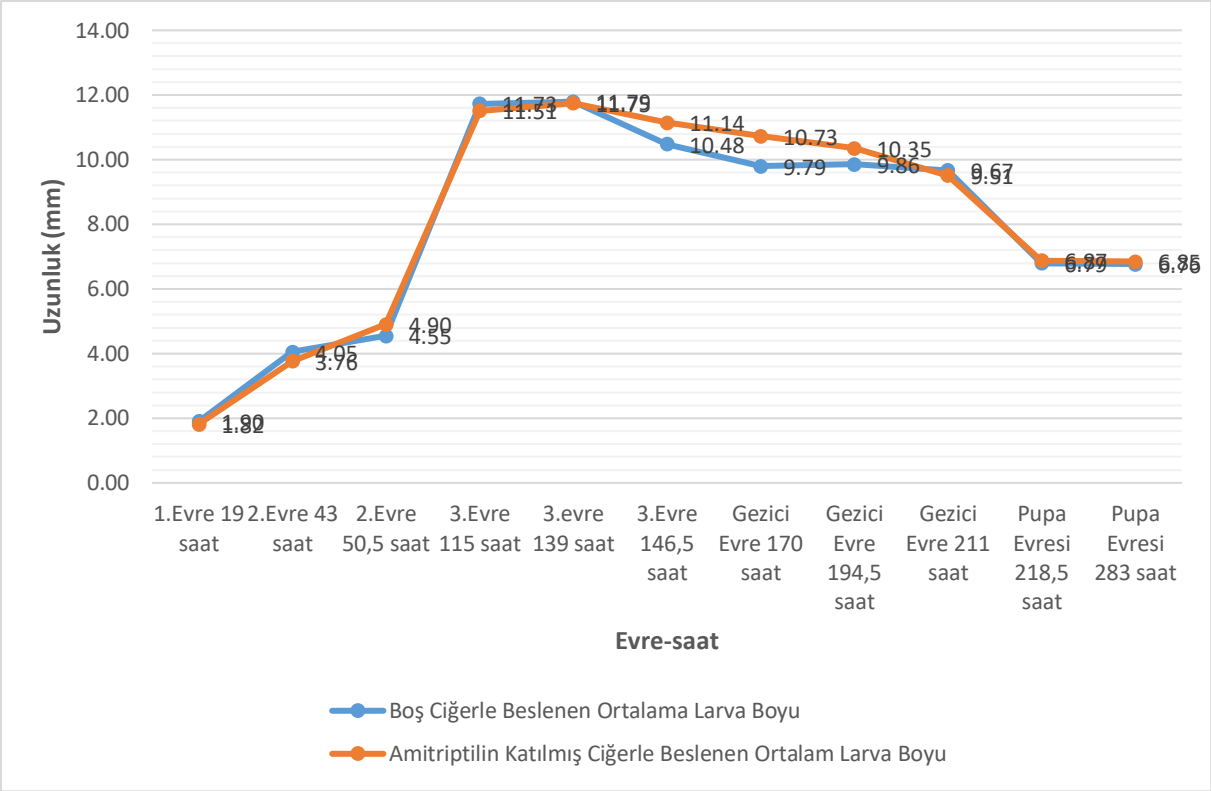


Şekil 99(c): Amitriptilin katılarak hazırlanmış ciğer ile beslenen *L. sericata* larvalarının ortalama boy uzunluklarının (mm) ve ortalama ağırlıklarının (g) karşılaştırılması



Şekil 100: Amitriptilin katılarak hazırlanmış ciğer ve boş ciğer (kimyasal madde katılmamış ciğer) ile beslenen *L.sericata* larvalarının ortalama ağırlıklarının (g) karşılaştırılması

3. Evrede 115. saatten 140. saate kadar boş ciğer ile beslenen *L. sericata* larvalarının ortalama ağırlıkları amitriptilinli ciğer ile beslenen *L. sericata* larvalarının ortalama ağırlığından daha fazla olduğu ancak 146,5. saatten sonraki tüm evrelerde amitritilinli ciğer ile beslenen larvaların ortalama ağırlığının daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 100).



Şekil 101: Amitriptilin katılarak hazırlanmış ciğer ve boş ciğer (kimyasal madde katılmamış ciğer) ile beslenen *L.sericata* larvalarının ortalama boy uzunluklarının (mm) karşılaştırılması

1.evrenin başlangıcından yaklaşık 140. saate kadar olan evrelerde boş ciğer ile beslenen *L.sericata* larvalarının, hemen hemen birbirine yakın olduğu görülmektedir. 140. saatten sonra 211. saate kadar olan evrelerde; amitriptilinli ciğer ile beslenen *L. sericata* larvalarının ortalama boy uzunluklarının daha fazla olduğu ancak 211. saatten sonraki tüm evrelerde her iki grubunda ortalama boy uzunluklarının birbiriyle uyumlu olduğu tespit edilmiştir (Şekil 101).

4.2. Adli Entomotoksikoloji Çalışmalarına Ait Bulgular

4.2.1. Yöntemin optimizasyonu

4.2.1.1. *Yöntemin validasyonu*

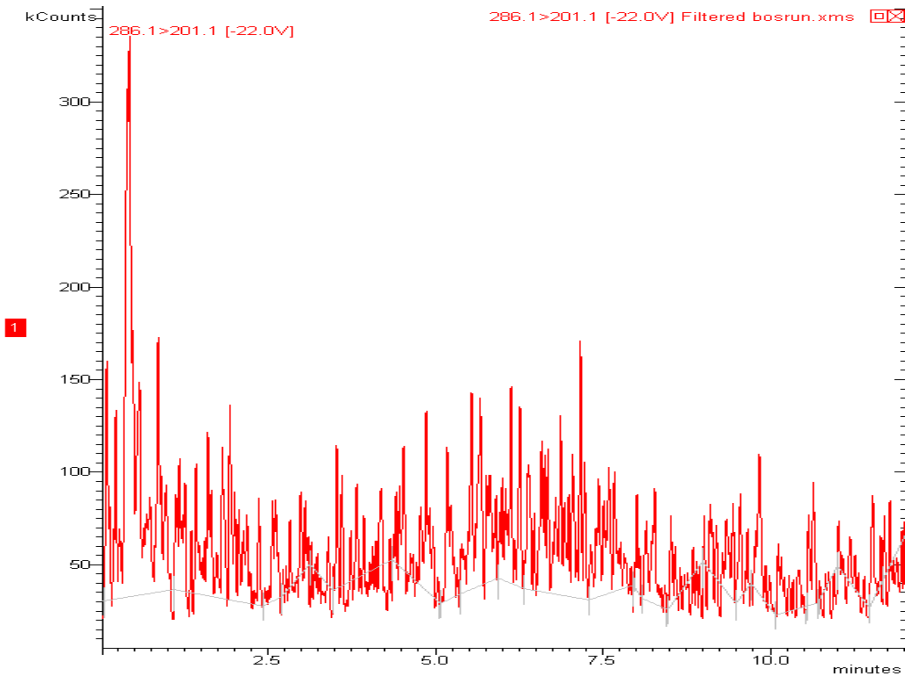
4.2.1.1.1 *Validasyon parametreleri*

Öncelikle morfin analizi için geliştirilen yöntemin doğrusallığı, seçiciliği ve larva matriksindeki geri kazanımı ve tekrarlanabilirlik parametreleri incelenmiştir.

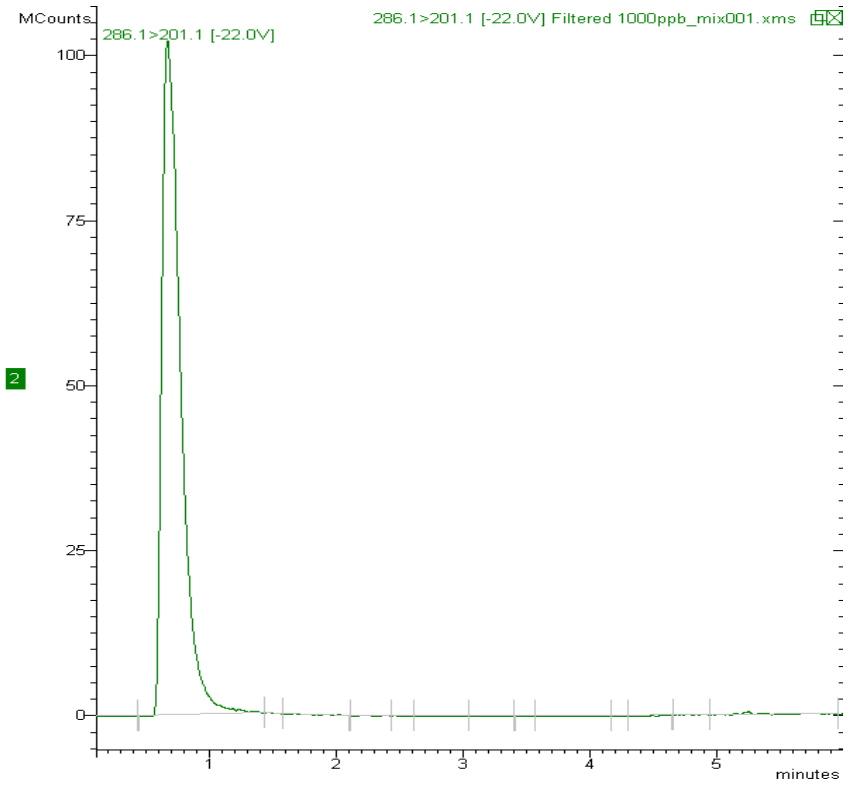
Morfin çalışması sonrası amitriptillin maddesi için larvadan ve ciğerden bir ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir.Validasyon parametrelerine ilişkin hesaplamalar, Excel programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.1.1.2. *Morfin için yöntem validasyonu*

• Seçicilik (Selectivity / Specificity) : 1 µg/mL morfin ve 2,5 mg/250 g morfin içeren ciğer yemiş larvalardan hazırlanan örneklerin ve bunların blanklerinin LC-MS-MS kromatogramları morfinin kütle spektrumundaki 286,0 kütle numaralı iyonun parçalanması ile elde edilen 201,0 kütleli iyondan elde edilmiştir. Kromatogramlar Şekil 105 ve 106' da gösterilmiştir.

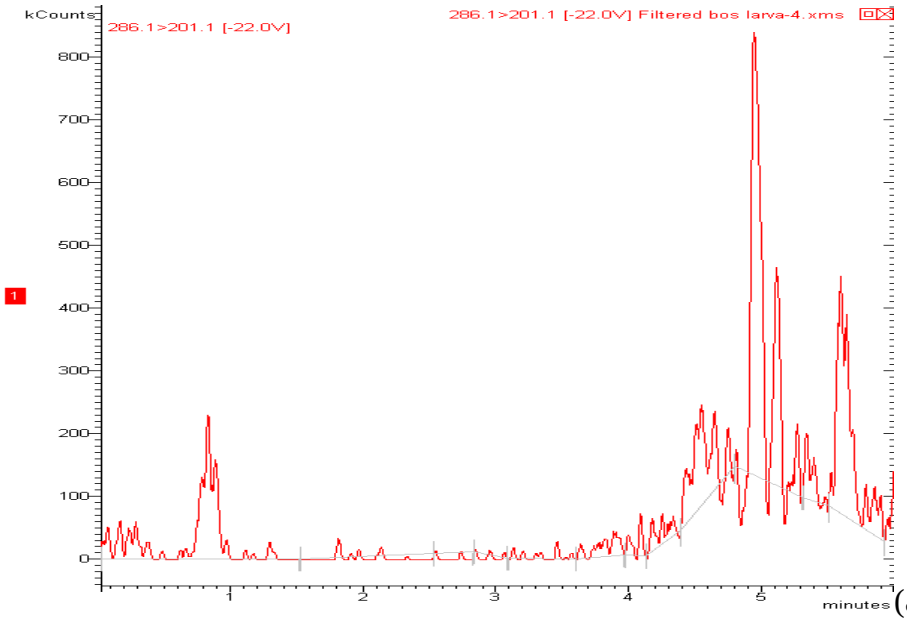


(a)

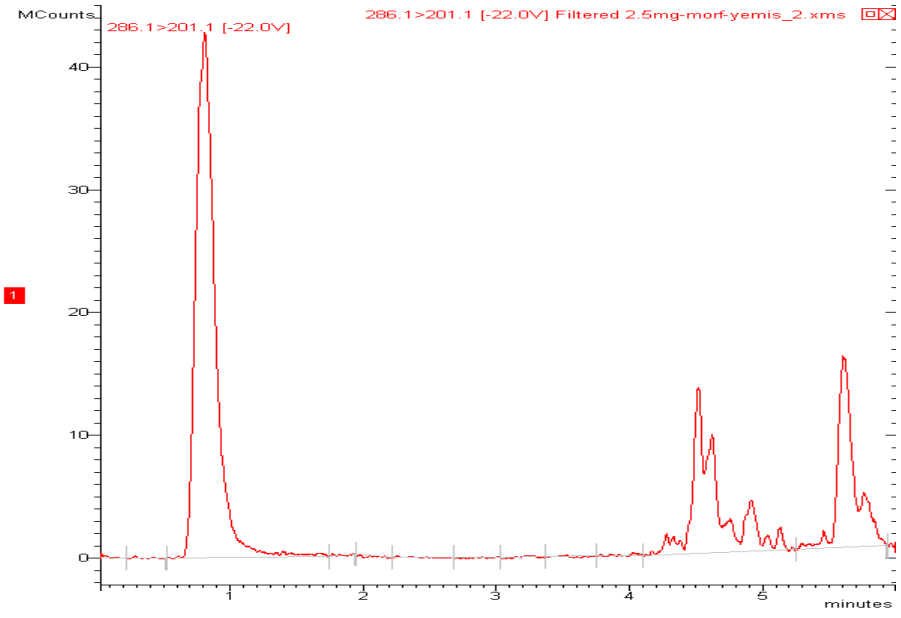


(b)

Şekil 105: Metanol çözücüsüne ilişkin morfin kanalında gözlenen kromatogram (a), 1000,0 $ngmL^{-1}$ konsantrasyonda morfin içeren metanolde gerçekleştirilen analiz sonucu gözlenen morfin piki (b)



(a)



(b)

Şekil 106: Madde ilave edilmemiş ciğerle beslenmiş boş larvada morfin kanalında gözlenen kromatogram (a), 7,5 morfin ilave edilmiş ciğer yemiş larvada gerçekleştirilen analiz sonucu gözlenen morfin piki (b)

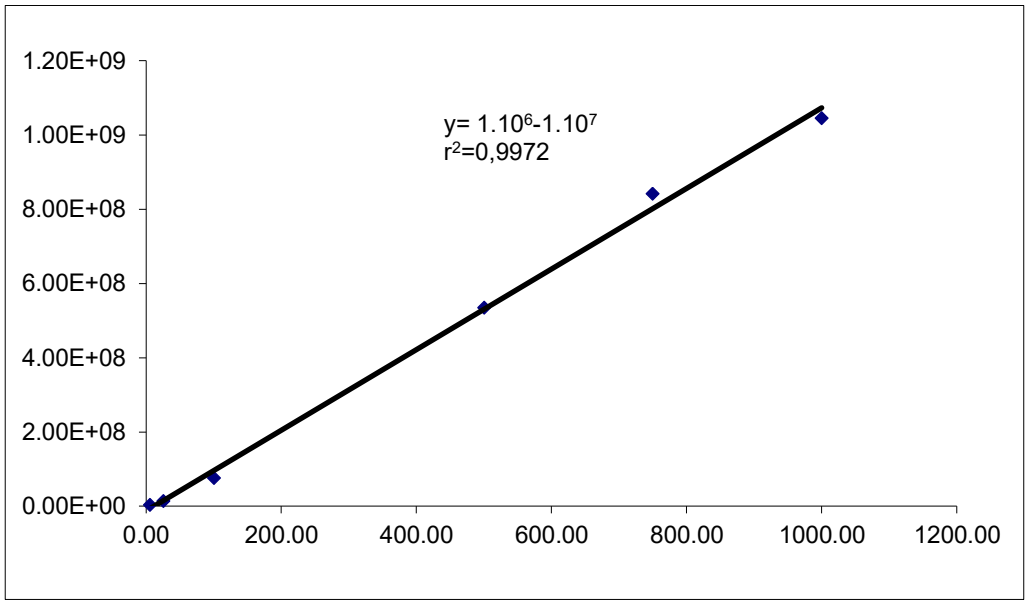
- **Doğrusallık, Kesinlik (Tekrarlanabilirlik) ve Geri Kazanım Değerleri**

Morfin için, 5,00, 25,00, 100,00, 500,00, 750,00 ve 1000,00 $ngmL^{-1}$ konsantrasyonlardaki standart çözeltilerle kalibrasyon eğrileri oluşturuldu (TabloVIII, Şekil 107)

Tablo VIII: 5,00, 25,00, 100,00, 500,00, 750,00 ve 1000,00 $ngmL^{-1}$ standart çözeltileri kullanılarak, larvadan ekstraksiyon çalışması öncesinde çizilen kalibrasyon grafiğine ilişkin değerler

Konsantrasyon ($ngmL^{1}$)	Pik-alanı (ort)	%RSD	$\%RSD_{ort}$
5.00	$1.92x10^{6}$	8,21	10,32
25.00	$1.25x10^{7}$	18,31	
100.00	$7.44\ x10^{7}$	18,84	
500.00	$5.34x10^{8}$	6,46	
750.00	$8.40x10^{8}$	5,90	
1000.00	$1.04x10^{9}$	4,20	

n≤6



Şekil 107: 5,00, 25,00, 100,00, 500,00, 750,00 ve 1000,00 $ngmL^{-1}$ morfin standart çözeltileri kullanılarak, larvadan ekstraksiyon çalışması öncesinde çizilen kalibrasyon grafiği

Ardından, larva örnek matrikslerine 1,0 $ngmL^{-1}$ konsantrasyonda (n=4) ekstraksiyon sonrası ve ekstraksiyon öncesi katım yapılarak, örneğin analizi sonucu elde edilen geri kazanım

hesaplandı. Morfin için larva matriksinden elde edilen geri kazanımlar tekrarlanabilir olmadığından, bu yöntemle morfin için sadece tarama testi olarak, örneğin içinde var olup olmadığına ilişkin bir bilgi elde edilebileceği anlaşıldı. Morfin için kullanılan yöntemin seçiciliğinin yüksek olması (Şekil 105, 106) ise, bu yöntemin morfin için ciğer veya larva örneğinde tarama testi olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Tablo IX: Farklı günlerde çalışılmış olan ESMK ve EOMK larva örneklerine ilişkin geri kazanım sonuçları ESMK: Ekstraksiyon sonrası morfin katılmış, EÖMK: Ekstraksiyon öncesi morfin katılmış

Konsantrasyon	% Geri Kazanım (ort) [a]	%RSD[a]	$\%u_{rel}$[a]
1,00 $ngmL^{-1}$	21,04	16,76	0,56
1,00 ngmL	74,02	11,26	0,16
1,00 ngmL	36,99	1,60	0,01
1,00 ngmL	21,13	5,75	0,08

[a] $n \geq 4$

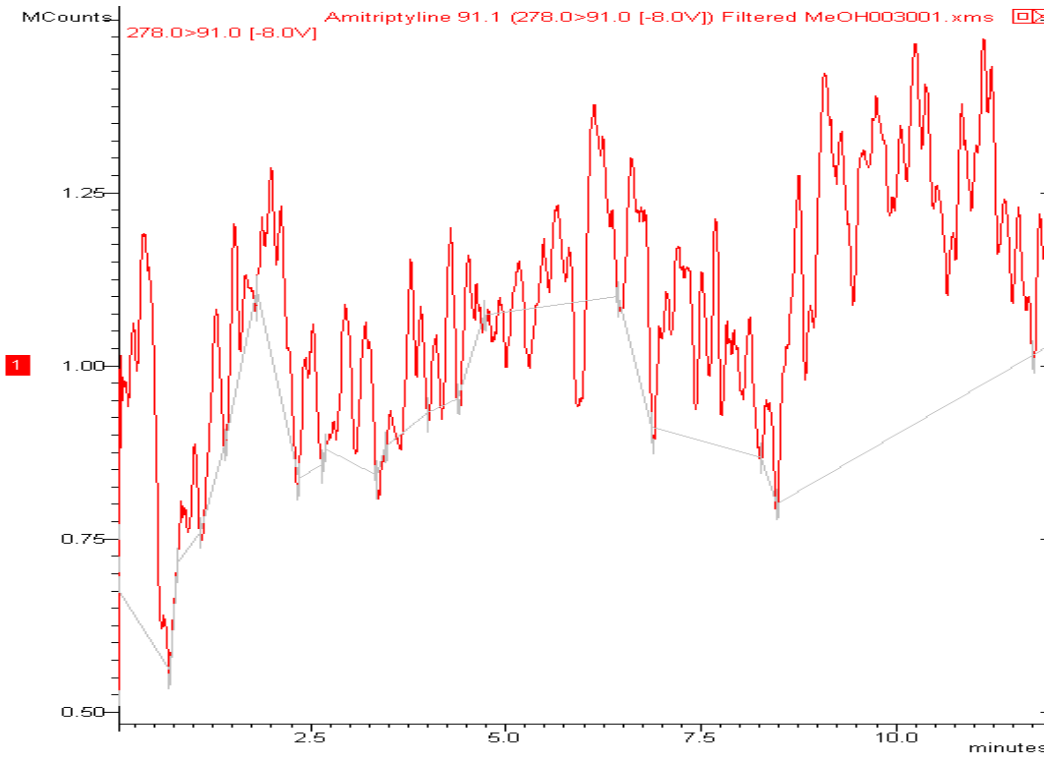
Morfin için bu yöntemle kantitatif analiz yapılamayacağından, bundan sonraki miktar tayinine yönelik validasyon çalışmaları sadece amitriptillin için gerçekleştirildi.

Morfin standart çözeltileri kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği lineer çıkmasına rağmen larva matriksinin karmaşık ve yağlı olması nedeni ile larvada morfin ekstraksiyonu sonucu elde edilen geri kazanımların tekrarlanabilir olmadığı tespit edilmiştir. Bu sebeple; kantitatif analiz gerçekleştirilememiştir. Bunun nedenleri irdelendiğinde; larvanın aşırı yağlı bir matriks oluşturması ve ESİ koşullarında morfinde yeterli iyonlaşma sağlanamamasından dolayı bu sorunun ortaya çıkmasının mümkün olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte geri kazanım % 21 veya % 74 arasında değişse de morfinin larvada en azından kalitatif olarak tespit edilebildiği

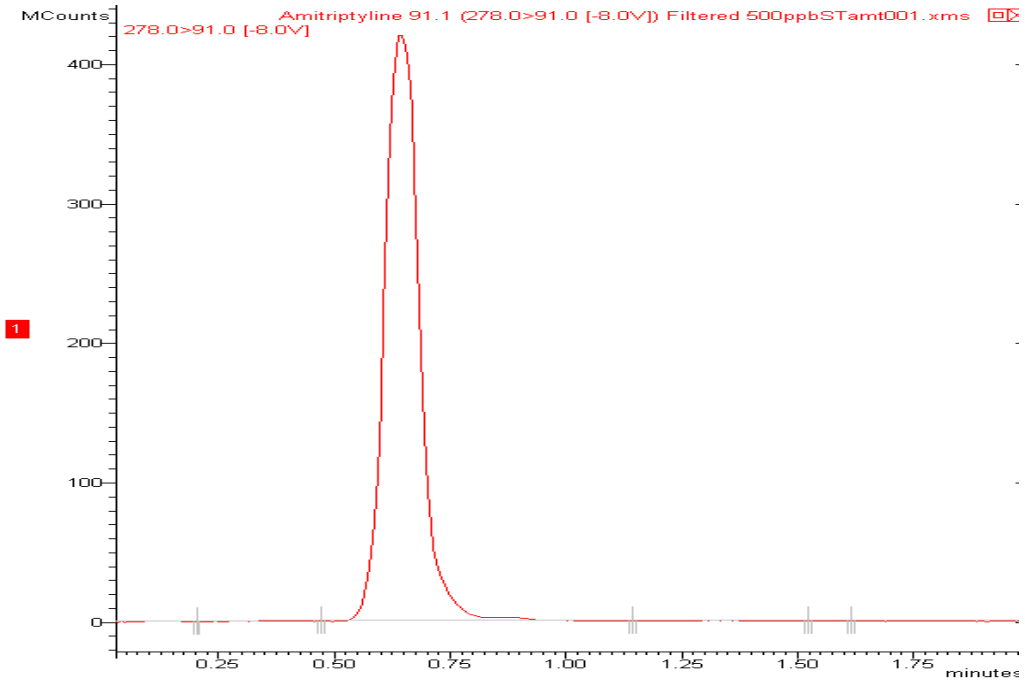
görülmüştür. Ancak metodun kantitatif olarak tekrarlanabilirliğinin olmaması validasyona engel teşkil etmiştir.

4.2.1.1.3.*Standart çözeltilerde amitriptillin tayini için yöntemvalidasyonu*

• **Seçicilik (Selectivity / Specificity) :** 500,00 $ngmL^{-1}$ amitriptillin standart çözeltisine ve bunun körü olan metanole ilişkin LC-MS-MS kromatogramları morfinin kütle spektrumundaki 278,0 kütle numaralı iyonun parçalanması ile elde edilen 91,0 kütleli iyondan elde edilmiştir. Kromatogramlar Şekil 105' de gösterilmiştir.



(a)



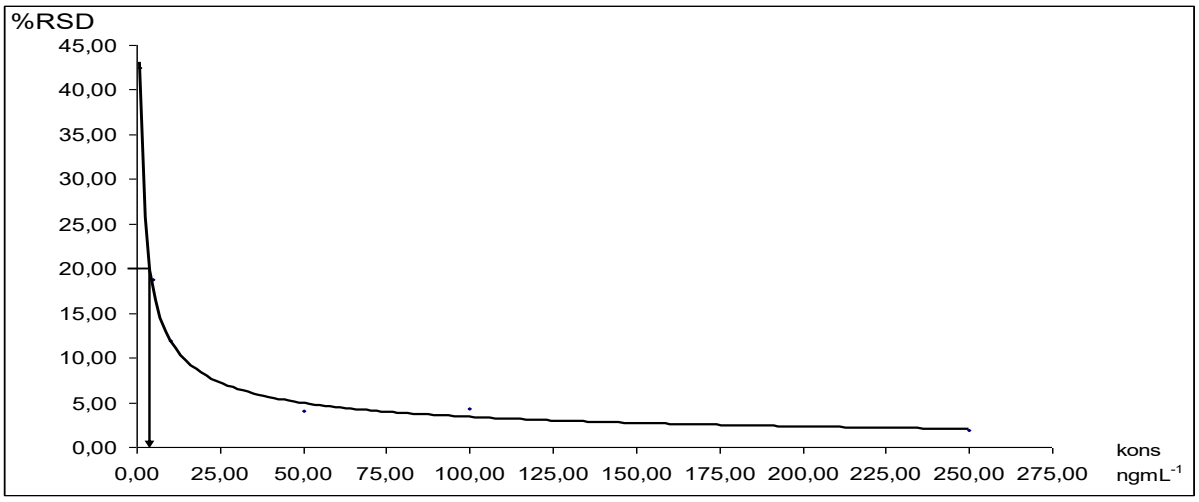
(b)

Şekil 108: Metanol çözücüsüne ilişkin amitriptillin kanalında gözlenen kromatogram (a), ciğerden ekstraksiyon çalışması öncesinde hazırlanmış olan, 500,0 $ngmL^{-1}$ amitriptillin standart çözeltisinde gerçekleştirilen analiz sonucu gözlenen amitriptillin piki (b)

• **Kesinlik (Precision), Tayin Limiti (Limit of detection, LOD), Ölçüm Limiti (Limit of quantitation, LOQ**) :Ekstraksiyon çalışmaları öncesinde hazırlanmış olan 1,00, 5,00, 10,00, 50,00 100,00 250,00, 500,00 ve 750,00 $ngmL^{-1}$ amitriptillin standart çözeltileri kullanılarak, her bir konsantrasyon için en az 6 analiz tekrarı yapılmıştır. Bu analizlerin ortalama, standart sapma ve % bağıl standart sapmaları alınmış (Tablo X) ve standart amitriptillin çözeltilerinde analiz yönteminin tekrarlanabilirliği % $RSD_{ortalama}$ cinsinden % 6,75 olarak bulunmuştur (Ortalama tekrarlanabilirlik hesabında kullanılmş olan en küçük konsantrasyon değeri LOQ değeridir). Yine aynı tablo değerleri kullanılarak Eurachem tarafından tavsiye edilen yöntemle amitriptilin konsantrasyonlarına karşı % RSD grafiği çizilerek, maksimum % RSD değeri olarak % 20 seçilmiş ve grafikte bu değere denk gelen konsantrasyon LOQ=5,00 $ngmL^{-1}$ olarak bulunmuştur (Tablo X, Şekil 108).

Tablo X. Ekstraksiyon çalışmaları öncesinde hazırlanmış olan amitriptillin standart çözeltileri kullanılarak, Eurachem tarafından tavsiye edilen yöntemle LOQ değerinin bulunması için tayin edilen amitriptillin konsantrasyonlarına karşı bulunmuş olan %RSD değerleri (LOQ=5,00 $ngmL^{-1}$)

Katılan amitriptilin standardının konsantrasyonu	**%RSD**
1,00	42,45
5,00	18,73
10,00	11,94
50,00	4,03
100,00	4,25
250,00	1,90
500,00	3,31
750,00	3,12



Şekil 108. Ekstraksiyon çalışmaları öncesinde hazırlanmış olan 5,00, 10,00, 50,00 100,00 250,00, 500,00 ve 750,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri kullanılarak, Eurachem tarafından

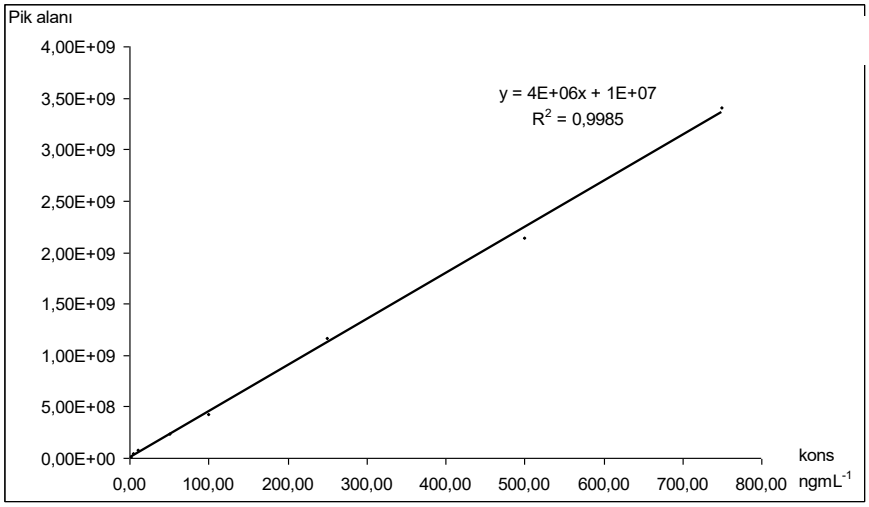
tavsiye edilen yöntemle LOQ değerinin bulunması için çizilen amitriptilin konsantrasyonlarına karşı %RSD grafiği (LOQ=5,00 $ngmL^{-1}$)

• **Lineerite ve Ölçüm Aralığı (Linearity / Range):** Optimize edilmiş olan LC-MS/MS koşullarında 1,00, 5,00, 10,00, 50,00, 100,00, 250,00, 500,00 ve 750,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri ekstraksiyon çalışmaları öncesinde analizlenerek, bir kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur (Tablo XI, Şekil 109). Bu grafiğe ilişkin ölçüm aralığı, LOQ değeri olan 5,00 $ngmL^{-1}$ den 750,00 $ngmL^{-1}$ ye kadar uzanmaktadır.

Yine aynı koşullarda 750,00, 1000,00, 1500,00, 2000,00, 3000,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri kullanılarak, bir kalibrasyon grafiği daha oluşturularak, ikinci bir doğrusal aralık daha belirlenmiştir (750,00-3000,00 $ngmL^{-1}$) (Tablo XII, Şekil 110).

Tablo XI. Amitriptilin standart çözeltileri kullanılarak, ekstraksiyon çalışmaları öncesinde çizilen kalibrasyon grafiğine ilişkin veriler

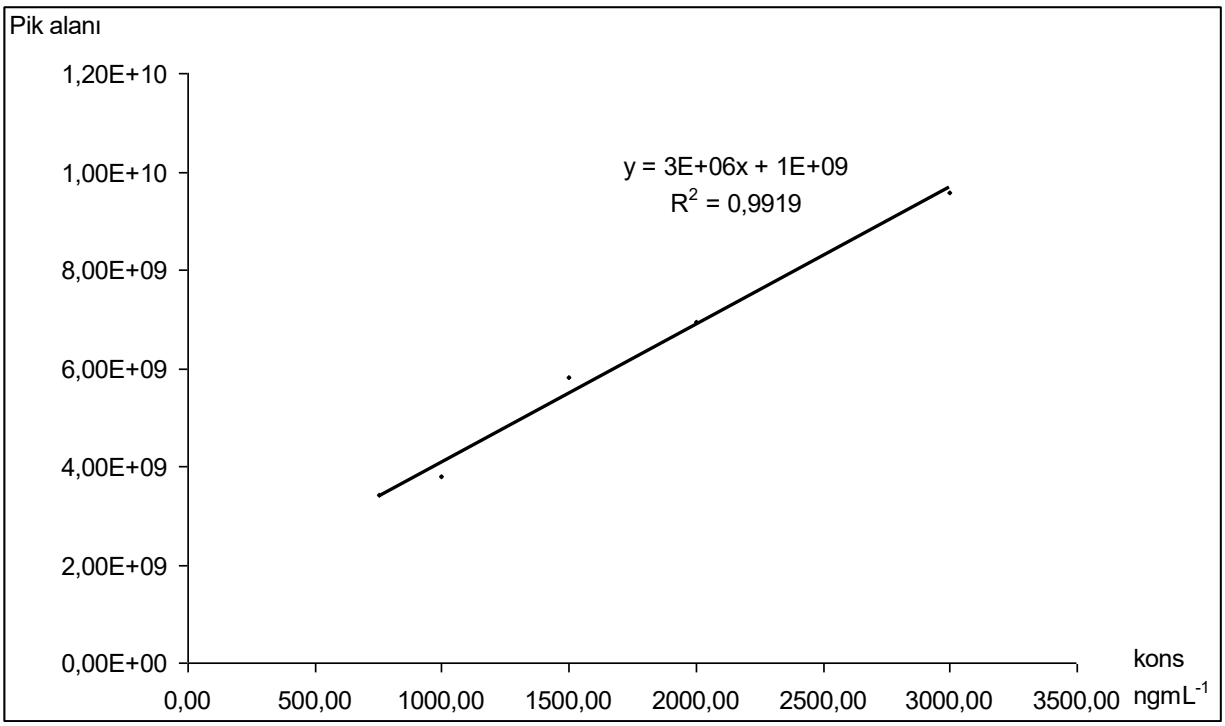
Katılan amitriptilin standardının konsantrasyonu($ngmL^{-1}$)	**Pik alanların ortalaması**
1,00	$9{,}66.10^{6}$
5,00	$4{,}47.10^{7}$
10,00	$7{,}44.10^{7}$
50,00	$2{,}39.10^{8}$
100,00	$4{,}22.10^{8}$
250,00	$1{,}17.10^{9}$
500,00	$2{,}15.10^{9}$
750,00	$3{,}41.10^{9}$



Şekil 109: 5,00, 10,00, 50,00, 100,00, 250,00, 500,00 ve 750,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri kullanılarak, ekstraksiyon çalışmaları öncesinde çizilen kalibrasyon grafiği

Tablo XII. 750,00, 1000,00, 1500,00, 2000,00 ve 3000,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri kullanılarak, ekstraksiyon çalışmaları öncesinde çizilen kalibrasyon grafiğine ilişkin veriler

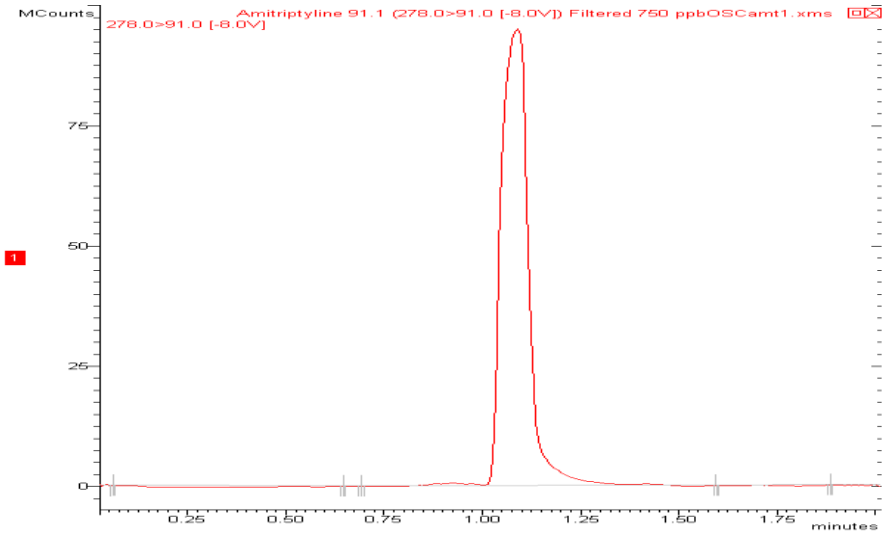
Katılan amitriptilin standardının konsantrasyonu	**Pik alanların ortalaması**
750,00	$3{,}41.10^9$
1000,00	$3{,}80.10^9$
1500,00	$5{,}82.10^9$
2000,00	$6{,}92.10^9$
3000,00	$9{,}58.10^9$



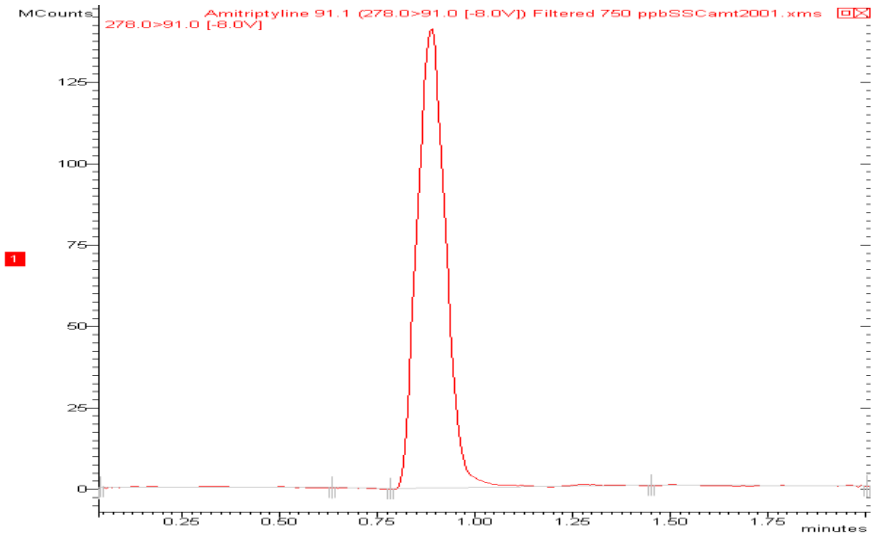
Şekil 110: 750,00, 1000,00, 1500,00, 2000,00, 3000,00 $ngmL^{-1}$ amitriptillin standart çözeltiler kullanılarak, ekstraksiyon çalışmaları öncesinde çizilen kalibrasyon grafiği

4.2.1.1.4. *Ciğerde amitriptillin tayini için yöntem validasyonu*

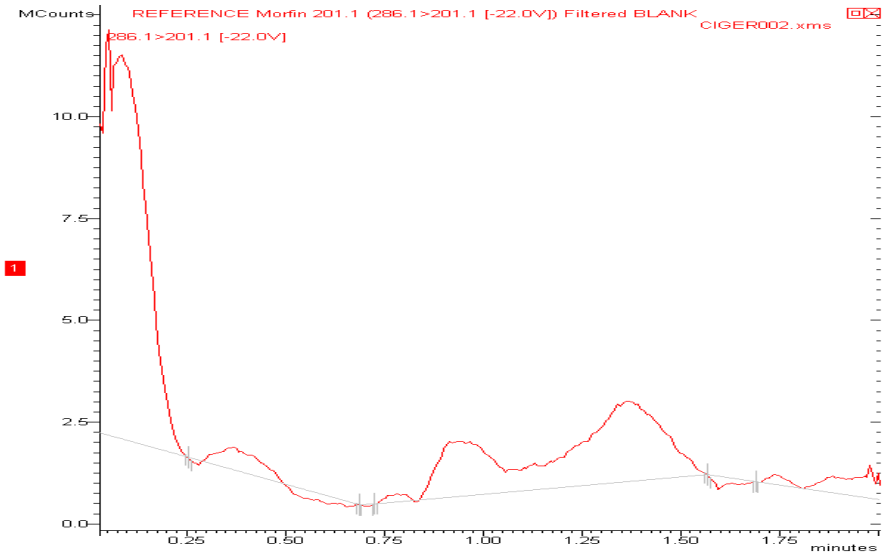
• **Seçicilik (Selectivity/Specificity):** 750,00 $ngmL^{-1}$ amGitriptillin katılmış ciğerden ve 2,50 mg/250 g amitriptillin içeren ve larvaların üzerinden beslenmiş olduğu ciğerden hazırlanan örneklerin ve bunların körlerinin LC-MS/MS kromatogramları, amitriptillinin kütle spektrumundaki 278,0 kütle numaralı iyonun parçalanması ile elde edilen 91,0 kütleli iyondan elde edilmiştir. Kromatogramlar Şekil 111 ve 112'de gösterilmiştir.



(a)

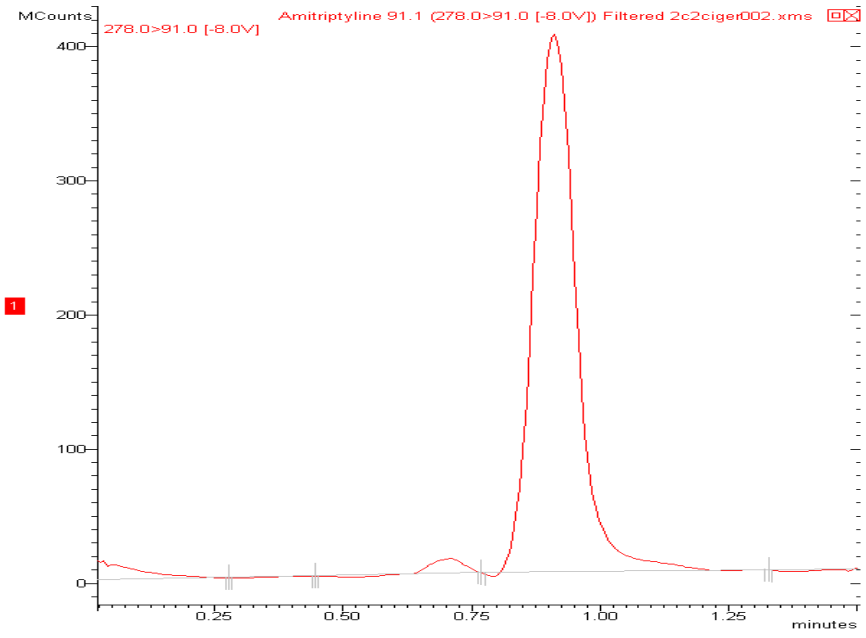


(b)

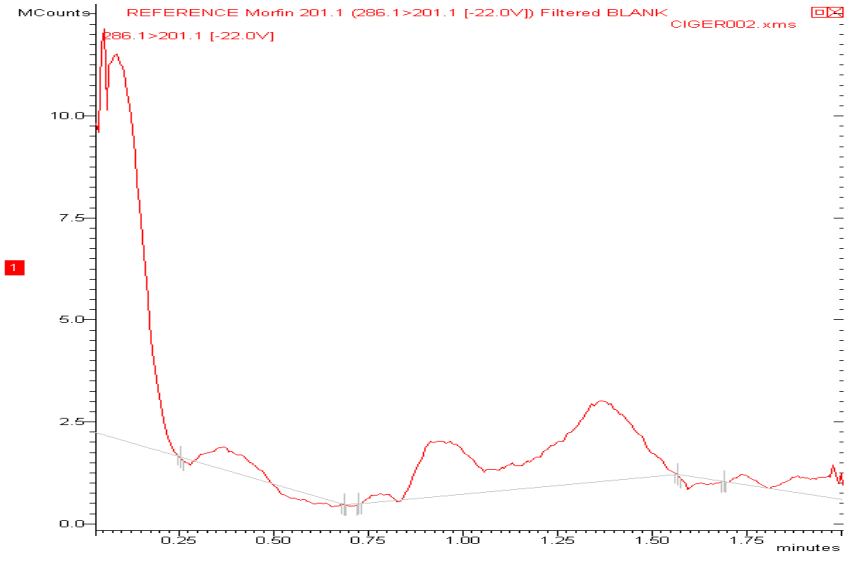


(c)

Şekil 111: Ekstraksiyon öncesi (a) ve ekstraksiyon sonrası katım yapılmış olan, 750,00 $ngmL^{-1}$ konsantrasyondaki amitriptillin ciğer ekstraktları (b) ve bunların blank kromatogramı (c).



(a)



(b)

Şekil 112: C2 ngmL^{-1} konsantrasyondaki amitriptillin katılmış olan ve larvaların üzerinden yediği ciğerden alınan örneğin ekstraktının (a) ve blank ekstraktın kromatogramı (b).

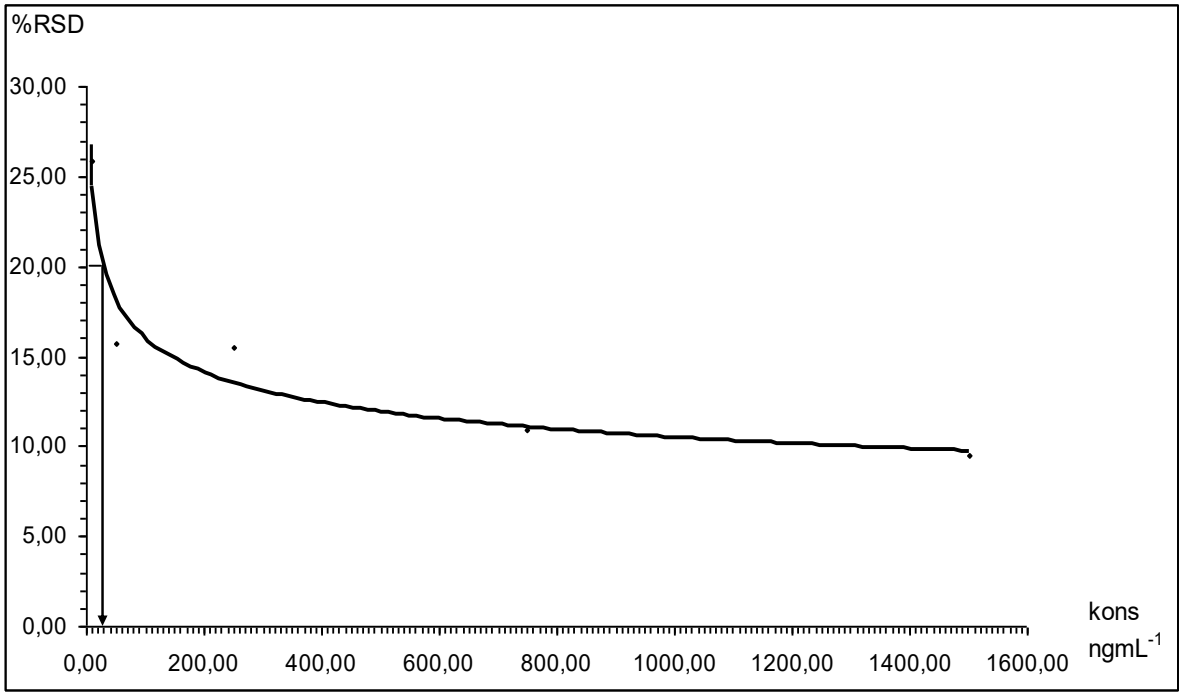
• **Kesinlik (Precision), Tayin Limiti (Limit of detection, LOD), Ölçüm Limiti (Limit of quantitation, LOQ):** Ekstraksiyon öncesi ve ekstraksiyon sonrası çeşitli konsantrasyonlarda amitriptillin katılan ciğer örnekleri, her bir konsantrasyon için en az 6 analiz tekrarı yapılmak

kaydıyla analiz edilmiştir. Bu analizlerin ortalama, standart sapma ve % bağıl standart sapmaları alınmış (Tablo X) ve yöntemin tekrarlanabilirliği EÖAK (Ekstraksiyon öncesi amitriptilin katılmış) örneklerde % $RSD_{ortalama}$ cinsinden % 11,55, ESAK (Ekstraksiyon sonrası amitriptilin katılmış) örneklerde % $RSD_{ortalama}$ cinsinden % 8,61 olarak bulunmuştur (Ortalama tekrarlanabilirlik hesabında kullanılmış olan en küçük konsantrasyon değeri % 20 nin altında %RSD ye sahip olan konsantrasyon düzeyidir.). Yine aynı tablo değerleri kullanılarak Eurachem tarafından tavsiye edilen yöntemle amitriptillin konsantrasyonlarına karşı %RSD grafiği çizilerek, maksimum % RSD değeri olarak % 20 seçilmiş ve EÖAK örnekler için LOQ, bu değere denk gelen konsantrasyon olan 25,00 $ngmL^{-1}$ olarak, ESAK örnekler için ise grafikte bu değerinaltındaki ilk deneysel veri olan10,00 $ngmL^{-1}$ olarak bulunmuştur (Tablo XIII, XIV, Şekil 113, 114).

Tablo XIII. Ciğer matriksine ekstraksiyon öncesi 10,00, 50,00, 250,00, 750,00, 1500,00, 3000,00 ve 5000,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri katılması (EÖAK) ile bulunan pik alanları yardımıyla Eurachem tarafından tavsiye edilen yönteme göre LOQ değerinin bulunması için katılan amitriptilin konsantrasyonlarına karşı bulunmuş olan % RSD değerleri (LOQ=25,00 $ngmL^{-1}$)

(% 20,00 RSD değerine denk gelen konsantrasyon, LOQ değeri olarak alınmıştır)

Katılan amitriptilin standardının konsantrasyonu	**%RSD**
10,00	25,85
50,00	15,69
250,00	15,51
750,00	10,96
1500,00	9,44
3000,00	10,13
5000,00	7,60

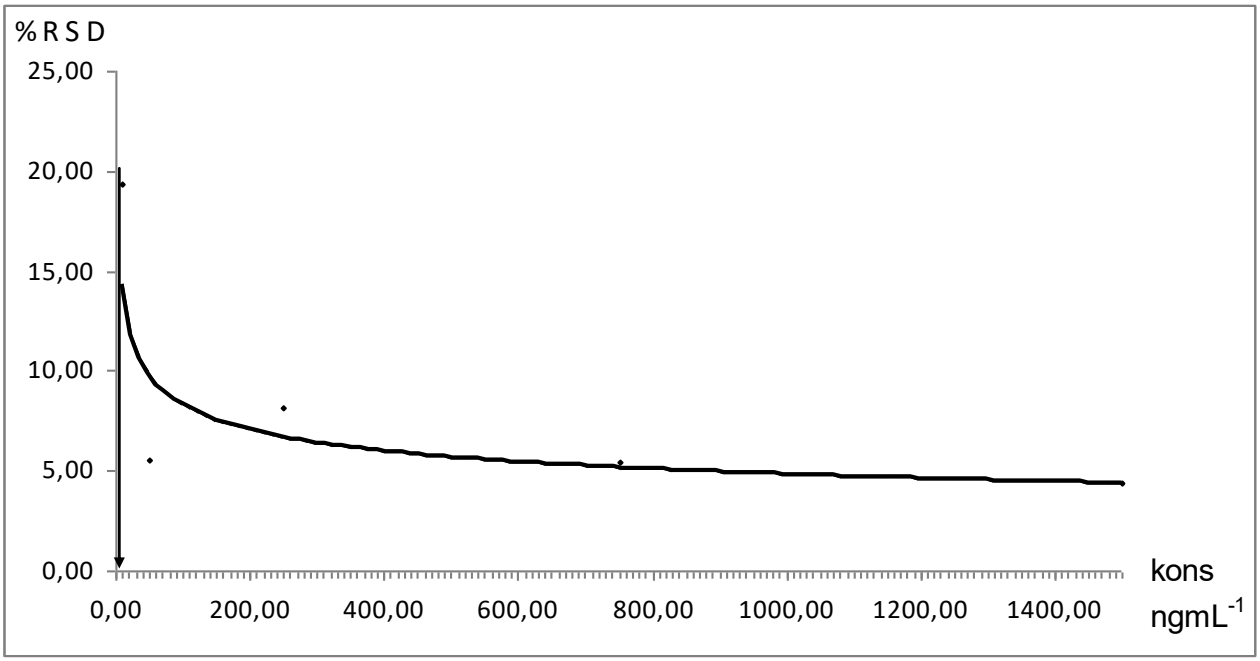


Şekil 113. Ciğer matriksine ekstraksiyon öncesi 10,00, 50,00, 250,00, 750,00, 1500,00, 3000,00 ve 5000,00 ng mL^{-1} amitriptilin standart çözeltileri katılması (EÖAK) ile bulunan pik alanları yardımıyla Eurochem tarafından tavsiye edilen yönteme göre LOQ değerinin bulunması için katılan amitriptilin konsantrasyonlarına karşı çizilen % RSD grafiği (LOQ=25,00 $ngmL^{-1}$)

(% 20,00 RSD nin altındaki ilk deneysel veri olan 10,00 $ngmL^{-1}$, LOQ değeri olarak alınmıştır)

Tablo XIV. Ciğer matriksine ekstraksiyon sonrası 10,00, 50,00, 250,00, 750,00 ve 1500,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri katılması (ESAK) ile bulunan pik alanları yardımıyla Eurochem tarafından tavsiye edilen yönteme göre LOQ değerinin bulunması için katılan amitriptilin konsantrasyonlarına karşı bulunmuş olan %RSD değerleri (LOQ=10,00 $ngmL^{-1}$) (%20,00 RSD nin altındaki ilk deneysel veri olan 10,00 $ngmL^{-1}$, LOQ değeri olarak alınmıştır.)

Katılan amitriptilin standardının konsantrasyonu	**%RSD**
10,00	19,38
50,00	5,56
250,00	8,20
750,00	5,46
1500,00	4,44



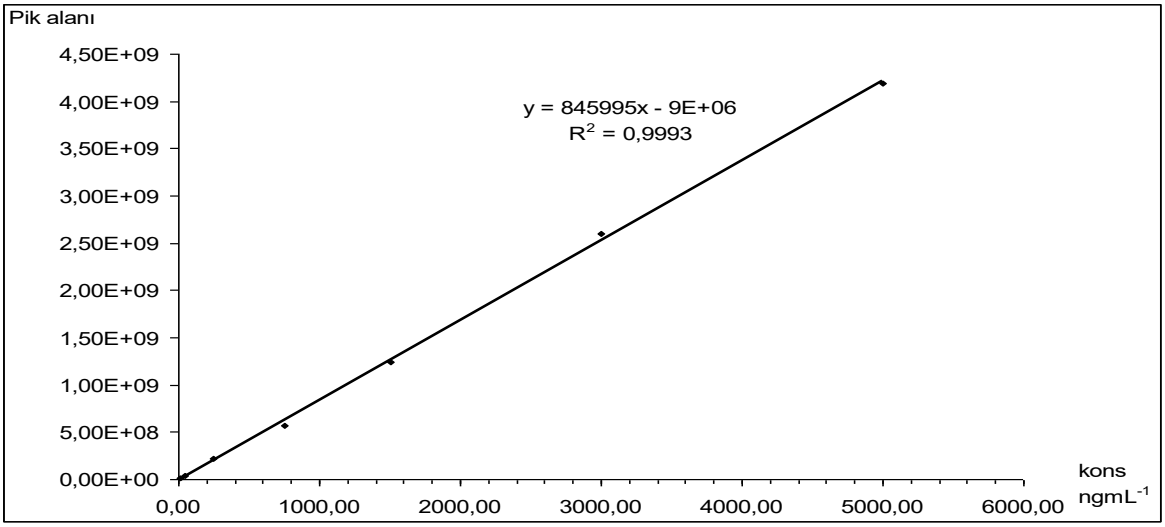
Şekil 114: Ciğer matriksine ekstraksiyon sonrası 10,00, 50,00, 250,00, 750,00 ve 1500,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri katılması (ESAK) ile bulunan pik alanları yardımıyla

Eurachem tarafından tavsiye edilen yönteme göre LOQ değerinin bulunması için katılan amitriptilin konsantrasyonlarına karşı çizilmiş olan % RSD grafiği (LOQ=10,00 $ngmL^{-1}$)
(% 20,00 RSD nin altındaki ilk deneysel veri olan 10,00 $ngmL^{-1}$, LOQ değeri olarak alınmıştır.)

• **Lineerite (Ölçüm Aralığı):** Ekstraksiyon öncesi ve ekstraksiyon sonrası çeşitli konsantrasyonlarda amitriptillin katılan ciğer örnekleri, her bir konsantrasyon için en az 6 analiz tekrarı yapılmak kaydıyla analiz edilmiş ve bir kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur (Tablo XV, Şekil 115). EÖAK (Ekstraksiyon öncesi amitriptilin katılmış) örneklerde konsantrasyona karşı sinyal ilişkisinin doğrusal olduğu aralık 25,00 (LOQ) -5000 $ngml^{-1}$ iken, ESAK (Ekstraksiyon sonrası amitriptilin katılmış) örneklerde 10,00 (LOQ) -5000 $ngml^{-1}$ olarak bulunmuştur (Tablo XVI, Şekil 116).

Tablo XV. Ciğer matriksine ekstraksiyon öncesi 10,00, 50,00, 250,00, 750,00, 1500,00, 3000,00 ve 5000,00 $ngmL^{-1}$ konsantrasyonlarda amitriptilin katılması (EÖAK) ile amitriptilin tayin yöntemi için oluşturulmuş olan kalibrasyon grafiğine ilişkin değerler (NLOQ: 25,00 $ngml^{-1}$)

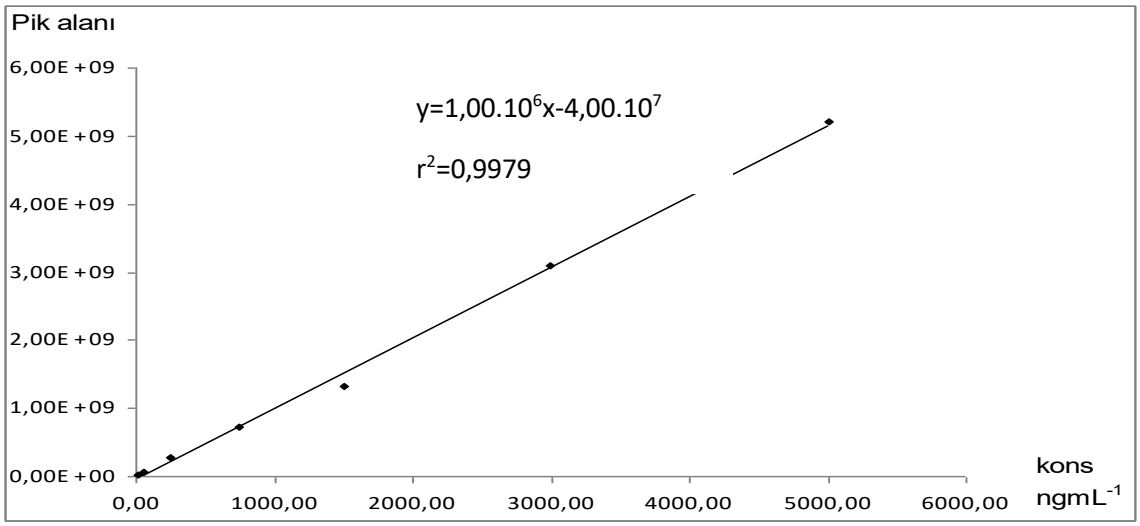
Katılan amitriptilin Standardının Konsantrasyonu	**Pik alanların ortalaması**
10,00	$1{,}36.10^{7}$
50,00	$4{,}04.10^{7}$
250,00	$2{,}19.10^{8}$
750,00	$5{,}66.10^{8}$
1500,00	$1{,}24.10^{9}$
3000,00	$2{,}60.10^{9}$
5000,00	$4{,}19.10^{9}$



Şekil 115: Ciğer matriksine ekstraksiyon öncesi 10,00, 50,00, 250,00, 750,00, 1500,00, 3000,00 ve 5000,00 ng mL^{-1} konsantrasyonlarda amitriptilin katılması (EÖAK) ile amitriptilin tayin yöntemi için oluşturulmuş olan kalibrasyon grafiği (LOQ: 25,00 ng mL^{-1})

Tablo XVI. Ciğer matriksine ekstraksiyon sonrası 10,00, 50,00, 250,00, 750,00, 1500,00, 3000,00, 5000,0 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltilerinin katılması (ESAK) ile amitriptilin tayin yöntemi için oluşturulmuş olan kalibrasyon grafiğine ilişkin veriler (LOQ: 10,00 $ngmL^{-1}$)

Katılan amitriptilin standardının konsantrasyonu	**Pik alanların ortalaması**
10,00	$1,69.10^7$
50,00	$5,51.10^7$
250,00	$2,73.10^8$
750,00	$7,18.10^8$
1500,00	$1,33.10^9$
3000,00	$3,10.10^9$
5000,00	$5,21.10^9$



Şekil 116: Ciğer matriksine ekstraksiyon sonrası 10,00, 50,00, 250,00, 750,00, 1500,00, 3000,00 ve 5000,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltilerinin katılması (ESAK) ile amitriptilin tayin yöntemi için oluşturulmuş olan kalibrasyon grafiği (LOQ: 10,00 $ngml^{-1}$)

• **Doğruluk (Accuracy): Geri kazanım (ESAK, EÖAK ciğer örnekleri ve üzerinden larva beslenmiş ciğer örnekleri):** Öncelikle 10,0, 50,0, 250,0, 750,0, 1500,0, 3000,0, 5000,0 $ngmL^{-1}$ konsantrasyonlardaki EÖAK ciğer örneklerinin analizi sonucu elde edilen değerler aynı konsantrasyondaki ESAK ciğer örneklerinden elde edilen değerlere bölünüp 100 ile çarpılmış ve her bir konsantrasyon düzeyindeki geri kazanım hesaplanmıştır. Geri kazanımların ortalaması 82,21(±6,66)olarak bulunmuştur. Her bir konsantrasyon için geri kazanım değerleri ve yönteme ilişkin % ortalama geri kazanım Tablo XVII' de görülmektedir.

Tablo XVII. Ciğerden ekstraksiyonu gerçekleştirilen her bir amitriptillin konsantrasyonuna ilişkin geri kazanım değerleri ve bu değerlere göre hesaplanmış olan ortalama geri kazanım

konsantrasyon ($ngmL^{-1}$)	% geri kazanım	ortalama % geri kazanım
10,0	82,29	
50,0	71,52	
250,0	80,22	
750,0	78,90	82,21(±6,66)
1500,0	93,34	
3000,0	83,67	
5000,0	85,54	

Aynı şekilde, olay yeri simulasyonu amacıyla 4 farklı konsantrasyonda (C1, C2, C3, C4) amitriptillin katılmış olan 4 ciğer örneği 117 saat boyunca çürümeye bırakılmış ve üzerinden larvaların beslendiği bu ciğer örnekleri çürümemiş ciğer referans alınarak analizlenmiştir. 250,00 g ciğere katılan miktar ve bu 250,00 g' lık ciğerde ESAK ve EÖAK ciğer kalibrasyon grafikleri kullanılarak bulunan analiz sonuçları Tablo XVIII' de belirtilmektedir. Her bir konsantrasyondaki analiz sonuçlarına ilişkin ölçüm belirsizlikleri % bağıl belirsizlik olarak verilmiştir (Tablo XIX). EÖAK yöntemine göre her bir konsantrasyonda gerçekleştirilmiş analiz sonuçlarından, yönteme ilişkin % ortalama bağıl belirsizlik %3,28 olarak bulunmuştur.

Tablo XVIII.0,500 g ciğer matriksinde LC-MS/MS kullanılarak geliştirilmiş olan amitriptillin tayin yöntemi ile olay yeri simülasyonundan elde edilen 4 farklı konsantrasyondaki 117 saatlik ciğerde bulunan amitriptilin miktarları

Konsantrasyon düzeyi	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**
Çürümeden önce 250,0g ciğere katılan miktar (ng)	125000,00	750000,00	1750000,00	2500000,00
Çürümeden önce 0,5 g ciğerdeki miktar (ng)	250	1500	3500	5000
117. saatte toplanan ciğerden bir ekstraksiyon için kullanılan ciğer miktarı (g)[a]	0,500	0,500	0,500	0,500
yenmiş, 117. saatte toplanan 0,500 g ciğerideki amitiptillinin ortalama pik alanı (%u_{rel}[b]) [a]	$3,96x10^8$ (%3,53)	$2,24x10^9$ (%4,38)	$4,69x10^9$ (%0,30)	$7,66x10^9$(%0,85)
ESAK[c] ciğer grafik denkleminden bulunan yenmiş 0,5 g ciğerdeki amitriptillin konsantrasyonu (ng) (%u_{rel}[b])[a]	521,69 (%3,66)	2764,72 (%4,48)	5744,90 (%3,12)	9357,60 (%2,04)
ESAK[c] ciğer grafik denkleminden bulunan konsantrasyondan geri hesapla bulunan 250,0 g yenmiş ciğerdeki amitriptillin miktarı (ng) (%u_{rel}[b])[a]	260845,00 (%3,66)	1382360,00 (%4,48)	287245,10 (%3,12)	4678800,00 (%2,04)
EÖAK[d] ciğer grafik denkleminden bulunan yenmiş 0,5 g ciğerideki amitriptillin miktarı (ng) (%u_{rel}[b])[a]	478,73 (%3,55)	2658,41 (%4,40)	5554,41 (%3,14)	9065,07 (%2,04)
EÖAK[d] ciğer grafik denkleminden bulunan konsantrasyondan geri hesapla bulunan 250,0 g ciğerdeki amitriptillin miktarı (ng) [a]	239365 (%3,55)	1329204,05 (%4,40)	277720,50 (%3,14)	4532535,00 (%2,04)

[a]117. saatte (çürüme, büzüşme ve larva üremesinden sonra

[b] yüzde bağıl belirsizlik

[c]ESAK: Ekstraksiyon sonrası amitriptilin katılmış

[d]EÖAK: Ekstraksiyon öncesi amitriptilin katılmış

Tablo XIX. Ciğer matriksine ekstraksiyon öncesi ve sonrasında amitriptilin katılarak hazırlanan grafiklerden faydalanılarak bilinmeyen örneklerin analiz sonuçlarına ilişkin hesaplanan belirsizlikler

KULLANILAN GRAFİK	HESAPLANMIŞ OLAN BELİRSİZLİK TÜRLERİ	C1	C2	C3	C4
	Ciğere katılan konsantrasyon ng/0,5g[a]	250	1500	3500	5000
ESAK[c]	Bulunan konsantrasyon ng/0,5 g[b]	521,69	2764,72	5744,90	9357,60
	u_{rec}	0,77	0,77	0,77	0,77
	$u_{tekrarlanabilirlik}$ (alan üzerinden)	13996527,93	69379491,91	120779440,53	58870642,40
	u_{reg}	0,87	0,16	2,47	4,42
	% u_{rel} (%toplam bağıl belirsizlik)	3,66	4,48	3,12	1,30
EÖAK[d]	Bulunan konsantrasyon ng/0,5 g[b]	478,73	2658,41	5554,41	9065,07
	$u_{tekrarlanabilirlik}$ (alan üzerinden)	13996527,93	98117418,42	139464085,00	65083944,00
	u_{reg}	5,50	6,91	15,21	27,45
	% u_{rel} (%toplam bağıl belirsizlik)	3,55	4,40	3,14	2,01

[a]0. saatte (taze ciğer)

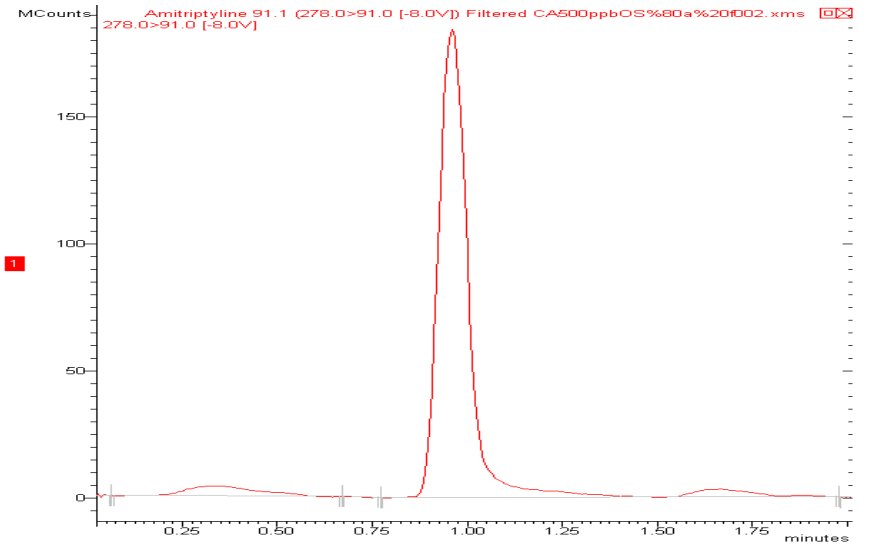
[a]117. saatte (çürüme, büzüşme ve larva üremesinden sonra

[c]ESAK: Ekstraksiyon sonrası amitriptilin katılmış

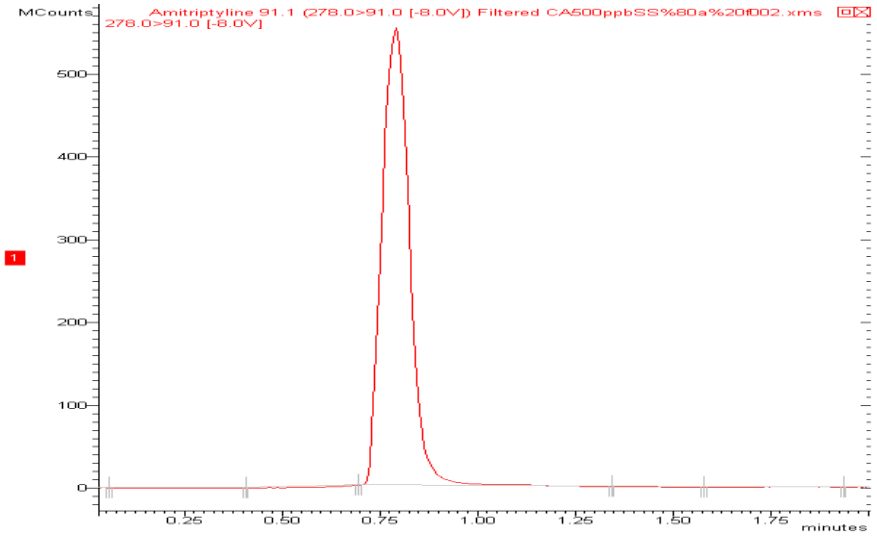
[d]EÖAK: Ekstraksiyon öncesi amitriptilin katılmış

4.2.1.1.5*Larvada amitriptillin tayini için yöntem validasyonu*

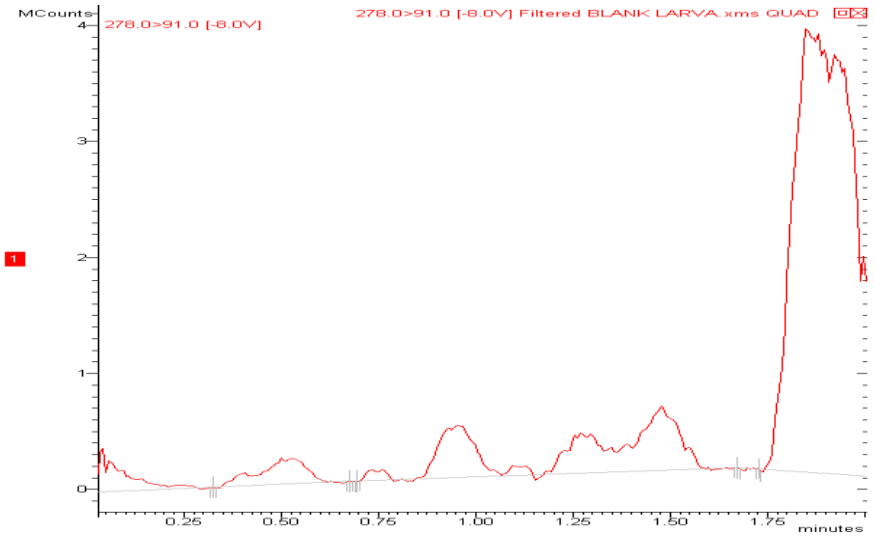
• **Seçicilik (Selectivity / Specificity):** 750,00 ngmL^{-1} amitriptilin katılmış amitriptillin katılmamış ciğerden beslemiş boş larva örneklerinden ve 2,50 mg/250 g amitriptillin içeren ciğerden beslenmiş olan larvalardan hazırlanan örneklerin ve bunların körlerinin LC-MS/MS kromatogramları, amitriptillinin kütle spektrumundaki 278,0 kütle numaralı iyonun parçalanması ile elde edilen 91,0 kütleli iyondan elde edilmiştir. Kromatogramlar Şekil 117 ve 118 ‘de gösterilmiştir.



(a)

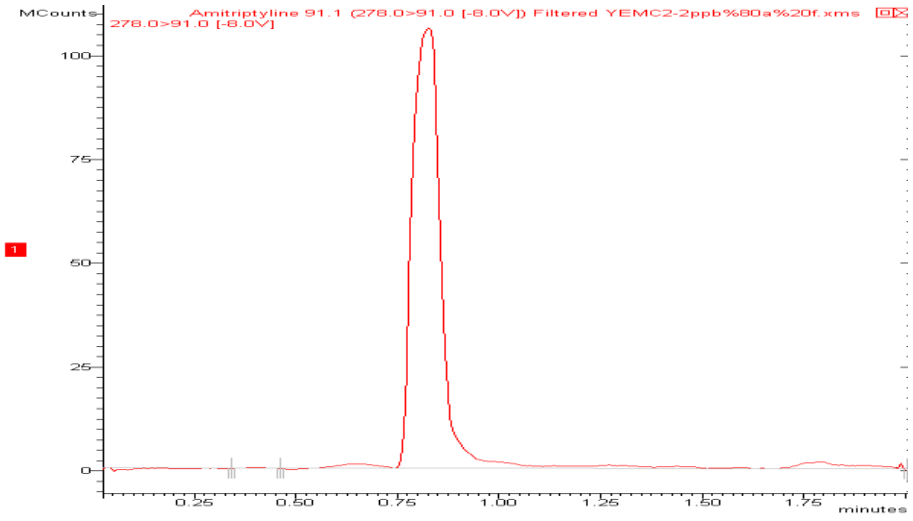


(b)

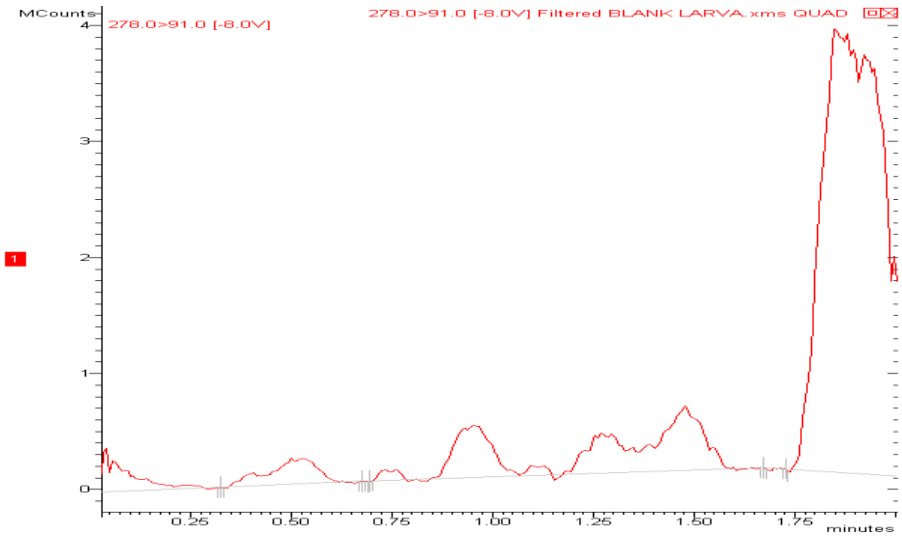


(c)

Şekil117: Ekstraksiyon öncesi (a) ve ekstraksiyon sonrası katım yapılmış olan, 500,00 $ngmL^{-1}$ konsantrasyondaki amitriptillin larva ekstraktları (b) ve blank larva kromatogramı (c).



(a)



(b)

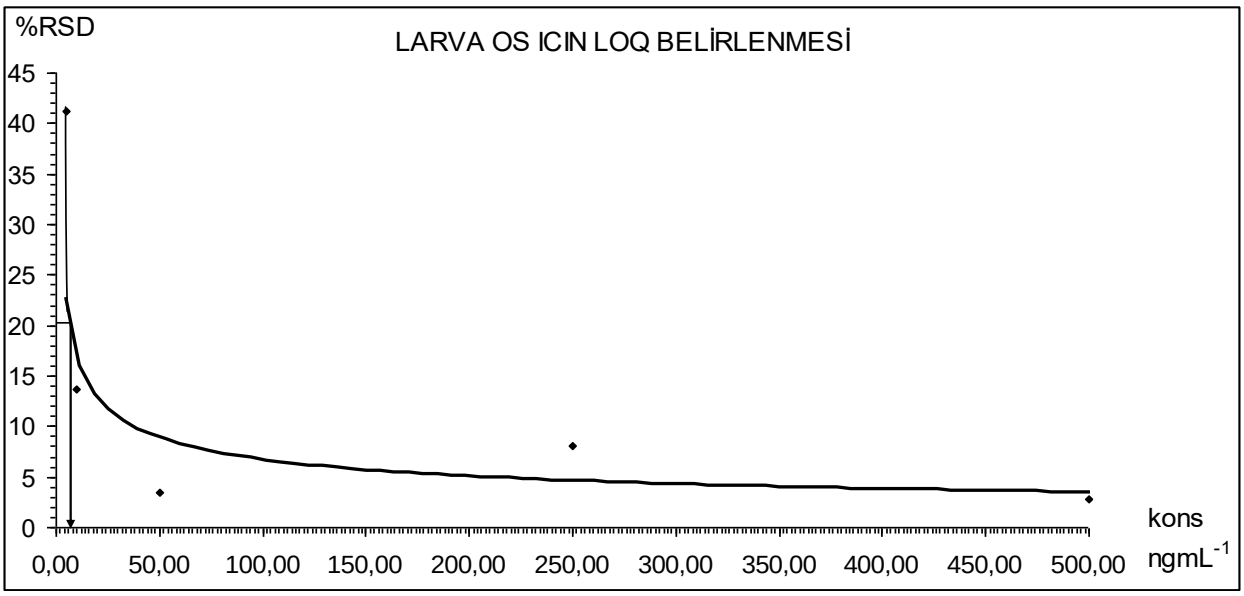
Şekil 118: 250,00 g ciğereC2=750000,00 ng amitriptillin katılmış olan ciğerden yemiş larva ekstraktının (a) ve larva blank ekstraktın kromatogramı (b).

• **Kesinlik (Precision), Tayin Limiti (Limit of detection, LOD), Ölçüm Limiti (Limit of quantitation, LOQ):** Ekstraksiyon öncesi ve ekstraksiyon sonrası çeşitli konsantrasyonlarda amitriptillin katılan boş (amitriptilinsiz ciğer ile beslenmiş) larva örnekleri, her bir konsantrasyon için en az 6 analiz tekrarı yapılmak kaydıyla analiz edilmiştir. Bu analizlerin ortalama, standart sapma ve % bağıl standart sapmaları alınmış (Tablo W) ve yöntemin tekrarlanabilirliği EÖAK (Ekstraksiyon öncesi amitriptilin katılmış) örneklerde % $RSD_{ortalama}$ cinsinden % 7,04, ESAK (Ekstraksiyon sonrası amitriptilin katılmış) örneklerde

% $RSD_{ortalama}$cinsinden % 7,52 olarak bulunmuştur (Ortalama tekrarlanabilirlik hesabında kullanılmş olan en küçük konsantrasyon değeri % 20 nin altında %RSD ye sahip olan konsantrasyon düzeyidir). Yine aynı tablo değerleri kullanılarak Eurachem tarafından tavsiye edilen yöntemle amitriptilin konsantrasyonlarına karşı % RSD grafiği çizilerek, maksimum % RSD değeri olarak % 20 seçilmiş ve EÖAK örnekler için LOQ, bu değere denk gelen konsantrasyon olan 7,00 $ngmL^{-1}$ olarak, ESAK örnekler için ise grafikte bu değerinaltındaki ilk deneysel veri olan 6,00 $ngmL^{-1}$ olarak bulunmuştur (Tablo XX, XXI, Şekil 119, 200).

Tablo XX. Larva matriksine ekstraksiyon öncesi 5,00, 10,00, 50,00, 250,00, 500,00 ve 1000,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri katılması (EÖAK) ile bulunan pik alanları yardımıyla Eurachem tarafından tavsiye edilen yönteme göre LOQ değerinin bulunması için katılan amitriptilin konsantrasyonlarına karşı bulunmuş olan % RSD değerleri (LOQ=7,00 $ngmL^{-1}$) (Verilerle çizilen grafikte %20,00 RSD ye denk gelen konsantrasyon, LOQ değeri olarak alınmıştır.)

Katılan amitriptilin standardının konsantrasyonu	**%RSD**
5,00	41,17
10,00	13,73
50,00	3,52
250,00	8,13
500,00	2,81



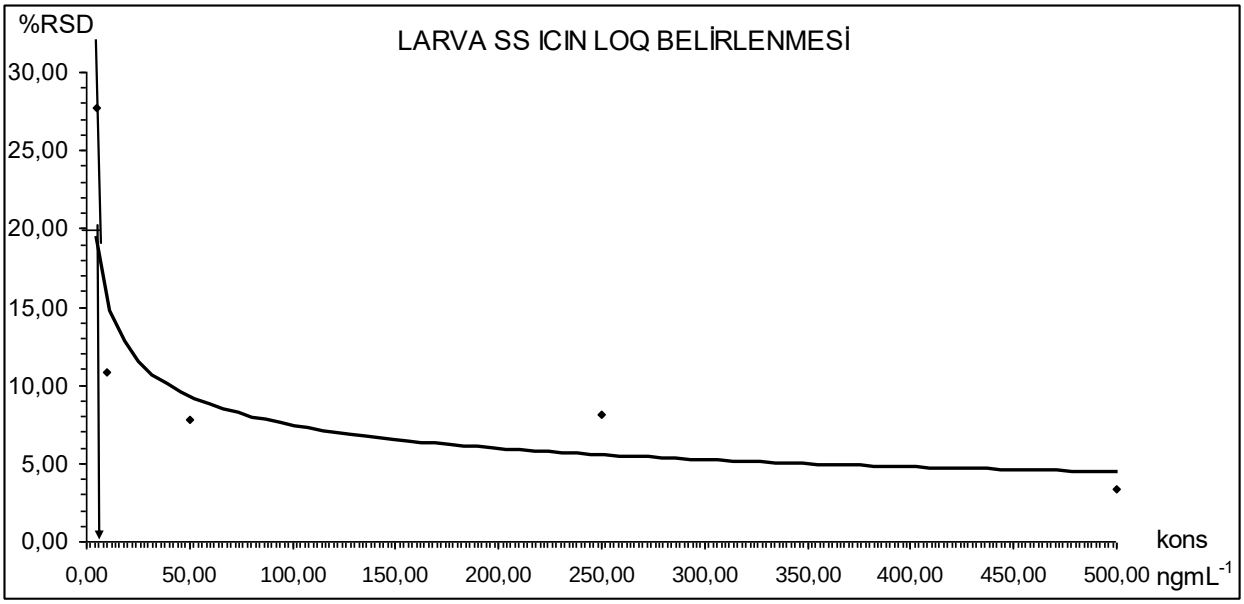
Şekil 119: Larva matriksine ekstraksiyon öncesi 5,00, 10,00, 50,00, 250,00 ve 500,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri katılması (EÖAK) ile bulunan pik alanları yardımıyla Eurachem tarafından tavsiye edilen yönteme göre LOQ değerinin bulunması için katılan amitriptilin konsantrasyonlarına karşı çizilmiş olan % RSD grafiği (LOQ=7,00 $ngmL^{-1}$)

(Grafikte % 20,00 RSD ye denk gelen konsantrasyon, LOQ değeri olarak alınmıştır.)

Tablo XXI. Larva matriksine ekstraksiyon sonrası 5,00, 10,00, 50,00, 250,00, ve 500,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri katılması (ESAK) ile bulunan pik alanları yardımıyla Eurachem tarafından tavsiye edilen yönteme göre LOQ değerinin bulunması için katılan amitriptilin konsantrasyonlarına karşı bulunmuş olan %RSD değerleri (LOQ=6,00 $ngmL^{-1}$)

(Grafik değerleri ekstrapole edilmiş, %20,00 RSD ye denk gelen konsantrasyon olan 6,00 $ngmL^{-1}$, LOQ değeri olarak alınmıştır.)

Katılan amitriptilin standardının konsantrasyonu	**% RSD**
5,00	27,69
10,00	10,84
50,00	7,77
250,00	8,13
500,00	3,34

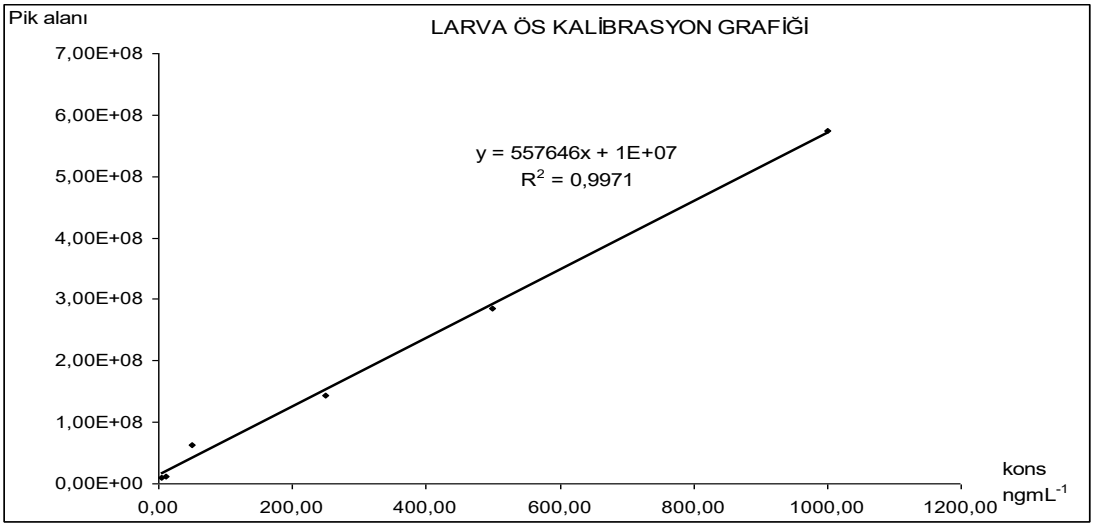


Şekil 200: Larva matriksine ekstraksiyon sonrası 5,00, 10,00, 50,00, 250,00 ve 500,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin standart çözeltileri katılması (ESAK) ile bulunan pik alanları yardımıyla Eurachem tarafından tavsiye edilen yönteme göre LOQ değerinin bulunması için katılan amitriptilin konsantrasyonlarına karşı çizilmiş olan %RSD grafiği (LOQ=6,00 $ngmL^{-1}$) (Grafikte %20,00 RSD ye denk gelen konsantrasyon, LOQ değeri olarak alınmıştır.)

• **Lineerite (Ölçüm Aralığı):** Ekstraksiyon öncesi ve ekstraksiyon sonrası çeşitli konsantrasyonlarda amitriptillin katılan larva örnekleri, her bir konsantrasyon için en az 6 analiz tekrarı yapılmak kaydıyla analiz edilmiş ve bir kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur (Tablo XXII, Şekil 201). EÖAK (Ekstraksiyon öncesi amitriptilin katılmış) larva örneklerinde konsantrasyona karşı sinyal ilişkisinin doğrusal olduğu aralık 7,00 (LOQ)-1000,00 $ngmL^{-1}$ iken, ESAK (Ekstraksiyon sonrası amitriptilin katılmış) örneklerde 6,00-1000,0 $ngmL^{-1}$ olarak bulunmuştur (Tablo XXIII, Şekil 202).

Tablo XXII. Larva matriksine ekstraksiyon öncesi 5,00, 10,00, 50,00, 250,00, 500,00 ve 1000,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin katılması (EÖAK) ile amitriptillin tayin yöntemi için oluşturulmuş olan kalibrasyon grafiğine ilişkin veriler (LOQ:7,00 $ngml^{-1}$)

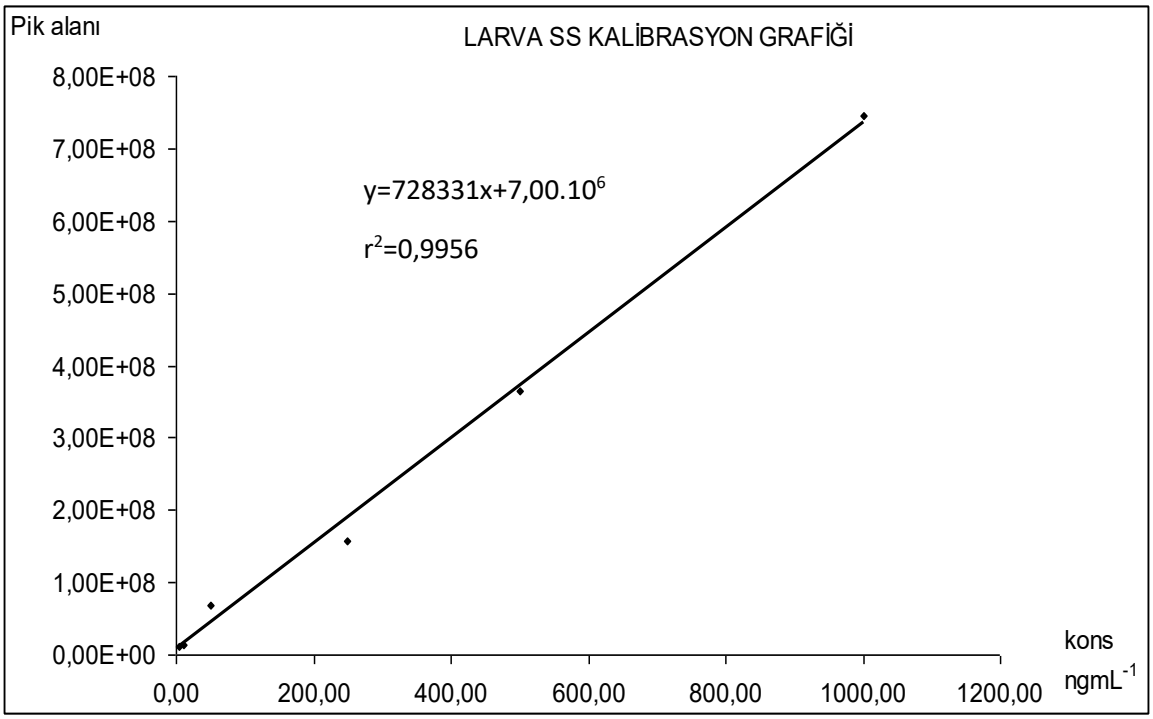
Katılan amitriptilin standardının konsantrasyonu	**Pik alanların ortalaması**
5,00	$1{,}01.10^7$
10,00	$1{,}11.10^7$
50,00	$6{,}24.10^7$
250,00	$1{,}44.10^8$
500,00	$2{,}85.10^8$
1000,00	$5{,}74.10^8$



Şekil 201: Larva matriksine ekstraksiyon öncesi 5,00, 10,00, 50,00, 250,00, 500,00 ve 1000,00 $ngmL^{-1}$ amitriptillin katılması (ESAK) ile amitriptilin tayin yöntemi için oluşturulmuş olan kalibrasyon grafiği (LOQ: 7,00 $ngml^{-1}$)

Tablo XXIII. Larva matriksine ekstraksiyon sonrası 5,00, 10,00, 50,00, 250,00, 500,00 ve 1000,00 ng mL^{-1} amitriptilin katılması (ESAK) ile amitriptillin tayin yöntemi için oluşturulmuş olan kalibrasyon grafiğine ilişkin değerler (LOQ: 6,00 $ngml^{-1}$)

Katılan amitriptilin standardının konsantrasyonu	**Pik alanların ortalaması**
5,00	$1,25.10^7$
10,00	$1,39.10^7$
50,00	$6,92.10^7$
250,00	$1,57.10^8$
500,00	$3,65.10^8$
1000,00	$7,45.10^8$



Şekil 202: Larva matriksine ekstraksiyon sonrası 5,00, 10,00, 50,00, 250,00, 500,00 ve 1000,00 $ngmL^{-1}$ amitriptilin katılması (ESAK) ile amitriptilin tayin yöntemi için oluşturulmuş olan kalibrasyon grafiği (LOQ: 6,00 $ngml^{-1}$)

• **Doğruluk (Accuracy): Geri kazanım (ESAK, EÖAK larva örnekleri ve üzerinden ciğer üzerinden beslenmiş larva örnekleri) :** Öncelikle 5,00, 10,00, 50,00, 250,00, 500,00 ve 1000,00 $ngmL^{-1}$ konsantrasyonlardaki EÖAK larva örneklerinin analizi sonucu elde edilen değerler aynı konsantrasyonlardaki ESAK larva örneklerinden elde edilen değerlere bölünüp 100 ile çarpılmış ve her bir konsantrasyon düzeyindeki geri kazanım hesaplanmıştır. Geri kazanımların ortalaması 82,89 (±6,27) olarak bulunmuştur. Her bir konsantrasyon için geri kazanım değerleri ve yönteme ilişkin % ortalama geri kazanım Tablo XXIV' de görülmektedir.

Tablo XXIV: Larvadan ekstraksiyonu gerçekleştirilen her bir amitriptillin konsantrasyonuna ilişkin geri kazanım değerleri ve bu değerlere göre hesaplanmış olan ortalama geri kazanım

Konsantrasyon ($ngmL^{-1}$)	% geri kazanım	Ortalama % geri kazanım
5	80,68053	
10	79,86592	
50	90,2	
250	91,42	82,89 (±6,27)
500	78,09	
1000	77,10	

Aynı şekilde, olay yeri simulasyonu amacıyla 4 farklı konsantrasyon da (C1, C2, C3, C4) amitriptillin katılmış olan 4 ciğer örneği 117 saat boyunca çürümeye bırakılmış ve üzerinden larvaların beslendiği bu ciğer örnekleri çürümemiş ciğer referans alınarak analizlenmiştir. 250,00 g ciğere katılan miktar ve bu 250,00 g' lık ciğerde ESAK ve EÖAK larva kalibrasyon grafikleri kullanılarak bulunan analiz sonuçları Tablo XXV' de belirtilmektedir. Her bir konsantrasyondaki analiz sonuçlarına ilişkin ölçüm belirsizlikleri % bağıl belirsizlik olarak

verilmiştir (Tablo XXVI). EÖAK yöntemine göre her bir konsantrasyonda gerçekleştirilmiş analiz sonuçlarından, yönteme ilişkin % ortalama bağıl belirsizlik % 3,28 olarak bulunmuştur.

Tablo XXV.0,500 g larva matriksinde LC-MS/MS kullanılarak geliştirilmiş olan amitriptilin tayin yöntemi ile olay yeri simülasyonundan elde edilen 4 farklı konsantrasyondaki 117 saatlik ciğer üzerinden elde edilen larvalarda bulunan amitriptilin miktarları

Konsantrasyon düzeyleri (ng)	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**
Çürümeden önce 250,0g ciğere katılan miktar (ng)	125000,00	750000,00	1750000,00	2500000,00
Çürümeden önce 0,5 g ciğerdeki miktar (ng)	250	1500	3500	5000
117. saatte ciğerden alınan larvalardan bir ekstraksiyon için kullanılan miktar (g)[a]	0,500	0,500	0,500	0,500
Ciğerden yemiş 0,500 g larvadaki amitriptilinin ortalama pik alanı (%u_{rel}[b])[a]	$9{,}82.10^{7}$ (%5,06)	$5{,}73.10^{8}$ (%5,30)	$1{,}46.10^{9}$ (%3,30)	$1{,}95.10^{9}$(%4,17)
ESAK[c] larva grafik denkleminden bulunan ciğerden yemiş 0,500 g larvadaki amitriptilin miktarı (ng) (%u_{rel}[b])[a]	153,05 (%5,14)	939,52 (%5,39)	2408,75 (%3,19)	3220,40 (%3,89)
EÖAK[d] larva grafik denkleminden bulunan ciğerden yemiş 0,500g larvadaki amitriptilin miktarı (ng) (%u_{rel}[b])[a]	158,17 (%5,06)	1009,60(%5,31)	2600,22(%3,05)	3478,91(%4,24)

[a]117. saatte (çürüme, büzüşme ve larva üremesinden sonra

[b]yüzde bağıl belirsizlik

[c]ESAK: Ekstraksiyon sonrası amitriptilin katılmış

[d]EÖAK: Ekstraksiyon öncesi amitriptilin katılmış

Tablo XXVI. Larva matriksine ekstraksiyon öncesi ve sonrasında amitriptilin katılarak hazırlanan grafiklerden faydalanılarak bilinmeyen örneklerin analiz sonuçlarına ilişkin hesaplanan belirsizlikler

KULLANILAN GRAFİK	HESAPLANMIŞ OLAN BELİRSİZLİK TÜRLERİ	C1	C2	C3	C4
	Taze ciğere katılan kons. ng/0,5 g[a]	250	1500	3500	5000
ESAK[c]	ESAK denkleminden larvada bulunan kons. ng/0,5 g[b]	153,05	939,52	2408,75	3220,00
	u_{rec}	0,78	0,78	0,78	0,78
	$u_{tekrarlanabilirlik}$ (alan üzerinden)	4964632,73	30390821,73	43826333,12	73570208,36
	u_{reg}	0,06	0,11	0,36	0,51
	% $u_{rel\ (\%toplam\ bağıl\ belirsizlik)}$	5,14	5,39	3,19	3,89
EÖAK[d]	EÖAK denkleminden larvada bulunan kons. ng/0,5 g[b]	158,17	1009,60	2600,22	3478,91
	$u_{tekrarlanabilirlik}$ (alan üzerinden)	4964632,73	30390821,73	43826333,12	70438111,81
	u_{reg}	0,27	0,59	1,92	2,67
	% $u_{rel\ (\%toplam\ bağıl\ belirsizlik)}$	5,06	5,31	3,05	4,24

[a]0. saatte (taze ciğer)

[b]117. saatte (çürüme, büzüşme ve larva üremesinden sonra

[c]ESAK: Ekstraksiyon sonrası amitriptilin katılmış

[d]EÖAK: Ekstraksiyon öncesi amitriptilin katılmış

Tablo XXVII. Yönteme ilişkin LOD ve LOQ değerlerinin hesaplanması

KALİBRASYON GRAFİĞİ TÜRÜ	LOD (ng mL^{-1})	LOQ (ng mL^{-1})
Gürültü değerleri kullanılarak[a]		
Standart çözeltiler	0,20	0,61
Amitriptilin içermeyen boş larva	0,25	0,75
Amitriptilin içermeyen boş ciğer	0,26	0,80
Eurochem'e göre		
Standart çözeltiler		3,00
EÖAK örnekler larva		7,00
ESAK örnekler larva		6,00
EÖAK örnekler ciğer		25,00
ESAK örnekler ciğer		10,00

[a]LOD= 3,3.Std /Eğim ve LOQ=10.Std/Eğim

LOQ değerinin hesaplanması için en güvenilir yöntem Eurachem yöntemidir. Gürültü değerleri kullanılarak formülden bulunan LOQ değerindeki konsantrasyona denk gelen pikin alanının % RSD değeri 20' yi geçtiği takdirde sağlıklı ve doğru bir konsantrasyon hesabından bahsedilemez. Bununla birlikte, Eurachem yöntemi LOQ değerine denk gelen konsantrasyonun maksimum %20 standart sapması olabileceği koşulunu getirdiğinden, buradan bulunan LOQ düzeyindeki analizlerde daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada, Eurachem yönteminden elde edilen değerler LOQ olarak kabul edilmiştir.

Tablo XXVIII. Ciğer analizlerinden elde edilen amitriptilin konsantrasyonlarının, ölüm anındaki ciğer konsantrasyonunun bulunmasında kullanılması için gerekli faktörlerin bulunması

CIGER MATRİKSİNDE AMITRIPTILIN TAYINI	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**Ort Faktör**
250,00 g ciğere katılan amitriptilin miktarı (ng)	125000,00	750000,00	1750000,00	2500000,00	
Katım yapılmış ciğerdeki amitriptilin konsantrasyonu (ng/g)	**500,00**	**3000,00**	**7000,00**	**10000,00**	
ESAK[c] grafiğinden 0,500 g örnekte bulunan amitriptilin (ng) (%u_{rel}[b])[a]	521,69 (%3,66)	2764,72 (%4,48)	5744,90 (%3,12)	9357,60 (%2,04)	
ESAK[c] grafiğinden bulunan ciğerdeki amitriptilin konsantrasyonu (ng/g) (%u_{rel}[b])[a]	**1043,38 (%3,66)**	**5529,44 (%4,48)**	**11489,80 (%3,12)**	**18715,20 (%2,04)**	
0. dk ciğerdeki konsantrasyona geri hesap için faktör (ESAK grafiği kullanılarak)	**2,09**	**1,84**	**1,64**	**1,87**	**1,86**
EÖAK[d] grafiğinden 0,500 g örnekte bulunan amitriptilin (ng) (%u_{rel}[b])[a]	478,73 (%3,55)	2658,41 (%4,40)	5554,41 (%3,14)	9065,07 (%2,04)	
EÖAK[d] grafiğinden bulunan ciğerdeki amitriptilin konsantrasyonu (ng/g) (%u_{rel}[b])[a]	**957,46 (%3,55)**	**5316,82 (%4,40)**	**11108,82 (%3,14)**	**18130,14 (%2,04)**	
0. dk ciğerdeki konsantrasyona geri hesap için faktör (EÖAK grafiği kullanılarak)	**1,91**	**1,77**	**1,59**	**1,81**	**1,77**

[a]117. saatte (çürüme, büzüşme ve larva üremesinden sonra

[b]yüzde bağıl belirsizlik

[c]ESAK: Ekstraksiyon sonrası amitriptilin katılmış

[d]EÖAK: Ekstraksiyon öncesi amitriptilin katılmış

Tablo XXIX. Larva analizlerinden elde edilen amitriptilin konsantrasyonlarının, ölüm anındaki ciğer konsantrasyonunun bulunmasında kullanılması için gerekli faktörlerin bulunması

LARVA MATRİKSİNDE AMİTRİPTİLİN TAYİNİ	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**Ort Faktör**
250,00 g ciğere katılan amitriptilin miktarı (ng)	125000.00	750000.00	1750000.00	2500000.00	
Katım yapılmış ciğerdeki amitriptilin konsantrasyonu (ng/g)	**500.00**	**3000.00**	**7000.00**	**10000.00**	
ESAK[c] grafiğinden 0,500 g larvada bulunan amitriptilin (ng) (%u_{rel}[b])[a]	153,05 (%5,14)	939,52 (%5,39)	2408,75 (%3,19)	3220,40 (%3,89)	
ESAK[c] grafiğinden bulunan larvadaki amitriptilin konsantrasyonu (ng/g) (%u_{rel}[b])[a]	**306,10 (%5,14)**	**1879,04 (%5,39)**	**4817,50 (%3,19)**	**6606,44 (%3,89)**	
0. dk ciğerdeki konsantrasyona geri hesap için faktör (ESAK grafiği kullanılarak)	**0,61**	**0,63**	**0,69**	**0,66**	**0,65**
EÖAK[d] grafiğinden 0,500 g larvada bulunan amitriptilin (ng) (%u_{rel}[b])[a]	158,17 (%5,06)	1009,60 (%5,31)	2600,22 (%3,05)	3478,91 (%4,24)	
EÖAK[d] grafiğinden bulunan larvadaki amitriptilin konsantrasyonu (ng/g) (%u_{rel}[b])[a]	**316,34 (%5,06)**	**2019,20 (%5,31)**	**5200,44 (%3,05)**	**6957,82 (%4,24)**	
0. dk ciğerdeki konsantrasyona geri hesap için faktör (EÖAK grafiği kullanılarak)	**0,63**	**0,67**	**0,74**	**0,70**	**0,65**

[a]117. saatte (çürüme, büzüşme ve larva üremesinden sonra

[b]yüzde bağıl belirsizlik

[c]ESAK: Ekstraksiyon sonrası amitriptilin katılmış

[d]EÖAK: Ekstraksiyon öncesi amitriptilin katılmış

0,500 g ciğer matriksinde LC-MS/MS kullanılarak geliştirilmiş olan yöntem ile olay yeri simülasyonu sonucu 4 farklı konsantrasyondaki (C1, C2, C3, C4) 117 saatlik ciğerden elde edilen örneklerde amitriptilin miktarları ESAK ve EÖAK yöntemine göre tayin edilmiş ve Tablo XXVIII' de yeni katım yapılmış taze ciğer örneklerindeki konsantrasyonlar ile kıyaslanmıştır.

Yaptığımız bu çalışma; kontrol deneyleri yapılarak yürütülmüştür. 0. saatte 0,500 g taze ciğere katılan amitriptilin miktarı (ng) bilinmektedir. Bir ekstraksiyon için; 117 saatlik çürümüş ciğerden 0,500 g ve bu ciğerle beslenen larvalardan 0,500 g alınıp, toksikolojik analizleri yapılarak amitriptilin miktarları tayin edilmiş olup, Tablo XXVIII ve Tablo XXIX 'de ESAK ve EÖAK yöntemleriyle çizdirilen grafiklerden bulunan sonuçlar ve 0. saat ciğer örneklerindeki (C1, C2, C3, C4) amitriptilin miktarları karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

5. Tartışma

'Adli bilimlerde *L.sericata* larvalarının entomotoksikolojik çalışmalarda kullanılması' başlıklı bu araştırmada; Türkiye'deki adli vakalarda sıklıkla karşılaşılan bir uyuşturucu türü ve opiatların temel metaboliti olan morfin ve amitriptillin, adli toksikolojik metotlar ile tayin edilecek maddeler olarak seçilmiştir.

Ülkemizde adli bilimlere bir basamak teşkil etmesi açısından yapılan bu çalışmada;

1. Opiat toksikasyonuna maruz kalan dokularla beslenen *Lucilia sericata* larvaları (1., 2., 3. evre larva) nın toksikolojik analizlerde güvenilir ortam (besiyeri) olarak kullanılabileceğinin ortaya konması,

2. Larvalardaki morfin veya amitriptilin seviyeleri ile örnek dokulardaki morfin veya amitriptilin konsantrasyonları arasında korelasyon olup olmadığını belirlenmesi,

3. Normaldoku ve morfin veya amitriptilin içeren doku ile beslenen *Lucilia sericata'*nın büyüme evrelerini karşılaştırılması,

amaçlanmıştır.

Bu araştırmada; *L. sericata* erişkinleri, % 60 nem, 24°C/24 saat gündüz ritmi uygulanan laboratuvar koşullarında, 40 x 40 x 40 cm tel kafes içerisinde % 20'lik şekerli su ile beslenerek yetiştirilmiştir (Şekil 11-14). Dişi sineklerden yumurta almak için kafeslere tavuk ciğeri konmuş (Şekil 14-16) ve yumurtadan çıkan larvalar tavuk ciğeri ile beslenmiştir (Şekil 22-26). Günlük, larva ve pupalardan rastgele 10'ar adet alınmış, distile su ile yıkanıp kurutulduktan sonra -20°C'deki soğutucuda 5 dakika dondurularak öldürülmüş ve entomolojik incelemeler ve toksikolojik analiz için -20°C'de saklanmıştır (Şekil 27,28).

L.sericata sineğine ait tüm büyüme evreleri mikroskop altında incelenmiş, görüntüleri kayıt edilmiştir (Şekil 38-92) ve *L. sericata* sineğine ait büyüme evrelerinin süreleri hesaplanmıştır (Şekil 97 (a),(b)). *L.sericata* sineğine ait yumurta, larva ve pupalarının boy ve ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Aynı zamanda boş ciğer (hiçbir kimyasal madde katılmadan hazırlanmış ciğer) ve

morfin veya amitriptilin katılarak hazırlanmış ciğer ile beslenen *L. sericata* larvalarının büyüme evreleri gözlenmiş ve büyüme evre süreleri hesaplanmıştır (Şekil 97 (a),(b)).

L. sericata sineklerinin ovovivipar (yumurtadan direkt larvalar çıkmaktadır) oldukları görülmüştür (Şekil 50).

Aynı şartlarda bulunan yumurtalardan bazılarının farklı zamanlarda açıldığı ve aynı şartlarda ve aynı besinle beslenmelerine rağmen boyları ve ağırlıkları farklı olan bireylerin olduğu gözlenmiştir.

Bu farklı büyüme değerleri; yumurtaların dişi sinekler tarafından farklı zamanlarda bırakılmış olabileceğini dolayısıyla yumurtalardan farklı zamanlarda çıkan larvaların aynı büyüme süresine sahip olmadıklarını, aynı miktarlarda besin almıyor olabileceklerini ve genetik özelliklerin etkisi olabileceği, şeklinde yorumlanmıştır.

L. sericata yumurtalarından çıkan larvaların, bulundukları yumurtaları ortadan boyuna yararak yumurtadan çıktıkları görülmüştür. *L. sericata* sineğine ait büyüme evreleri aşağıda verilmiştir.

- Yumurta: Sinekler bir kerede 250 - 400 yumurta bırakırlar (Şekil 39-43).
- Yumurtalar açılır: 1. evre larva (Şekil 50, 51, 52, 54)
- 1. evre larva deri değiştirir: 2. evre larva (Şekil 56-58)
- 2. evre larva tekrar deri değiştirir: 3. evre larva (beslenen 3. evre larva) (Şekil 63-66, Şekil 72-74)
- 3. evre larva olgunlaştığı zaman, beslenmeyi bırakır ve hareket etmeye (gezmeye) başlar.
- Prepupa (Pupa öncesi dönemdeki evre) (gezici evre larva) (beslenme sonrası 3. evre larva) (Şekil 76-79)
- Prepupa, daha sonra deri değiştirir: Pupa (Şekil 82-86)
- Pupa metamorfoz geçirdikten sonra: Ergin (Yetişkin) sinek ortaya çıkar (Şekil 87-92).

L. sericata sineğinin büyüme evrelerinde görülen morfolojik değişiklikler aşağıda anlatılmıştır.

Yumurtadan çıkan larvaların büyüme evresine 1. larva evresi denilmektedir.

1. larva evresinde; larvalarda skleritlerin ve solunum yarıklarının var oldukları fakat solunum yarıklarının çok belirgin olmadığı gözlenmiştir (Şekil 55).

2. larva evresinde; 2 solunum yarığı bulunduğu görülmüştür (Şekil 56,58).

2. larva evresinden 3. Larva evresine geçerken; 2. larva evresinde görülen 2 solunum yarığı 3. larva evresinde görülen 3 solunum yarığının aynı zamanda ve aynı larvada beraber bulunduğu gözlenmiş (Şekil 59-62) ve bu gözlemin deri geğişiminden kaynaklandığı anlaşılmıştır (Şekil 63-67).

3. larva evresinde; 3 solunum yarığının bulunduğu ve skleritlerinin belirgin olduğuı tespit edilmiştir (Şekil 67-71).

Larvaların, bir evreden diğer evreye geçerken derilerini değiştirdikleri gözlenmiştir (Şekil 72-75). Deri değişimi sırasında larvaların birbirlerine yardım ettikleri görülmüştür (Şekil 72).

Deri değişimi sırasında endokutikula sıvı hale getirilir, örtü hücreleri, yeni oluşan kutikulin tabakasının altında yeni epikutikula tabakalarının en içteki kısmını salgılamaya başlar. Kutikulanın dış kısmı, deri değiştirildikten kısa bir süre sonra, büyük ölçüde sertleşir, bu sertleşmede deri değiştirme hormonu olan ektizon, büyük öneme sahiptir.

Gezici evre larvaların, pupa evresine geçmeleri için talaşlı ve kuru bir ortama alınmadıkları taktirde öldükleri gözlenmiş ve gezici evre larvalarının pupa evresine geçerken kuru bir ortama ihtiyaç duydukları fark edilmiştir. Larvaların 3. evreden pupa evresine geçerek hayatlarını devam ettirebilmeleri için uygun ortama, doğru zamanda geçmeleri gerektiği sonucuna varılmıştır. 3. evre larvaların pupa evresine geçerken sıcaklık ve nem değerlerinin çok önemli olduğu anlaşılmıştır.

Larvaların gezici larva evresinde (beslenme sonrası 3. evre larva) beslenmeye ihtiyaçlarının olmadığı ve beslenmeyi bıraktıkları gözlenmiştir (Şekil 76-80).

Gezici evre larvalarının, pupa olmadan once anterior kısımlarının siyah-mavi renkte oldukları görülmüştür (Şekil 80). Pupa evresinde; larvaların boylarının kısaldığı fark edilmiştir (Şekil 78,

79). Larvaların büzüştüğü, hareketsizleştiği ve vücudlarının hafif kurumaya başladığı gözlenmiştir (Şekil 80). Larvanın hareketsiz kaldığı görülmüştür. Gezici evre larvalarının solunum yarıklarının her zaman var olduğu anlaşılmıştır (Şekil 84). Önce larvaların derilerinin beyaz-sarı renkte olduğu, solunum yarıklarının kırmızımsı kahverengi göründüğü ve bundan dolayı solunum yarıklarının çok belirgin olduğu anlaşılmıştır. Zamanla gezici larvanın vücudu sırasıyla açık kırmızı, koyu kırmızı, açık kahve ve sonra tamamıyla koyu kahve veya siyaha yakın bir renkte olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 82-86). Larvanın solunum yarıklarının renginde koyulaştığı fark edilmiştir. Bu yapılara, mikroskopta dikkatli bakılmazsa, ayırt edilemedikleri anlaşılmıştır (Şekil 80).

L.sericata'da holometabol başkalaşım görülmektedir (Şekil 87-92). Gerçek pupa evresi vardır (Şekil 82-86). Bu evrede beslenme yoktur ve hayvan dış görünüşte hareketsizdir. Larva evresi ergine hiç benzemez (Şekil 92). Ancak pupadan çıktıktan sonra ergin özelliği kazanır. Larva evredeki birçok yapı tamamen ortadan kalkar. Ergin özellikleri, larva evresinde ve holometabol böceklerin çoğunda olduğu gibi pupa evresinde oluşur. Ergini yapacak yapılar ve organlar, larval dokular içindeki farklılaşmamış embriyonal hücrelerden meydana gelirler.

Ergine ait taslaklar büyüdükçe, larvaya özgü organların aynı ölçüde yıkıldığı görüldü. Bu yıkılma histoliz, otoliz, liyositoz veya fagositozla olur.

24°C/ 24 saat gündüz ritmi uygulanan laboratuvar koşullarında; sinek pupadan çıktığında kül rengine sahiptir (Şekil 90,91). Yaklaşık 3 saat sonra renkli hale gelir (Şekil 93). Sinek pupadan yeni çıktığında kanatları buruşuktur (Şekil 91), 30 dakika içinde kanatları düzleşmektedir (Şekil 92). Erişkin sinek, pupadan ilk çıktığı zaman erişkin sineğin vücudu çok yumuşak olmaktadır, eğer sineğin vücuduna dokunulursa sineğin vücudunda bozulma meydana gelmektedir (Şekil 91). Erişkin sinek, pupadan ilk çıktığı dakikalarda hemen uçamadığı gözlemlenmiştir. Sineğin kanatlarının hava ile temas ettikten sonra buruşukluğunun geçtiği, kuruduğu ve sertleştiği tespit edilmiştir (Şekil 92). Daha sonra *L.sericata* erişkin sineğinin uçabildiği görülmüştür.

Sonuç olarak; *L. sericata* erişkinlerinin 7-8 gün içinde yumurta vermeye başladığı, 15 günde yumurta sayısının en yüksek düzeye ulaştığı ve bir dişi sineğin 30 dakikada ortalama 400 yumurta bıraktığı gözlenmiştir. Yumurtadan ilk larva çıkışının 16 saatte başladığı; larvaların I.evresinin 24 saat, II. evresinin 50,5 saat, III. evresinin 72 saat, gezici evrenin 53 saat, pupa evresinin 168 saat sürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 97(a), Şekil 97(b)).

Larvaların boy ve ağırlığının III. evrede en yüksek değere ulaştığı tespit edilmiştir (Şekil 98 (a),(b), (c)). *L.sericata'* nın erişkininin ömrünün 35 gün ve hayat döngüsünün ortalama 50 gün olduğu belirlenmiştir (Şekil 97(a), Şekil 97(b)).

Boş ciğer (Kimyasal madde katılmamış ciğer) ile beslenen *L.sericata* larvalarının ortalama boy uzunlukları (mm) ve ortalama ağırlıkları (g) karşılaştırıldığında; larvaların ortalama ağırlık ve ortalama boy uzunluklarının tüm evrelerde birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Beslenmenin en fazla olduğu 3. Evrede *L.sericata* larvalarının büyüme değerleri en yükseğe çıkmaktadır ancak beslenmenin yapılmadığı gezici evre ve pupa evrelerinde ağırlık ve boy ölçülerinin azalmakta olduğu, daha sonra bu değerlerin sabit kaldığı tespit edilmiştir (Şekil 98 (c)).

3. evrede 115. Saatten 140. saate kadar boş ciğer ile beslenen *L.sericata* larvalarının ortalama ağırlıkları amitriptilinli ciğer ile beslenen *L.sericata* larvalarının ortalama ağırlığından daha fazla olduğu ancak 146,5. saatten sonraki tüm evrelerde amitriptilinli ciğer ile beslenen larvaların ortalama ağırlığının daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Şekil 100).

1.evrenin başlangıcından yaklaşık 140. saate kadar olan evrelerde boş ciğer ile beslenen *L.sericata* larvalarının, hemen hemen birbirine yakın olduğu görülmektedir. 140. saatten sonra 211. saate kadar olan evrelerde; amitriptilinli ciğer ile beslenen *L.sericata* larvalarının ortalama boy uzunluklarının daha fazla olduğu ancak 211. saatten sonraki tüm evrelerde her iki grubunda ortalama boy uzunluklarının birbiriyle uyumlu olduğu tespit edilmiştir (Şekil 101).

Ölüm sonrası zamanı (PMI) ölçme ve tanımlama, larvaların gelişim sürelerinin tespiti ile yapılabilmektedir. Böceklerin hayatında büyüme evrelerinin ne kadar sürede geçtiğinin bilinmesi, dişi sinek tarafından yumurtanın bırakılma zamanının hesaplanmasına yardımcı olur. Sineğe ait yumurta, larvaların ve pupanın yaş hesabı ile ölümün ne zaman gerçekleştiği tespit edilebilir. Aynı zamanda ceset üzerinde bulunan sineğin yaşadığı ortam bilinirse suçun ilk işlendiği yer hakkında yorum yapılabilir. Bu nedenlerden dolayı; adli entomologlar vaka araştırmalarında böcekler sınıfından özelliklede sinekler takımından faydalanırlar. Bu bilgiler ışığında; olay yerinden alınan böcekler ve ceset; adli entomologlar tarafından incelendiğinde ölüm yeri, ölüm zamanı ve ölüm sebebi hakkında bilgiler ortaya koyacaktır.

Sonuç olarak; boş ciğer ile beslenen *L.sericata* larvalarınının ve amitriptilinli ciğer ile beslenen *L.sericata* larvalarının ortalama boy ve ağrlık değerleri farklı saatlerde ve evrelerde bazen birbirine uyumlu olduğu bazende değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Bu bilgi; adli bilimler açısından önemli bir bilgidir. Bu çalışma; adli vakaların daha doğru sonuçlanmasında adli entomoloji ve entomotoksikoloji bilimlerinden faydalanılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Aynı zamanda bu çalışma, kimyasal bir madde sebebi ile ölüm söz konusu ise ve cesede ait toksikolojik analiz yapılabilecek nitelikte yada hiç biyolojik doku bulunamadığında ceset ile beslenen böceklerden ve larvalarından toksikolojik analiz yöntemleri kullanılarak kişinin ölmeden önce aldığı kimyasal maddeye ait kalitatif ve kantitatif analiz yapmayı hedeflemiştir.

Ortamın sıcaklık ve nem değerleri cesedin çürüme oranını etkilemektedir. Bu çalışma, 24ºC (±1) /24 saat gün ışığı ve % 50-60 nem bulunan laboratuvar şartlarında gerçekleştirilmiştir. Olay yerinin sıcaklığı ne kadar çok yükselirse daha kısa zamanda, cesede ait ciğer ya da biyolojik örnek daha hızlı bozunacaktır veya ortamda kalmayacaktır. Ancak ceset tamamen yok olana kadar her çürüme evresinde farklı beslenme alışkanlığına ve ağız yapılarına sahip olan böcekler gelmekte ve yumurtalarını bırakmaktadır. Bu adli entomoloji bilgisinden yola çıkarak

cesede ait biyolojik doku bozulduğunda veya kalmadığında bile ortamda böcekleri veya larvaları bulmak mümkündür (31).

Böcekleri ve larvalarını biyolojik doku gibi düşünerek ve muamele ederek bu örnekler ile toksikolojik analiz yapılabilmektedir (108).

Larvadan morfin ve amitriptilinin RİA (Radyoimmunoesey) yöntemi ile analiz edildiği çalışmalar yapılmıştır (3, 81, 86).

Ciğer postmortem toksikolojide ve sıklıkla herhangi bir toksikolojik kan bilgisine ek olarak stok katı doku olarak kullanılmaktadır (94). Yangınlarda ve çürümelerde toksikolojik analiz için uygun yapıda kan olmadığında; ciğer önemli bir analiz örneğidir (95). Ciğerde kimyasal maddelerin çoğu kanda olduğundan daha yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Aynı zamanda ciğer; yüksek dozda ve düşük kan konsantrasyonlarında trisiklik antidepresanları belirlemede özellikle uygun bir dokudur. Ciğer, sık toplanan postmortem dokulardan biridir ve belli ilaçların toksikolojik analizinin daha kolay yapılmasını sağlamaktadır (105).

Yaptığımız bu çalışmada; larvaların beslendiği biyolojik doku olarak, metabolizmada biyotransformasyon ve detoksifikasyon mekanizmasının gerçekleştiği ciğer tercih edilmiştir.

Bu çalışmada; larvadan ve ciğerden, morfin ve amitriptilin analiz edilmiştir. MRM (Çoklu Reaksiyon İzleme) metodu, maddenin alıkonma zamanını (R*t*) belirleyerek ve kütle / iyon (m/z)'u seçerek geliştirilmiştir. Morfinin kütle spektrumundaki 286,0 kütle numaralı iyonun parçalanması ile elde edilen 201,0 kütleli iyondan elde edilmiştir. Kromatogramlar Şekil 105 ve 106' da gösterilmiştir. Amitriptilinin kütle spektrumundaki 278,0 kütle numaralı iyonun parçalanması ile elde edilen 91,0 kütleli iyondan elde edilmiştir. Kromatogramlar Şekil 111 ve 112'de gösterilmiştir. Kullanılan metod standart çözeltiler, ciğer ve larva matriksi içinde valide edilmiştir. LOD and LOQ değerleri Eurachem yöntemine göre belirlenmiştir. Validasyon sonuçları ciğer ve larva matriksinde amitriplini kantitatif ve morfini kalitatif olarak analiz edilebildiğini göstemiştir.

Öncelikle morfin analizi için geliştirilen yöntemin doğrusallığı, seçiciliği ve larva matriksindeki geri kazanımı ve tekrarlanabilirlik parametreleri incelenmiştir.

Morfin çalışması sonrası, amitriptilin maddesi için larvadan ve ciğerden bir ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Validasyon parametrelerine ilişkin hesaplamalar, Excel programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her iki maddeye ait validasyon parametreleri aşağıda anlatılmıştır.

• Seçicilik: Seçicilik için blank metanol kromatogramı ile morfin ve amitriptillin standart çözeltilerinin piklerinin elde edildiği kromatogramlar kıyaslanmış ve bu maddelerin piklerinin geldiği alıkonma zamanında metanolden kaynaklanan bir girişim olmadığı gözlenmiştir (Şekil 105). Aynı şekilde madde içeren larva ekstraktlarından elde edilen morfin ve amitriptilin kromatogramlarında, larvanın kendisinden ve ekstraksiyon işlemlerinden gelen herhangi bir pik girişimi olmadığı ayrıca ciğer ekstraktından elde edilen amitriptilin kromatogramında da ciğerden gelen bir girişimin olmadığı örneklerle aynı şekilde ekstrakte edilmiş blank larva ve ciğer kromatogramları ile kıyaslanarak anlaşılmıştır (Şekil 106, 108).

• Kesinlik (tekrarlanabilirlik): Morfin için, 5,00, 25,00, 100,00, 500,00, 750,00 ve 1000,00 $ngmL^{-1}$konsantrasyonlardaki standart çözeltilerle gerçekleştirilen tekrarlı analizlerde ortalama %RSD değeri 10,32 olarak bulunmuştur (Tablo XIII, Şekil 107). Bununla birlikte, larva örnek matrikslerine 1,0 $ngmL^{-1}$ konsantrasyonda (n=4) ekstraksiyon sonrası ve ekstraksiyon öncesi katım yapılarak, örneğin analizi sonucu elde edilen geri kazanımların tekrarlanabilir olmamasından dolayı morfin için bu yöntemin çok yağlı bir matriks olan larvada kantitatif tayinlerde kullanılamayacağı, sadece kalitatif bir tarama testi olarak kullanılabileceği görülmüştür. Bu sebeple morfin analizi için larvada validasyon çalışması gerçekleştirilmemiştir.

Ekstraksiyon öncesi ve ekstraksiyon sonrası çeşitli konsantrasyonlarda amitriptillin katılan ciğer örnekleri ise, her bir konsantrasyon için ($n \leq 6$) analiz edilmiştir. Yöntemin

tekrarlanabilirliği EÖAK (Ekstraksiyon öncesi amitriptilin katılmış) ciğer örneklerinde $\%RSD_{ortalama}$ cinsinden % 11,55, ESAK (Ekstraksiyon sonrası amitriptilin katılmış) ciğer örneklerinde $\%RSD_{ortalama}$ cinsinden % 8,61 olarak bulunmuştur (Tablo XIII, Tablo XIV). Ekstraksiyon öncesi ve ekstraksiyon sonrası çeşitli konsantrasyonlarda amitriptilin katılan boş (amitriptilin katılmayan ciğer ile beslenmiş) larva örneklerinde de ($n \leq 6$) analizler gerçekleştirilmiş, EÖAK (Ekstraksiyon öncesi amitriptilin katılmış) larva örneklerinde $\%RSD_{ortalama}$ cinsinden % 7,04, ESAK (Ekstraksiyon sonrası amitriptilin katılmış) larva örneklerinde $\%RSD_{ortalama}$ cinsinden % 7,52 olarak bulunmuştur (Tablo XXI, XXII).

• Lineerite (doğrusallık**):** Morfin için, 5,00, 25,00, 100,00, 500,00, 750,00 ve 1000,00 $ngmL^{-1}$ konsantrasyonlardaki standart çözeltilerle kalibrasyon eğrileri oluşturuldu (Tablo VIII, Şekil 107). Optimize edilmiş olan LC-MS/MS koşullarında amitriptillin standart çözeltilerinin analizi sonucu oluşturulan kalibrasyon grafiklerine ilişkin ölçüm aralıkları 5,00 $ngmL^{-1}$-750,00 $ngmL^{-1}$ (Tablo XI, Şekil 109)ve 750,00-3000,00 $ngmL^{-1}$ dır. (Tablo XII, Şekil 110). EÖAK (Ekstraksiyon öncesi amitriptilin katılmış) ciğer örneklerinde konsantrasyona karşı sinyal ilişkisinin doğrusal olduğu aralık 25,00 (LOQ)-5000 $ngmL^{-1}$ iken, ESAK (Ekstraksiyon sonrası amitriptilin katılmış) ciğer örneklerinde 10,00 (LOQ)-5000 $ngmL^{-1}$ olarak bulunmuştur (Tablo XVI, Şekil 116). EÖAK (Ekstraksiyon öncesi amitriptilin katılmış) larva örneklerinde konsantrasyona karşı sinyal ilişkisinin doğrusal olduğu aralık 7,00 (LOQ)-1000,00 $ngmL^{-1}$ iken(Tablo XX, Şekil 119), ESAK (Ekstraksiyon sonrası amitriptillin katılmış) örneklerde 6,00-1000,0 $ngmL^{-1}$ olarak bulunmuştur (Tablo XXI, Şekil 200).

• Minimum Gözlem ve Tayin Limitleri (LOD, LOQ):Yönteme ilişkin minimum tayin limitini bulmak üzere Eurachem'in grafik yöntemi kullanılmıştır. Artan konsantrasyonlarda ve her bir konsantrasyon için en az 6 tekrar olarak hazırlanan örneklerin analizi sonucu konsantrasyona karşı %RSD grafiği çizildi. Grafikte %20,00 RSD ye denk gelen ya da %20 nin altında %RSD değeri olan ilk konsantrasyon, LOQ değeri olarak alınmıştır. Buradan elde edilen LOQ

değerlerinin yanı sıra, gürültü değerleri kullanılarak LOD= 3,3.Std/Eğim ve LOQ=10.Std/Eğim formülüne göre de hesaplanmış sonuçlar Tablo XXVII'de gösterilmiştir.

LOQ değerinin hesaplanması için en güvenilir yöntem Eurachem yöntemidir. Gürültü değerleri kullanılarak formülden bulunan LOQ değerindeki konsantrasyona denk gelen pikin alanının % RSD değeri 20' yi geçtiği takdirde sağlıklı ve doğru bir konsantrasyon hesabından bahsedilemez. Bununla birlikte, Eurachem yöntemi LOQ değerine denk gelen konsantrasyonun maksimum % 20 standart sapması olabileceği koşulunu getirdiğinden, buradan bulunan LOQ düzeyindeki analizlerde daha güvenilir sonuçlar elde edilebilmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada, Eurachem yönteminden elde edilen değerler LOQ olarak kabul edilmiştir (Tablo XXVII).

• Doğruluk (Geri kazanım): Yöntemin doğruluğunun belirlenebilmesi için yöntemin geri kazanımı test edilmiştir. Bunun için 1,00, 5,00, 10,00, 25,00, 50,00, 100,00, 200,00 ve 500,00 $ngmL^{-1}$konsantrasyonlarındaki ekstraksiyon öncesi ve ekstraksiyon sonrası amitriptilin katımı yapılmış örneklerde, geliştirilen yöntem uygulanarak analiz gerçekleştirilmiş, % Geri kazanım=(EÖAK örneğin pik alanı / ESAK örneğin pik alanı)*100 formülü uygulanarak ciğer ve larva için sırasıyla ortalama 82,21(±6,66) ve 82,89(±6,27) oranında bir geri kazanım olduğu bulunmuştur (Tablo XI). 1 $ngmL^{-1}$ morfin içeren larva örnekleri için ise tekrarlanabilir geri kazanım sonuçları elde edilemediğinden, morfine ilişkin yöntemin kantitatif çalışmalar için uygun olmadığı, bununla birlikte kalitatif tarama testlerinde kullanılabileceği ve morfin varlığının saptanabileceği anlaşılmıştır.

• Ölçüm belirsizliği: Ciğer ve larva matrikslerine ekstraksiyon öncesi ve sonrasında amitriptilin katılarak hazırlanan grafiklerden faydalanılarak bilinmeyen örneklerin analiz sonuçlarına ilişkin belirsizlik türleri (u_{rec}: geri kazanımdaki belirsizlik, u_{reg}: regresyon eğrisine ait

belirsizlik, u_t: tekrarlanabilirlikteki belirsizlik) ve % toplam bağıl belirsizlik hesaplanmış ve sonuçlar Tablo XXVII ve Tablo XXVIII' de belirtilmiştir. Söz konusu belirsizliklerin hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılmıştır:

u_t=std sapma/$n^{1/2}$

u_t= tekrarlanabilirliğe ilişkin bağıl belirsizlik

n= deney sayısı

n değeri 6'dan büyük ise belirsizliğin hesabı için $u_r=S_r/ n^{1/2}$ formülü uygulanır.

Kalibrasyon eğrisinin belirsizliğini hesaplarken aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\mathbf{u}=\left(\left(\frac{s}{\sqrt{N}}\right)/result\right)x100$$

$$\mathbf{u_{reg}}=\left(\left(\frac{s}{\sqrt{N}}\right)/C_{mean}\right)x100$$

$$\mathbf{\%u_{rel}}=\left[\left(\frac{u_t}{result}\right)^2+\left(\frac{u_{rec}}{recovery}\right)^2+\left(\frac{u_{reg}}{C_{mean}}\right)^2\right]x100$$

s:kalibrasyon grafiğindeki tüm noktaların ortalama standart sapması

b: eğrinin eğimi

p: tek konsantrasyondaki bilinmeyen örneğin analiz tekrarı

n:kalibrasyon eğrisi için gerçekleştirilen toplam deney sayısı

yada

n:kalibrasyon grafiğindeki tüm noktalara ait tekrarların toplamı

$\mathbf{x_{pred}}$**:** bilinmeyene ilişkin tahmin edilen konsantrasyon

$\mathbf{x_i}$**:** her bir kalibrasyon düzeyinin konsantrasyonu

x_{ort}:kalibrasyon standartlarının ortalama konsantrasyonu

SS grafiğinden hesaplanan bilinmeyen örneklerin konsantrasyonlarına ilişkin % u_{rel} hesabı:

% u_{rel}= % u_{toplam}/$C_{sonuç}$

117. saatte larvadan amitriptilin tayinine ilişkin % toplam bağıl belirsizlik (%u_{rel}) ESAK örneklerde % 4,40, EÖAK örneklerde % 4,41 olarak, yine 117. saatte ciğerden amitriptilin tayinine ilişkin % toplam bağıl belirsizlik ESAK örneklerde % 3,14 EÖAK örneklerde % 3,28 olarak hesaplanmıştır.

Miller ve ark., 1994'de yaptıkları bir çalışmada; amitriptilin maddesi içeren mumyalaşmış bir dişi cesedin üstünde ve çevresindeki bir kınkanatlı dermestid larva derisi ve dışkısından bu maddeyi elde edebildiği görülmektedir (83).

Daha sonra kitinden toksik maddelerin elde edilebilmesi ile, böcek pupalarından ve derilerinden analizler yapılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonunda; bu kalıntıların çok uzun süre dayanabildiği ve bundan dolayı, olayın üzerinden vakit geçmesine rağmen toksikolojik bilgiler vermeye devam edebildiği anlaşılmıştır (83).

Sadler ve ark., 1995'de yaptıkları çalışmada ; *Calliphora vicina* larvalarından amitriptilin, trimipramin ve trazodonu LLE ve HPLC yöntemleri ile analiz edilebildiğini tespit etmişlerdir.

Sadler ve ark.,1997'de yaptıkları bir başka çalışmada ise; *Calliphora vicina* larvalarında amitriptilinin birikimini ve elimine edilişini araştırmışlardır. Bu çalışmada; *Calliphora vicina* larvalarını, therapatik (100 ng/g), toksik (300 ng/g), letal (500 ng/g) ve 10 x letal (5.000 ng/g) konsantrasyonlarda amitriptilin ve nortriplin katılarak hazırlanan yiyecek ile beslemişler ve larvalardan bu kimyasallar HPLC VE GC-MS yöntemleri ile tespit edilebilmiştir. İlaç katılmayarak hazırlanan yiyecekle beslenen larvalarda (Kontrol grubu); analiz sonucunda hiç ilaç bulunamamıştır. Çalışma sonunda; sinek larvalarının, kalitatif (nitel) analizler için güvenilir olduğu fakat kantitatif (nicel) toksikolojik analizler için güvenilir olmadığı anlaşılmıştır (107).

Grellner ve Glenewinkel 1997' de yaptıkları çalışmalara ve diğer çalışmalara bakıldığında bazı kimyasalların böcek vücudu içerisinde kaldığı süreler şöyledir: Diazepam (Kas gevşetici) 5 yıl, civa 1 ay, morfin 1,1 yıl ve amitriptilin (antidepresan) 5.5 yıl'dır (113).

Hedouin ve ark., 1999'da yaptıkları bir araştırmada; morfin içeren tavşan leşi ile beslenen *Lucilia sericata* (Diptera:Calliphoridae) larvalarında morfini RIA (Radyoimmunoesey) yöntemi ile tespit edebilmişlerdir. Bu çalışmada; larvadaki morfin konsantrasyonun, kas ve yağ dokudaki konsantrasyonlar ile önemli derecede korelasyon içinde oldukları ispatlanmıştır. Larvada bulunan morfin konsantrasyonu, dokudaki morfin konsantrasyonundan 30 ila 100 kat daha düşüktür. Dokudaki morfin konsantrasyonu ile larvadaki morfin konsantrasyonu arasında korelasyon yalnızca 3. evre larvada görülmüştür. Sonuçta; morfin varlığının, en iyi beslenen 3. evre larva da (yumurta bırakıldıktan sonraki 86-140 saatlik larva) tespit edilebildiği anlaşılmıştır. Bunlara ek olarak; bu çalışmada, çok küçük miktardaki morfinin bile metamorfoz geçiren larvada ölçülebildiği tespit edilmiştir (86).

Bourel ve ark., 1999'da yaptıkları araştırmada; 'ölüm öncesi zamanda opiyat zehirlenmesini tespit etmek için nekrofaj böceklerden yararlanarak; RIA yöntemi ile böceklerden morfin ekstrakte edebilmişlerdir. Farklı konsantrasyonlarda morfin içeren et ile beslenen *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) ergin sinekleri ve boş pupalarında aynı yöntem uygulanmıştır. 100 ve 1000 mg/kg morfin konsantrasyonu içeren et ile beslenen böceklerin yalnızca kütikulasında morfin tespit edilebilmiştir. Boş pupalarda ise daha yüksek konsantrasyonlarda morfin bulunabilmiştir. Araştırma sonunda, ölüm sonrası zamanda toksikolojik analiz için uygun doku ve sıvı bulunamadığı durumlarda, boş pupaların uzun süre yapılarını koruyabilmeleri sebebi ile toksikolojik analizlerde alternatif örnekler olarak kullanılabileceği anlaşılmıştır (31).

Gagliano ve ark., 2000'de yayınlanan derlemelerinde; entomolojik örneklere, toksikolojik analizlerde insan dokusuna uygulanan aynı yöntemler uygulanarak bu entomolojik örneklerden kimyasal maddelerin rahatlıkla analiz edilebileceğini vurgulamışlardır Böceklerden ve sineklerden toksik maddelerin ve bunların metabolitlerinin GC-MS ve HPLC-MS yöntemi ile analiz edilebileceğini bildirmişlerdir (109).

Bourel ve ark., 2001'de yaptıkları başka bir araştırmada; *Calliphora vomitoria* (Diptera: Calliphoridae) larvalarında morfinin metabolizmasını immünokimyasal teknikler kullanarak çalışmışlardır. Ayrıca bu çalışmada; cesete ait, toksikolojik analiz için uygun dokular veya ceset üzerinde yaşayan nekrofaj böcekler bulunamadığında; toksikolojik çalışmalar için boş pupaların önemli materyaller olduğu tespit edilmiştir (3).

Introna ve ark., 2001'de yayınlanan derlemelerinde; entomotoksikoloji biliminin adli entomolojinin yeni bir dalı olduğunu ve önemli bir alan olduğunu vurgulamışlardır. Ölüm araştırmalarında ilaçları ve diğer toksinleri tespit edebilmek için uygun yapıda cesede ait dokuların ve sıvıların bulunamadığı durumlarda; sineklerin ve diğer eklembacaklıların toksikolojik analizler için alternatif örnekler olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda entomotoksikoloji biliminin, ilaç ve diğer toksinlerin eklembacaklıların gelişimleri üzerine etkilerini araştırdığını ve bu bilginin ölüm sonrası zamanı doğru tahmin etmede çok önemli rol oynadığını tespit etmişlerdir (6).

Pien ve ark. 2004'de yaptıkları çalışmada; farklı konsantrasyonlarda nordiazepam ilave edilerek suni bir besin hazırladılar ve daha sonra *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) larvalarını bu besin üzerine yerleştirdiler. Beslenme sonrası larvada ve boş pupada; birikimin dinamikleri ve nordiazepamın metabolitlerine dönüşümünü çalıştılar. Analiz, daha önce geliştirilen LC-MS/MS (sıvı kromatogafisi-kütle spektrometresi) metodu uygulanarak gerçekleştirildi. Bu metod, tek larvada ve pupada nordiazepam ve oxazepamın tespiti ve kantitatif (nicel) ölçümü için seçilmiştir. Her iki ilaç, beslenme sonrası larvada ve boş pupada tespit edilebilmiştir. Bunlara ek olarak; nordiazepamın beslenme sonrası larvanın büyüme ve gelişmesine olan etkileri çalışıldı. Fakat nordiazepam ve kontrol grubu içeren besinlerle beslenen larvalar arasında büyük farklılıklar görülmedi. Tek *Calliphora vicina* larvasında ve pupasında nordiazepam ve onun metabolitlerinin, oxazepamın varlığının tespitini bildiren ilk rapordur (110).

O'Brien ve ark., 2004'de yaptıkları araştırmada; parasetamolün *Calliphora vicina* larvalarının gelişimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Kontrol örneği ile beslenen ve parasetamol katılarak beslenen larvaların gelişimlerinde önemli farklılıklar gözlenmemiştir.

Parasetamolün, Calliphoridae larvalarının gelişimini 2-4 gün süresince çok az etkilediği anlaşılmıştır. Parasetamolun ve benzer aneljeziklerin (ağrı kesiciler) aşırı dozlarda alınarak, çok sayıda ölüm vakalarına sebep olduklarından beri, Calliphoridae familyasına ait sineklerin minumum ölüm sonrası zaman tahmini için yetiştirilmesi ve hayat döngülerinin incelenmesi önem kazanmıştır (111).

Campobasso ve ark., 2004'de; yaptıkları bu çalışmada, insan dokusunda ve bu dokularla beslenen Diptera larvalarındaki ilaç konsantrasyonları arasındaki korelasyonu (benzerliği) ortaya koymuşlardır. İlaç içerdiği anlaşılan, 18 vakkadan ciğer örnekleri alınır. Calliphoridae larvaları bu ciğerin üzerine yerleştirilir daha sonra ilaç analizi yapılır. Uygun vücut sıvılarının (kan, idrar) ek olarak ciğer örneklerinin ve maggotların toksikolojik analizleri, ONLİNE abuscreen (Roche) ve GC/MS uygulanarak gerçekleştirildi. Bütün ilaçlar, insan dokularında ve aynı zamanda böcek türünde tespit edildi. Opiatlar, kokain ve barbitüratlar ek olarak biraz antidepresanlar (klomipramin, amitriptilin, nortriptilin, levomepromezin ve tioridazin) gözlendi. İnsan dokusunda ve Calliphoridae larvasında bulunan ilaç konsantrasyonları karşılaştırıldığında; ilaçların farklı dağılımlar gösterdiği anlaşıldı. Bunun sebebinin de farklı fizyolojiye sahip olmalarından kaynaklandığı düşünüldü. Sonuçlar; entomolojik türlerin kalitatif analizler için güvenilir olmasına rağmen, kantitatif değerlendirme için güvenilir olmadığını doğruladı. Tüm xenibiotikler insan dokusunda, maggotlara göre daha yüksek konsantrasyonlarda tespit edildi. Beslenme sonrası maggotlarda, beslenen maggotlara göre önemli ölçüde düşük ilaç konsantrasyonu ölçüldü. Larvaların büyümesi süresince ilaçları metabolize ve elimine etmelerinden dolayı, maggotların beslenme durumları, toksikolojik analizleri etkilediği sonucuna varıldı (112).

Gunn ve ark., 2006'da yaptıkları çalışmada; *Calliphora stygia* larvasında morfini FIA ve HPLC with Kemilüminesans detection yöntemleri ile tespit edebilmişlerdir. Larvalar 2500, 5000 ve 10.000 ng/g morfin konsantrasyonu içeren dokular ile beslenmişlerdir. Sonuçta; 765,2720 ve 3010 ng/g ilaç konsantrasyonlarında, larvadaki morfin konsantrasyonları pozitıf çıkmıştır (42).

Kharbouche ve ark., 2007'de yaptıkları araştırmada; kodeinin *Lucilia sericata*'nın büyüme evrelerine etkilerini ve *L.sericata* larvalarında ve pupalarındaki kodeinin birikimini ve elimine edilmesini incelemişlerdir. Domuz ciğerine farklı konsantrasyonlarda kodein katılarak, *L.sericata* larvalarına yedirilmiştir. *L.sericata'* nın büyüme evrelerini incelemek için larvalar yumurtadan çıktıktan sonra(24 ve 96 saat arası) her 12 saatte bir ciğer üzerinde rasgele 10'ar larva alınır ve larvalar -20 derecede saklanır. Toksikolojik analizler için ise 0,5 gr ciğer ve 0,5 gr larva alınır ve -20 derecede saklanır. Analiz için ekstraksiyon prosedürü geliştirilir ve örnekler LC-MS yöntemi ile analiz edilir. Sonuçta; bütün larvalarda LC/MS yöntemi ile kodein tespit edilmiştir. Ciğer ve larvadaki kodein seviyelerinin belli bir korelasyon içinde olduğu görülmüştür. Kodein katılmayan ciğer ile beslenen larvalarda (Kontrol grup) kodein tespit edilmemiştir. Kodeinin *L.sericata* larva ve pupalarının gelişimlerini etkilediği görülmüştür (9).

Vanin ve ark., 2008'de yaptıkları bir çalışmada; Avrupa'nın güneydoğusunda adli araştırmalar için Lucilia cinsine ait sinek türlerine ait bilgileri elde etmişlerdir. Eğer ölüm bir kaç ay veya yıllar önce gerçekleşmişse ceset üzerinde *L. sericata* sineğine ait boş pupalar tespit edilebilir. Bu bilgi, araştırmacılara ölümün gerçekleştiği mevsim ile ilgili veriler sunar. Bundan dolayı *Lucilia sericata* türünün fenolojisi ve hayat döngüsü araştırılmalıdır. Lucilia cinsine ait türlerin, adli entomoloji araştırmaların da çok önemli türler olduğunu da açıklamışlardır.

Gosselin ve ark., 2011'de yazdıkları derlemede; entomotoksikoloji biliminin, böceklerin alternatif toksikolojik örnekler olarak kullanılabileceğini araştırdığını bildirmişlerdir. Bu derlemede, toksikolojik analiz için uygun yapıda kan, idrar veya içorganlar bulunamadığı

zamanlarda böceklerin alternatif matriks olarak kullanımının öneminden bahsedilmektedir. Aynı zamanda bu derlemede, böceklerdeki ilaç analizini etkileyen faktörler anlatılmaktadır (108).

Lamia ve ark., 2011'de yaptıkları çalışmada; tramadolun *Lucilia sericata* larvalarının gelişimine etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada; tavşan leşlerine 550, 1100 ve 2200 mg/kg konsantrasyonlarında tramadol katılmıştır. *L. sericata* larvaları bu dokular ile beslenmişlerdir. Bu konsantrasyonlar gerçek ölüm vakalarına sebep olan aşırı doz (overdose) tramadol konsantrasyonlarına yakındır. Çalışma sonunda; dokularda ve larvalarda HPLC ile tramadol tespit edilebilmiştir. Tramadol konsantrasyonları, çeşitli dokularda ilk doza (başlangıç dozu) göre önemli oranda artmaktadır. Larvalarda bulunan tramadol konsantrasyonları, dokularda bulunandan daha düşük oranlarda tespit edilmiştir. Tramadol katılarak hazırlanmış tavşan leşleri ile beslenen larvalar maksimum boya, kontrol tavşanı (tramadol katılmadan hazırlanan tavlan leşi) ile beslenen larvalara göre daha erken ulaşmaktadır. Larvaların toplam büyüme evrelerinin süreleri ilk dozun artması ile önemli oranda artış göstermektedir. Sonuç olarak bu çalışmada; araştırmacıların, ölüm sonrası zamanı (PMI) tahmin etmeden önce; Fatal tramadol vakalarında ve dokuların ve larvaların toksikolojik analizlerinde veya her iki durumda da çok dikkatli çalışarak, elde edilen verilere göre PMI'ın doğruya en yakın bir şekilde tespit edilebileceği ortaya koyulmuştur (114).

Bushby ve ark., 2012'de yaptıkları bir çalışmada; fare beyinine metilfenidat katılarak bir besin hazırlanmıştır ve Calliphorid larvaları bu dokular ile beslenmiştir. Bu çalışmada; geri kazanımı (recovery) >% 80 olan sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılarak, LC-MS/MS metodu geliştirilmiştir. Calliphorid larvalarından ve metilfenidat katılarak hazırlanmış fare beyin dokusunda, metilfenidat analiz edilebilmiştir (115).

Mai ve ark; 2012'de yaptıkları bir çalışmada; ceset üzerinde yaşayan sineklerin yumurta, larva ve pupa evrelerinin yaşlarını hesaplayarak, en yakın ölüm sonrası zamanı hesaplamayı

hedeflemişlerdir. Bu çalışmada; çeşitli beslenme sonrası zamanların, 25 °C' de *Lucilia sericata* 'nın gelişimine etkileri incelenmiştir (116).

Moore ve ark; 2013'de yaptıkları çalışmada; hidrokarbon bileşiklerini kullanarak *L. sericata* larvalarının yaşını hesaplamışlardır. Bu çalışmada; *L. sericata* sineğinin larva evresinden pupa evresine geçene kadar günlük *L. sericata* 'nın kutikulasından hidrokarbon bileşikleri ekstrakte edilmiştir ve GC-MS kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışma sonunda; hidrokarbon özelliklerine bağlı olarak larva hayat döngüsünde, önemli kimyasal değişiklikler olduğu görülmüştür (117).

Magni ve ark., 2014'de yaptıkları bir çalışmada; *Calliphora vomitoria* larvalarından metamfetamini tespit edebilmek için GC-MS yöntemi geliştirmişlerdir ve bu yöntemi valide edebilmişlerdir. Bu çalışmada; sıvı-sıvı ekstraksiyon ve türevlendirme yöntemleri uygulanmıştır. Aynı zamanda bu çalışmada; metamfetaminin *Calliphora vomitoria* larvalarının gelişimine etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonuçları şöyledir: (i) Metamfetaminin, *C. vomitoria* sineklerinde yumurta evresinden ergin evresine kadar olan tüm büyüme evrelerinin sürelerinde önemli bir artışa sebep olduğu anlaşılmıştır. (ii) Metamfetamine maruz bırakılan larvaların yaklaşık % 60'ı pupa evresindeyken öldüğü görülmüştür. (iii) Sonuçta; metamfetamine maruz bırakılan larva ve pupaların boy uzunluklarının ortalama değerlerinin, kontrol grubundan önemli oranda daha büyük olduğu tespit edilmiştir (118).

De Aguiar ve ark., 2015'de yaptıkları bir çalışmada; çürümüş dokularla beslenen larvada, altı tane reçeteli ilacı, kokaini ve onun metaboliti olan benzolekgonini, aldikarp ve onun sulfon ve sulfoksid metabolitlerini eşzamanlı olarak belirlemek için analitik bir metod geliştirmişlerdir ve valide etmişlerdir. Bu çalışmada; katı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır ve analizler LC–MS–MS cihazında gerçekleştirilmiştir (119).

Lawai ve ark., 2015'de yaptıkları bir çalışmada; paraquat zehirinin, Malezya'da intihar veya cinayet amaçlı kullanılmakta olduğunu ve bu zehirin toksikolojik analiz yöntemleri ile tespit edilebilmesi için böceklerin, alternatif matriksler olarak adli bilimlere hizmet edebileceklerini

bildirmişlerdir. Aynı zamanda araştırmacılar, sineğin larvasının dokusundan paraquatın tespit edilmesine dair hiç bir raporun olmadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada; paraquat zehirinin bulunduğu tavşan leşi ile beslenen larvaların toplanarak, sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi uygulanarak GC-MS cihazında toksikolojik analizleri yapılmıştır. Paraquatın alıkonma zamanının 12,8 dakika olduğu saptanmıştır. Çalışma sonunda; paraquatın sebep olduğu ölüm vakalarında, Blowfly larvalarının kullanılmasının çok faydalı olacağını ispatlamışlardır (120). Sankhla ve ark., 2017 yayınladıkları derlemede; ABD'de ve dünyanın geri kalanında uyuşturucuya bağlı ölümlerde artış olduğunu ve1980'lerden beri entomologların, ceset ile beslenen böceklerdeki ilaçların analiz edilmesine dikkat çektiklerini belirtmişlerdir. Bu derlemede; entomotoksikoloji bilimi, ''eklembacaklılardaki toksinlerin analizi (özellikle sinekler ve Böcekler)'dir'' şeklinde tanımlanmıştır. Adli Entomotoksikolojik çalışmaların çoğunda, reçete edilen ilaçların analizlerine yoğunlaşıldığını bildirmişlerdir. Ayrıca bu derlemede; toksikolojik analiz için uygun yapı ve özellikte olmayan insan numunelerinin mevcut olmadığı durumlarda toksikolojik analiz için böceklerin, önemli alternatif örnekler olduğu vurgulanmıştır (121).

Tahouni ve ark., 2017'de yaptıkları çalışmada; tramadolun *Sarcophaga argyrostoma* larva ve pupaların gelişimine etkilerini incelenmiştir. Bu çalışmada; larvalar, üç grup Wister albino farelerine ait ciğerler ile beslenmişlerdir. 1. grup fare ciğerlerine normal dozda tramadol (D1), 2.grup fare ciğerlerine daha yüksek dozda (çift doz) (D2) tramadol enjekte edilmiştir. Üç ay süresince günde bir kere mideye iletilen tüp ile tramadol verilmiştir. Üçüncü gruba (kontrol grubu) normal tuzlu su çözeltisi enjekte edilmiştir. Daha sonra örnekler, GC-MS'de analiz edilmiştir. Fare ciğerlerinde; D1 için 0.72 ve D2 için 1.62mg/g tramadol tespit edilmiştir. D1 uygulanan fare ciğerleri ile beslenen *S. argyrostoma* larvalarında 0,11 mg/g, D2 uygulanan ciğerler ile beslenen larvalarda 0,18mg/g tramadol tespit edilmiştir. *S. argyrostoma* pupalarında D1 için 0,07 mg/g, D2 için 0,09 tramadol bulunmuştur. D1 ve D2 ciğerleri ile beslenen

larvaların dokusundaki tramadol birikiminin azaldığı fark edilmiştir. Son olarak da; daha fazla tramadol enjekte edilerek hazırlanan ciğerler ile beslenen pupaların ağırlığının arttığı (Kontrol:14.1750±0.4667mg, D1:15.2449±0.302mg ve D2:15.9062±0.2888mg) tespit edilmiştir (122).

Mohamad ve ark; 2017'de yaptıkları çalışmada; efedrin sülfatın *Chrysomya albiceps* larvalarında tespit edilmesini ve efedrin sülfatın *Chrysomya albiceps* larvalarının (beslenen 3. evre) büyüme evrelerine etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada; 5 kg'lık köpekler 5ml efedrin sülfat enjekte edilerek öldürülmüştür. Efedrin enjekte edilerek öldürülen köpek leşleri ile beslenen larvalardan, efedrini GCFID (Alev iyonlaşması ile GC) yöntemi ile efedrini analiz edebilmişlerdir. Çalışma sonunda; efedrinin *Chrysomya albiceps* sineğinin yumurtama süresini ve larval gelişim sürelerini etkilemediği fakat pupa süresini etkilediği (efedrinli örnek ile beslenen: 6. 50 ± 0.25 gün, kontrol ile beslenen: 5. 50 ± 0.25 gün) fark edilmiştir. PMI tahmininde sadece *Chrysomya albiceps* pupaları kullanılabileceği ortaya konmuştur (123).

Özdemir ve İnak, 2018 yayınlanan derlemelerinde; Entomolotoksikolojik çalışmalar, kurbanın zehirlenme ya da uyuşturucu tüketimi ile ilgili önemli kanıtlar sunabildiğini belirtmişlerdir. Bu derlemede; ceset üzerinde beslenen böceklerin, cesetten aldıkları yabancı kimyasalları vücutları içerisinde koruyabilme ve biriktirebilme (sekestrasyon) özelliğine sahip oldukları anlatılmıştır. Ancak kimyasalların kadavrada kalma süresinin her zaman aynı olmadığı ve bu sürenin, vücut yapısına ve toksikantın kendisine bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir. Böcek içerisindeki detoksifikasyon enzimlerinin de, toksikantın parçalanması ya da biriktirilmesinde rol oynayabildiğini açıklamışlardır. Özdemir ve İnak, derlemelerinde son olarak; entomotoksikolojik verilerin yorumlanmasının, alanında uzman kişiler tarafından gerçekleştirilmesi gerektiğini, aksi takdirde adli vakaların çözümlenmesinde geri dönüşü olmayan büyük hatalara sebebiyet verilebileceğini vurgulamışlardır (124).

Birçok araştırmada; cesede ilk gelen Calliphoridae familyasından olan sinek türleri ve aynı zamanda özellikle Calliphoridae familyasına ait Lucilia cinsinden olan *Lucilia sericata* sinek türleri, toksikolojik analizler için ortam olarak seçilmiştir.

Yaptığımız bu çalışmada uygulanan yöntem; Kharbouche ve ark.,'nın 2007'de yaptıkları araştırmada kullandıkları yöntem ile benzerlik göstermektedir.

Bizim çalışmamızda; larvadan ve ciğerden amitriptilin ve morfin analizleri yapılmıştır. Yapılmış olan çalışmaları incelediğimizde; Sadler ve ark., 1995 ve 1997'de amitriptilini çalışmışlardır (107). Bu çalışmalar, entomotoksikoloji alanındaki ilk çalışmalardır ve Sadler ve ark., çalışmalarının sonucunda larvadan amitriptilinin kalitatif analizini yapabilmişlerdir fakat kantitatif analizini yapamamışlardır. Zamanın ilerlemesi ve teknolojinin gelişmiş olması, toksikolojik analizlerde çok fazla çalışma yapılması ve analizlerde ileri düzeyde gelişmiş cihazların kullanılması sebebi ile yaptığımız bu çalışmada; larvadan ve ciğerden amitriptilinin kalitatif ve kantitaif analizlerini gerçekleştirebildik.

0,500 g ciğer matriksinde LC-MS/MS kullanılarak geliştirilmiş olan yöntem ile olay yeri simülasyonu sonucu 4 farklı konsantrasyondaki (C1, C2, C3, C4) 117 saatlik ciğerden elde edilen örneklerde amitriptilin miktarları ESAK ve EÖAK yöntemine göre tayin edilmiş ve Tablo XXVIII' de yeni katım yapılmış taze ciğer örneklerindeki konsantrasyonlar ile kıyaslanmıştır.

Yaptığımız bu çalışma; kontrol deneyleri yapılarak yürütülmüştür. 0. saatte 0,500 g taze ciğere katılan amitriptilin miktarı (ng) bilinmektedir. Bir ekstraksiyon için; 117 saatlik çürümüş ciğerden 0,500 g ve bu ciğerle beslenen larvalardan 0,500 g alınıp, toksikolojik analizleri yapılarak amitriptilin miktarları tayin edilmiş olup, Tablo XXVIII ve Tablo XXIX 'de ESAK ve EÖAK yöntemleriyle çizdirilen grafiklerden bulunan sonuçlar ve 0. saat ciğer örneklerindeki (C1, C2, C3, C4) amitriptilin miktarları karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Çalışma sonunda; olay yeri simülasyonun gerçekleştirildiği 117. saatteki çürümüş ciğerdeki amitriptilin miktarının, 0. saatteki taze ciğerdeki amitriptilin miktarından daha yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni ise; ciğerin sıcaklık ve nemin etkisi ile zamanla çürümesi, hacim ve miktarca azalması ve kuruması sonucunda amitriptilinin ciğer dokusunda daha konsantre hale gelmesidir. Ciğer üzerine aktarılan yumurtalar ortalama 16 saat sonra açılmakta ve larvalar ciğer ile beslenmeye başlamaktadır. Larvalar, ciğeri enzimleri yardımı ile parçalamakta ve bu enzimler ciğere aktarılmaktadır. Aynı zamanda larvalar belirli zamanlarda üç kere deri değiştirmekte, attıkları amitriptilin ve metabolitlerini içeren deriler de ciğer içinde kalmaktadır. Bir ekstraksiyonda 0,5 g ciğer kullanılmaktadır, bu miktar 117 saatlik çürümüş ve yukarıda bahsedilen faktörlere maruz kalmış ciğerden alınmaktadır. Bu faktörlerin hepsi beraber dikkate alınıldığında; 117. saatte örneklenen çürümüş ciğerdeki amitriptilin miktarının, 0. saatteki taze ciğere kıyasla neden daha fazla miktarda tespit edildiği anlaşılabilmektedir.

Olay yerinden larva toplanıp, larvadaki kimyasal maddeye ait kantitatif ve kalitatif analiz yapılması sonucu kişinin ölmeden önce ne kadar lethal dozda madde aldığı sorusuna cevap vermek için 0,5 g larvada bilinen miktarda amitriptilin varsa ciğerde y kadar amitriptilin vardır, normal bir insanda x ağırlıkta ciğer bulunmaktadır diyerek geri hesap yapabilmeliyiz. Yaptığımız bu çalışmada; bu soruya ancak 117. saatte ele geçirilen doku (ciğer) için cevap verebilmekteyiz.

Ciğer ve larva analizlerinden elde edilen amitriptillin konsantrasyonlarının, ölüm anındaki ciğer konsantrasyonunun bulunmasında kullanılması için türetilmiş olan gerekli faktörler Tablo XXVIII' de verilmiştir. Ciğer matriksinde yapılan amitriptillin analizlerinde ESAK grafiğinden elde edilen sonuçlara göre 0. dakikadaki ciğerdeki konsantrasyona geri hesap için ortalama faktör 1,86, EÖAK grafiği kullanılarak elde edilen sonuçlara göre 1,77 olarak bulunmuştur (Tablo XXVIII).

Larva matriksinde ise hem ESAK hem de EÖAK grafiği kullanılarak elde edilen sonuçlara göre 0. dk ciğerdeki konsantrasyona geri hesap için ortalama faktör 0,65 olarak bulunmuştur (Tablo XXIX).

Aynı zamanda yapılan bu çalışma; 117(±0.5) saatin sonunda çürümüş ciğer matriksinden ve bu ciğerden toplanan 117(±0.5) saatlik larvalardan, O. saatteki (çürüme başlamadan önce) ciğerde bulunan amitriptilin konsantrasyonunun hesaplanabilmesi için bir formül sunmaktadır. Gerçeğe uygunluk açısından, EÖAK grafiğine göre değerlendirilen sonuçlardan elde edilen faktör tercih edilmiştir.

EÖAK grafiklerinden bulunan yenmiş ciğerlere ilişkin konsantrasyonlar kullanılarak çürüme başlamadan önce ciğerde bulunan amitriptilin konsantrasyonunun bulunması için tavsiye edilen formül şudur:

Çürüme başlamadan önce ciğerdeki amtiriptilinkosantrasyonu=EÖAK grafiğinden bulunan yenmiş ciğerdeki amitriptilin konsantrasyonu (ng/g) / 1,66

EÖAK grafiklerinden bulunan ciğerden beslenmiş larvalardaki konsantrasyonlar kullanılarak çürüme başlamadan önce ciğerde bulunan amitriptilin konsantrasyonunun bulunması için tavsiye edilen formül ise şudur:

Çürüme başlamadan önce ciğerdeki amtiriptilin konsantrasyonu (ng/g)=EÖAK grafiğinden bulunan ciğer yemiş larvalardaki amitriptilin konsantrasyonu (ng/g) / 0,65

L.sericata larvaları bu çalışmada toksikolojik analizler için ortam (besiyeri) olarak tercih edilmiştir. Türkiye'deki adli vakalarda sıklıkla karşılaşılan uyuşturucu türü ve opiatların temel metaboliti olan morfin (3,6-dihidroksi-4,5-epoksi-17-metilmorfinan-7-en) ($C_{17}H_{19}NO_3$) ve amitriptilin (3- (10,11-dihidro-5H-dibenzo [a, d] siklohepten-5-iliden) -N, N-dimetil-1-propanamin) ($C_{20}H_{23}N$), bu araştırmada adli toksikolojik metotlar ile tayin edilecek maddeler olarak seçilmiştir. Homojenize edilmiş ciğere terapatik, toksik ve potansiyel letal dozda morfin

ve amitriptilin katılmistir. Morfin ve amitriptilin içeren doku ile beslenen *Lucilia sericata* larvalarından morfin ve amitriptilin ekstrakte edilerek LC/MS-MS'de toksikolojik analizi yapılmıştır. Amitriptilin ve morfin tüm larva örneklerinde tespit edilmiştir. Bu bilgi, larvanın kalitatif toksikolojik analizde kullanilabileceğini göstermektedir. Larvada tespit edilen kantitatif konsantrasyonda amitriptilin ciğerdeki amitriptilin konsantrasyonu ile ilişkili olarak tespit edilmiştir. Morfin için geri kazanımlar tekrarlanabilir özellikte değildir. Fakat oluşturulan metod yardımı ile dokuda morfin kalitatif olarak tespit edilebilir.

6. Sonuç

Bu çalışmada; ölüm sonrası zamanda cesede ilk gelen sineklerden olan *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) sinek türüne ait *Lucilia sericata* larvaları (1., 2., 3. evre larvalar) toksikolojik analizlerde kullanılmak için güvenilir ortam (besiyeri) olarak seçilmiştir.

Çalışma sonucunda; Morfin standart çözeltileri kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği lineer çıkmasına rağmen larva matriksinin karmaşık ve yağlı olması nedeni ile larvada morfin ekstraksiyonu sonucu elde edilen geri kazanımların tekrarlanabilir olmadığı tespit edilmiştir. Bu sebeple; kantitatif analiz gerçekleştirilememiştir. Bunun nedenleri irdelendiğinde; larvanın aşırı yağlı bir matriks oluşturması ve ESİ koşullarında morfinde yeterli iyonlaşma sağlanamamasından dolayı bu sorunun ortaya çıkmasının mümkün olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte geri kazanım % 21 veya % 74 arasında değişse de morfinin larvada en azından kalitatif olarak tespit edilebildiği görülmüştür. Ancak metodun kantitatif olarak tekrarlanabilirliğinin olmaması validasyona engel teşkil etmiştir. Morfin çalışmaları sonrasında; amitriptilin maddesi için larvadan ve ciğerden bir ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

Aynı zamanda yapılan bu çalışmanın sonucunda; tavuk cesedine ait 117. saate kadar çürütülmüş ciğerde ve bu ciğer ile beslenen larvalarda toksikolojik analiz yöntemi geliştirilmiştir. Ayrıca bu çalışma; 117(±0.5) saatin sonunda çürümüş ciğer matriksinden ve bu ciğerden toplanan 117(±0.5) saatlik larvalardan, O. saatteki (çürüme başlamadan önce) ciğerde bulunan amitriptilin konsantrasyonunun hesaplanabilmesi için bir formül sunmaktadır..

Söz konusu çalışma, yeni bir alan olan adli entomotoksikoloji alanında literatürde gerçekleştirilen ilk birkaç çalışmadan biridir. 117. saatlik çürümüş ciğerde analiz yapıldığı takdirde, çürüme başlamadan önce ciğerde bulunan amitriptilin konsantrasyonunun bulunması

için bir faktör ve formül verilmiş olmakla birlikte, geliştirilen metod, farklı saatlerde toplanan ciğer ve larvalarla da tekrarlanarak bu faktörlerin nasıl değişeceği araştırılmalıdır.

'Adli bilimlerde *L.sericata* larvalarının entomotoksikolojik çalışmalarda kullanılması' başlıklı bu araştırmanın deney çalışmaları; İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi bünyesinde yer alan, TÜBİTAK Kamu Kurumları Araştırma ve Geliştirme Projelerini Destekleme Programı (KAMAG 1007 Programı) kapsamında kurulmuş olan Biyoterapi Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Bu laboratuarın daha önceden kurulmuş olması ve '*L.sericata* larvalarının zor iyileşen yaraların tedavisinde kullanımı' isimli Kamu Kurumları Araştırma ve Geliştirme Projesi için *L.sericata* sineklerinin sürekli yetiştirilmesinin sağlanması, bu araştırma konusunun daha rahat çalışılmasına olanak sağlamıştır. Çalışmada ortam olarak kullanılan *L.sericata* larvaları bu laboratuvarda yetiştirilmiş daha sonra -20 °C saklandıktan sonra toksikolojik analiz için İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü bünyesinde bulunan Toksikoloji laboratuvarına getirilip, LC-MS/MS cihazında analiz edilmiştir. Labaratuvar koşullarının iyi olması ve LC-MS/MS gibi teknolojisi yüksek cihazların olması, kimyasal maddelerin (morfin ve amitriptilin) yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan moleküller kütle dedektörü ile analiz edilmesini daha da kolaylaştırmış ve daha doğru sonuçlar almasını sağlamıştır. LC-MS/MS tekniği neredeyse babalık testi kadar özgün bir test olmasının yanısıra çok düşük konsantrasyonlarda maddenin miktar tayininin yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca sonuçlarının doğrulanmasına da gerek duyulmamaktadır. Bu çalışmada, toksikolojik analizlerin gerçekleştirildiği LC-MS/MS cihazının ve çalışmada uygulanan metodun validasyonu yapılmıştır (validasyon, bir cihazın, metodun veya ölçüm sisteminin belirlenen amaca uygun olduğunun test edilerek yazılı kayıtlarla onaylanmasıdır).

Aynı zamanda bu çalışmada bir canlı grubu ile çalışılmıştır. *L.sericata* sineği ve larvaları araştırmanın hedefine uygun olarak devamlı yetiştirilmiştir. Larvalar, morfin veya amitriptilin

katılarak hazırlanan ciğer ile beslenmişlerdir. Toksikolojik çalışmalara geçmeden önce *L.sericata* sineğinin fenolojisi ve tüm hayat döngüsü çalışılmıştır. Canlı ile çalışmak bu araştırma konusunun deneylerini yapmayı zorlaştırmış ve çalışma süresini uzatmıştır. Larva matriksinin karmaşık ve yağlı olması nedeni ile larvadan ekstraksiyon yapabilmek toksikolojik çalışmalarda bir metod geliştirmeyi daha da zorlaştırmıştır. İlk deneylerde larvadan morfin analiz edilmeye çalışılmıştır. Morfinin larvada kalitatif olarak tespit edilebildiği görülmüştür. Bununla birlikte geri kazanım % 21 veya % 74 arasında değişse de morfinin larvada en azından kalitatif olarak tespit edilebildiği görülmüştür. Ancak metodun kantitatif olarak tekrarlanabilirliğinin olmaması validasyona engel teşkil etmiştir. Yapılacak daha sonraki çalışmalarda, morfin için daha fazla ve daha farklı ekstraksiyon yöntemleri geliştirilirse yada ekstraksiyon yöntemlerine farklı basamaklar eklenirse morfinin larvada kalitatif ve kantitatif olarak tespit edilebileceği düşünülmektedir.

Entomoloji ve toksikoloji alanında, tez çalışmasının hedeflediği konuyu çözümleyen ve ispatlayan doğru yöntem oluşturulana kadar, çok fazla ön çalışma ve deney yapılmıştır. Ülkemizde, çalıştığımız bu konu ile ilgili çok fazla çalışma olmaması da bu araştırma konusunu çalışmayı zorlaştırmıştır. Sonuçta bu çalışma, larvadan amitriptilinin kantitatif ve kalitatif analizi için bir yöntem sunmaktadır. Yapılacak olan diğer entomotoksikolojik çalışmalarda; insanların ölümüne sebep olan zehirlenme vakalarında kullanılan diğer kimyasal maddelerin larvadan ekstraksiyon ve analiz yöntemleri geliştirilmelidir. Bu çalışmada; toksikolojik analiz için LC-MS/MS cihazı kullanılmıştır.

Aynı zamanda bu çalışmada; morfin veya amitriptilin katılmış ciğer ile beslenen *L.sericata* larvalarının büyüme evreleri çalışılmıştır. Yapılacak diğer çalışmalarda; larvaların besleneceği ciğere farklı kimyasal maddeler katılarak ve bu besinler ile larvalar beslenerek canlının büyüme evreleri çalışılabilinir ve bir kayıt oluşturulabilinir. Bu maddelerin larvaların büyüme evrelerine

etkileri ve oluşturdukları farklılıklar incelenebilinir. Bu bilgiler kayıt altına alınabilinir. Sonuç olarak; araştırmacılar ölüm sonrası zamanı doğruya en yakın şekilde tahmin edebilirler.

'Adli bilimlerde *L.sericata* larvalarının entomotoksikolojik çalışmalarda kullanılması' başlıklı doktora tez araştırmasında; zengin bir faunaya sahip olan ülkemizde, ortaya çıkan pek çok zehirlenme vakası sonucunda ölen kişilerin ölüm zamanı ve nedenlerini belirlemek için sinek larvalarından yararlanarak entomotoksikolojik bilgiler ile adalet sistemine ve yargıya hizmet edilebileceği sonucuna varılmıştır.

Larvaları toksikolojik analizlerde kullanarak yeni bir metot geliştirmek ve adli bilimlere farklı bir bakış açısı kazandırmak amacı ile yapılan bu entomotoksikolojik çalışma; öncü ve orijinal bir çalışmadır. Bu çalışma sonrasında, gerçek anlamda entomotoksikolojinin adli bilimlerde bir bilim dalı olarak gelişmeye başlaması, beklenmektedir. Adaletin sağlanması için başka delillerin yanında entomolojik ve entomotoksikolojik bulgularınında kullanılması daha kesin sonuçların elde edilmesini sağlayacaktır.

7. Kaynaklar

1- Mégnin P. La faune de cadavres. Application de l'entomologie a la médicine légale [The fauna of corpses. Use of entomology in legal medicine]. Encyclopedie scientifique des Aides - Mémoire, Masson, Paris, 1894; Gauthier-Villars.

2-Byrd JH, Castner JL. Forensic Entomology The Utility of Arthropods In Legal Investigations. Insects of Forensic Importance, Crc.Press. Newyork 2001; pp 43-79

3-Bourel B, Tournel G, Hédouin V, Deveaux M, Goff ML, Gosset D. Morphine extraction in necrophagus insects remains for determining ante-mortem opiate intoxication. J. Forensic Sci. Int. 2001; 120: 127-131.

4-Goff M.L, Lord W.D. Entomotoxicology: a new area for forensic investigation. Am. J. Forensic Med. Pathol. 19940p; 15: 51-57.

5-Pounder D.J. Forensic entomotoxicology. J. Forensic Sci. Soc. 1991; 31: 469-472.

6-Introna F, Campobasso C.P, Goff M.L. Entomotoxicology. J. Forensic Sci. 2001; 120: 42-47.

7-Introna Jr. F, Lo Dico C, Caplan Y.H, Smialek J.E. Opiate analysis of cadaveric blow fly larvae as an indicator of narcotic intoxication. J. Forensic Sci. 1990; 35: 118-122.

8-Aktay G, Açıkgöz N.H, Hancı İ.H. Adli Bilimlerde Yeni Bir Araştırma Alanı: Entomotoksikoloji Adli Bilimler Dergisi 2. 2003; 3: 25-31.

9-Kharbouche H, Ausburger M, Cherix D, Sporkert F, Giroud C, Wyss C, Champod C, Mangin P. Codeine accumulation and elimination in larvae, pupae, and imago of the blowfly *Lucilia sericata* and effects on its development. Int J Legal Med. 2007; 122: 205-211.

10-Kintz P, Godelar A, Tracqui A, Mangin P, Lugnier A.A, Chaumont A.J. Fly larvae: a new toxicological method of investigation in forensic medicine. J. Forensic Sci. 1990; 35: 204-207.

11-Gagliano-Candela R, Aventaggiato L. The detection of toxic substance in entomological specimens. Int. J. Legal Med. 2001; 114: 197/2003.

12-Clark K, Evans L, and Wall R. Growth rates of the blowfly, *Lucilia sericata*, on different body tissues. Forensic Science International. 2006; 156: 145-149.

13.Greenberg B. Nocturnal ovipasition behaviour of blow flies (Diptera: Calliphoridae).J Med Entomolo. 1990; 27: 807-810.

14. Benecke M. Forensic Entomology: The next step, Forensic science International 2001; 120: 1

15-Açıkgöz H.N. Adli Entomoloji. Türkiye Parazitoloji Dergisi 2010; 34 (3): 216-221.

16- Benecke M. A brief history of forensic entomology. Forensic Science International 2001; 120: 2-14

17- Anderson G.S. Determining of death using blow fly eggs in the early postmortem interval. Int J Legal Med. 2004; 118: 240-241.

18- Kulsretha P, Satpathy D.K. Use of beetles in forensic entomology, Forensic Science International 2001;120: 15-17.

19- Arnaldos M.I, Garcia M.D, Romera E, Presaa J.J, Luna A. Estimation of postmortem interval in real cases based on experimentally obtained entomological evidence. Forensic Science International 2005; 149: 57–65

20- Greenberg B, Kunich JC. Entomology and the law. Flies as forensic indicators. Cambridge University Press, Cambridge, 2002.

21- Goff M.L, Brown, W.A, Hewadikaram, M.S, Omori, A.L. Effects of heroin in decomposing tissues on the development rate of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on estimation of postmortem intervals using arthropod development patterns. J. Forensic Sci. 1991; 36: 537-542.

22- Aggarval A.D. Estimating The post-mortem interval with the help of entomological evidence. A thesis for M.D. Baba Farid University Of Health Sciences, Faridkot, 2005.

23-Resh HV, Carde RT. Encyclopedia of Insects. Forensic entomology. (Goff M.L.) pp. 437-442, Academic Press, Newyork, 2003.

24- Catts EP, Goff ML. Forensic entomology in criminal investigations. Annu. Rev. Entomol. 1992; 37: 253-272.

25- Hancı H, Duman EÇ. Adaletin gerçeklesmesinde böceklerin yeri var. Cumhuriyet Bilim Teknik Derg. 2000; 674: 18-20.

26-Karapazarlıoğlu E. Doğal ortamda domuz karkasları üzerine gelen arthropodaların ve süksesyonlarının belirlenmesi. (Yüksek Lisans Tezi) Samsun: On Dokuz Mayıs Üniversitesi, 2004.

27- Özdemir S. Ankara il'inde (merkez ilçe) leş üzerindeki Coleoptera faunasının belirlenmesi ve morfolojilerinin sistematik yönden incelenmesi. (Yüksek Lisans Tezi) Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2007.

28- Sharanowski BJ, Walker EG, Anderson GS. Insect succession and decomposition patterns on shaded and sunlit carrion in Saskatchewan in three different seasons. Forensic Science International. 2008; 179: 219–240.

29- Reiter C. On the Growing Behaviour of the Maggots of Blue Blowfly *Calliphora vicina.* Z Rechtsmed. 1984; 91: 295-308.

30- Beyer JC, Enos WF, Stajic M. Drug identification through analysis of maggots. J. Forensic Sci. 1980; 25: 411-412.

31-Bourel B, Hédouin V, Martin-Bouyer L, Bécart A, Tournel G, Deveaux M, Gosset D. Effects of morphine in decomposing bodies on the development of *Lucilia sericata* (Diptera:Calliphoridae). J. Forensic Sci. 1999; 44: 354-358.

32- Arnott S, Turner B. Post-feeding larval behavior in the blowfly, *Calliphora vicina*: Effects on post-mortem interval estimates. Forensic Science International. 2008; 177: 162-167.

33- Benecke M. Forensic entomology: Arthropods and corpses (Tsokos, M. ed.). Forensic Path Rev. Vol II. Humana Press, Totowa, 2004; pp 211-213.

34- Tüzün A, Yüksel S. Postmortem intervalin saptanmasında adli entomoloji. Türkiye Klinikleri, J Foren Med. 2007; 4: 23-32.

35- Savran B, Koç S, Çetin G, Kolusayın Ö. Adli entomoloji. Adli Tıp Derg. 1994; 10: 143-152.

36- Reinhard H. Beitrage zur Graberfauna (Contributions on the fauna of graves). Verh. k.&k. Zool.-Bot. Ges. Wien. 1882; 31: 207-210.

37-Amendt J, Krettek R. Forensic entomology. Naturwissenschaften. 2004; 91: 51-65.

38- The american board of forensic entomology, http://www.forensicentomologist.org/history.html (Son erişim tarihi: 25.01.2019).

39- Stamper TI. Improving the accuracy of postmortem interval estimations using carrion flies (Diptera: Sarcophagidae, Calliphoridae and Muscidae). University of Cincinnati, 2008.

40- Polat O, İnanıcı MA, Aksoy ME. Ölüm, Postmortem Değişiklikler. Adli Tıp Ders Kitabı. İstanbul, 1997.

41. Vas AA. Beyond the grave – understanding human decomposition. Microbiology Today. 2001; Vol 28/Nov01.

42- Gunn A. Essantial Forensic Biology. The Decay Process. Wiley, England 2006; pp.7-21.

43- Demirsoy A. Yasamın temel kuralları omurgasızlar/böcekler entomoloji. Cilt 2/Kısım 2, 6. baskı, Meteksan baskı, Ankara, 2003; s. 528-530.

44- Gennard DE. Forensic Entomology- An Introduction, Identifying flies that are important in forensic entomology. Wiley, England 2007; pp. 19-51.

45- Grassberger M, Reiter C. Effect of temperature on development of the forensically important holarctic blow fly *Protophormia terraenovae* (Diptera: Calliphoridae). Forensic Science International. 2002; 128: 177-182.

46- James, MJ. The flies that cause myiasis in man. Washington 1947; pp. 2-89.

47- Dodge HR. Domestic Flies: Pictural Key to Common Species in the U.S.

48- Christiansen JR, Tomberlin JK. Three dimensional polygonal model visualization of *Lucilia sericata* from SEM and streomicroscopic data. Proc. Amer. Acad. Foren. Sci. 2009; 15: 274.

49- Mumcuoğlu KY. Biotherapy laboratory protocol department of parasitology, Hebrew University-Hadassah Medical School Jerusalem, Israel, 2007.

50- Tedeschi LG, Eckert WG. Forensic Medicine: A Study In Trauma And Enviromental Hazards, Sacosaprophagous Insects as Forensic Indicators (Nuorteva P). 1977; pp. 1072-1095. WB Saunders Company, Philadaelphia.

51- Çalışır B. Tıbbi entomoloji teorik uygulamalı ders notları. İ.Ü. yayınları, 2002; ISBN 975-640-9

52- Aktaç N. Genel Entomoloji. Edirne, 2003.

53- Çetin ET. Tıbbi parazitoloji: Protozoonlar, helmintler, artropodlar. Sanal Matbaacılık, İstanbul, 1983; s. 377-413.

54- Erzinçlioglu YZ. *Blowflies*. The Richmond Publishing Co. 1996; pp.4- 6.

55- Haskell NH, Lord WD, Byrd JH. Collecton of entomological evidence during death investigations. CRC Press LLC. 2002; pp.81–120.

56- Ames C, Turner B. Low temperature episodes in development of blowflies: implications for postmortem interval estimation. Med Vet Entomol. 2003; 17: 178–186.

57-Hall RD, Huntington TE. Medicocriminal entomology. Haskell NH, Williams RE. eds. Entomology and death: AProcedural Guide. 2nd ed. Forensic Entomology Partners.

Clemson. SC, USA. 2008; pp.1–9.

58- Perotti M, Goff ML, Baker AS, Turner BD, Braig HR. Forensic acarology: an introduction. Exp Appl Acarol. 2009; 49: 3–13.

59- Goff ML. A Fly for the Prosecution: How Insect Evidence Helps Solve Crimes. Fourth printing. Harvard University Press. 2001; pp. 44-45, 15, 22.

60- Smith KGV. A Manual of Forensic Entomology. University Printing House. Oxford, 1986; 13-21.

61- Bilge Y. Adli Tıp. Ankara: Üçbilek Matbaası, 2005; 132–137.

62- Honda JY, Brundage A, Happy C, Kelly SC, Melinek J. New records of carrion feeding insects collected on human remains. Pan–Pacific Entomologist. 2008; 84(1): 29–32.

63-Byrd JH, Amorim JA, Ribeiro OB, Distinction among the puparia of three blowfly species (Diptera: Calliphoridae) frequently found on unburied corpses. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2001; 96(6): 781–784.

64- Carvalho Lucila ML, Palhares Fortunato AB, Linhares Arício X. Malignant tumor affects the developmental pattern of feeding larvae of *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) and *Chrysomya putoria* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae). Neotrop Entomol. [online]. 2007; 36(3): 478–481.

65- Campobasso CP, Linville JG, Wells JD, Introna F. Forensic genetic analysis of insect gut contents. Am J Forensic Med Pathol. 2005; 26(2): 161–165.

66- Benecke M, Wells, (2000) DNA techniques for forensic entomology. New York, Washington DC, USA. CRC, 2000; 341–352.

67- Atasoy S, Cengiz M. Adli ve Biyokimyasal Toksikoloji Ders notları, İstanbul.

68- Levine RR. Pharmacology, Drug actions and reactions, Fourth edition, Little Brown Company, Boston Toronto London, 1990.

69- Weiinig E, Schmidt G. Die Identifizierung der Bernsteinsaure bei der toxicologischennn Analyse. Pamieri- Festschrift. Neapel: Idelson, 1961

70-Skopp G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. Forensic Science International 2004; 142: 75–100

71-Greenberg B, Kunich JC. Entomology and the law. Flies as forensic indicators. Cambridge University Press, Cambridge, 2002.

72-Catts EP, Goff M. Forensic entomology in criminal investigations. Annu. Rev. Entomol 1992; 37: 253-272.

73-Utsumi K. Studies on arthropods congregating to animal carcasses, with regard to the estimation of postmortem interval. Ochanomizu Med. J. 1958; 7: 202-223.

74-Sohal RS, Lamb RE. Intracellular deposition of metals in the midgut of the adult housefly, Musca domestica. J. Insect. Physiol 1977; 23: 1349-1354.

75-Nuorteva P, Nuorteva SL. The fate of mercury in Sarcosaprophagous flies and in insects eating them. Ambio, 1982; 11: 34-37.

76-Goff M, Miller ML, Paulson JD, Lord WD, Richards E, Omori AI. Effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine in decomposing tissues on the development of *Parasarcophoga ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae) and detection of the drug in postmortem blood, liver tissue, larvae and puparia. J. Forensic Sci. 1997; 42: 276-280.

77-Carvalho ML, Linhares AX, Trigo JR. Determination of drug levels and the effect of diazepam on tje growth of necrophagous flies of forensic importance in southeastern Brazil. J. Forensic Sci. 2001; 120: 140-144.

78-Kintz P, Tracqui A, Mangin P. Analysis of opiates in fly larvae sampled on a putrefied cadaver. J. Forensic Sci. Soc. 1994; 34: 95-97.

79- Bourel B, Fleurisse L, Hédouin V, Cailliez JC, Creusy C, Gosset D, Goff ML. Immunohistochemical contribution to the study of morphine metabolism in calliphoridae larvae and implications in forensic entomotoxicology. J. Forensic Sci. 2001; 46 (3): 596-599.

80- Nolte KB, Pinder RD, Lord WD. Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body. J. Forensic Sci. 1992; 37: 1179-1185.

81- Bourel B, Tournel G V, Hédouin V, Goff M L, Gosset D. Determination of drug levels in two species of necrophagous Coleoptera reared on substrates containing morphine. J. Forensic Sci. 2001; 46: 600–603.

82- The Scientist. Mar. 17, 1997;11(6): 23.

83- Miller ML, Lord WD, Goff ML, Donnelly B, McDonough ET, Alexis JC. Isolation of amitriptyline and nortriptyline from fly puparia (Phoridae) and beetle exuviae (Dermestidae) associated with mummified human remains. J. Forensic Sci. 1994; 39: 1305-1313.

84- Gunatilake K, Goff ML. Detection of organophosphate poisoning in a putrefying body by analyzing arthropod larvae. J. Forensic Sci. 1989; 34: 714-716.

85- Pounder DJ. Forensic entomotoxicology. J. Forensic Sci. Soc. 1991; 31: 469-472.

86- Hédouin V, Bourel B, Martin-Bouyer L, Bécart A, Tournel G, Deveaux M, Gosset D. Determination of drug levels in larvae of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphorideae) reared on rabbit carcasses containing morphine. J. Forensic Sci. 1999; 44 (2): 351-353.

87- Hall M. www.fathom.com/feture/122347, Eylül 2002.

88- Linnea DD. Effects of amitriptyline and nortriptyline on time of death estimations in the later postmortem interval using insect development. (Master tezi), University of Northern British Columbia: Columbia, 2002.

89-Goff ML, Brown WA, Omori AI. Preliminary observations of the effect of methamphetamine in decomposing tissues on the development rate of *Parasarcophoga*

ruficornis (Diptera: Sarcophagidae) and implications of this effect on estimations of postmortem intervals. J. Forensic Sci. 1992; 37: 867-872.

90-Goff ML, Omori AI, Goodbrod JR. Effect of cocaine in tissues on the rate of development of *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae). J. Med. Entomol. 1989; 26: 91-93.

91-Mills J. The History of Forensic Toxicology-Myths, Legends and Reality. (2002) http://wwwscience.murdoch.edu.au/teaching/m235/forensictox.htm

92-Wood M, Laloup M, Pien K. Development of a rapid and sensitive method for the quantitation of benzodiazepines in *Calliphora vicina* larvae and puparia by LC-MS/MS. J Anal Toxicol. 2003; 27: 505- 513.

93-Yarema MC, Becker CE. Key Concepts in Postmortem Drug Redistribution, Clinical Toxicology. 2005; 43: 235–241.

94- Drummer OH. Postmortem toxicology of drugs of abuse. Forensic Science International. 2004; 142: 101–113.

95- Skopp G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology, Forensic Science International. 2004; 142: 75–10.

96- Moffat Anthony C, Osselton M David. Widdop Brian. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons**.** 3rd Ed., Pharmaceutical Press, London, 2004.

97- Leck KJ, Bartlett SE, Smith MT, Megirian D, Holgate J, Powell L, Matthaei KI, Hendry IA. Deletion of guanine nucleotide binding protein az subunit in mice induces a gene dose dependent tolerance to morphine. Neuropharmacology. 2004; 46: 836–846.

98- Wymann J, Bultman S. Postmortem distribution of heroin metabolites in femoral blood, liver, cerebrospinal fluid, and vitreous humor. Journal of analytical toxicology. 2004; 28: 260-263.

99- Poklis A,et al.Forens. Sci. Int. 1995; 761: 55–59

100- Westerling D, et al. Acta Anaesthesiol. Scand. 1998; 42: 586–589

101- Vermeire A,¨ Remon JP. The solubility of morphine and the stability of concentrated morphine solutions in glass, polypropylene syringes and PVC containers. 1997; 146: 213-223 (24 ref.)

102- https://www.tiplopedi.com/Morfin (Son erişim 25.01.2019)

103- Bailey DN, and Shaw RF. Interpretation of Blood and Tissue Concentrations in Fatal Self-Ingested Overdose Involving Amitriptyline. J. Anal. Toxicol. 1980; 4: 232–236.

104-Pounder DJ, Owen V, and Quigley C. Post-mortem changes in blood amitriptyline concentration. Am. J. Forensic Med. Pathol. 1994; 15*3:* 224–230

105- Kerrigan S, Chapter 13 Sampling, storage and stability, in: Negrusz A, Cooper G(Eds.), Clarke's Analytical Forensic Toxicology, second edition, Pharmaceutical Pres, London, 2013.

106- Basics of LC/MS Primer Agilent Technologies. U.S.A., 2001.

107- Sadler DW, Richardson J, Haigh S, Bruce G, Pounder D J. Amitriptyline Accumulation and Elimination in *Calliphora vicina* Larvae, The American Journal of Forensic Medicine and Pathology. 1997; 18(4): 397-403.

108- Gosselin M, Sarah MR. Wille SMR, Fernandez MRM, Fazio VD, Samyn N, Gert De Boeck G, Bourel B. Entomotoxicology, experimental set-up and interpretation for forensic Toxicologists. Forensic Science International. 2011; 208: 1–9.

109- Gagliano- Candela R, Aventaggiato L. The detection of toxic substances in entomological specimens. Int. J. Legal Med. 2001; 114: 197-203.

110- Pien K, Laloup M, Marichal M, Gropotaert P, Boeck G, Samyn N, Boonen, Vits K, wood M. Toxicological data and growth characteristics of single post-feeding larvae and puparia of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study. Int. Journal of Legal Medicine. 2004; 10.1007: 00414-004-00441-8.

111- O'Brien C, Turner B. Impact of paracetamol on *Calliphora vicina* larval development. Int. Journal of Leg. Med. 2004; 10.1007: 00414-004-0440-9.

112- Campobasso CP, Gherardi M, Caligara M, Sironi L, Introna F. Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comperative study. Int. J. Legal Med. 2004; 118.

113- Grellner W, Glenewinkel F. Exhumations: synopsis of morphological and toxicological findings in relation to the post mortem interval. Survey of a 20-year period and review of the literature. Forensic Science International. 1997; 90: 139-159.

114- Lamia M, Zeinab A, Hassan M. Effect of Tramadol on the Development of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) and detection of the drug concentration in postmortem rabbit tissues and Larvae. J. Entomol. 2011; 8: 353-64.

115- Bushby SK, Thomas N, Priemel PA, Coulter CV, Rades T, Kieser JA. Determination of methylphenidate in Calliphorid larvae by liquid–liquid extraction and liquid chromatography mass spectrometry–Forensic entomotoxicology using an in vivo rat brain model. J. Pharm. Biomed. Analysis. 2012; 70: 456-461.

116-Mai M, Amendt J. Effect of different post-feeding intervals on the total time of development of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). Forensic Science International. 2012; 221(1-3): 65-69.

117- Moore HE, Adam CD, Drijfhout FP. Potential use of hydrocarbons for aging *Lucilia sericata* blowfly larvae to establish the postmortem interval. J Forensic Sci. 2013; 58(2): 404-12. doi: 10.1111/1556-4029.

118- Magni PA, Pacini T, Pazzi M, Vincenti M, Dadour IR. Development of a GC–MS method for methamphetamine detection in *Calliphora vomitoria* L. (Diptera: Calliphoridae), Forensic Sci. Int. 2014; 241: 96–101.

119- De Aguiar JF, Brandao M, Sodré FF, Caldas ED. Simultaneous determination of prescription drugs, cocaine, aldicarb and metabolites in larvae from decomposed corpses by LC–MS–MS after solid–liquid extraction with low temperature partitioning. Forensic Toxicol. 2015; 33: 93-103.

120- Lawai V, Abdul Rahim NA, Ngaini Z. Blowfly Larval Tissues as a Secondary Detector for Determining Paraquat-Related Death in Rabbit Carcass. J. Forensic Sci.2015; 60(6): 1620-4. doi: 10.1111/1556 - 4029.12852.

121- Sankhla MS, Sharma K, Kumar R. Future Trends in Forensic Entamotoxicology. International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology. 2017; 6: (4) DOI:10.15680/IJIRSET

122- Tahouni İF, Abouzied EM. The effect of the tramadol accumulation in rat liver on the development of the immature stages of the flesh fly *Sarcophaga argyrostoma* (Robineau-Desvoidy, 1830) (Diptera: Sarcophagidae). Journal of the Egyptian Society of Parasitology. 2017; 47(1) : 55- 64.

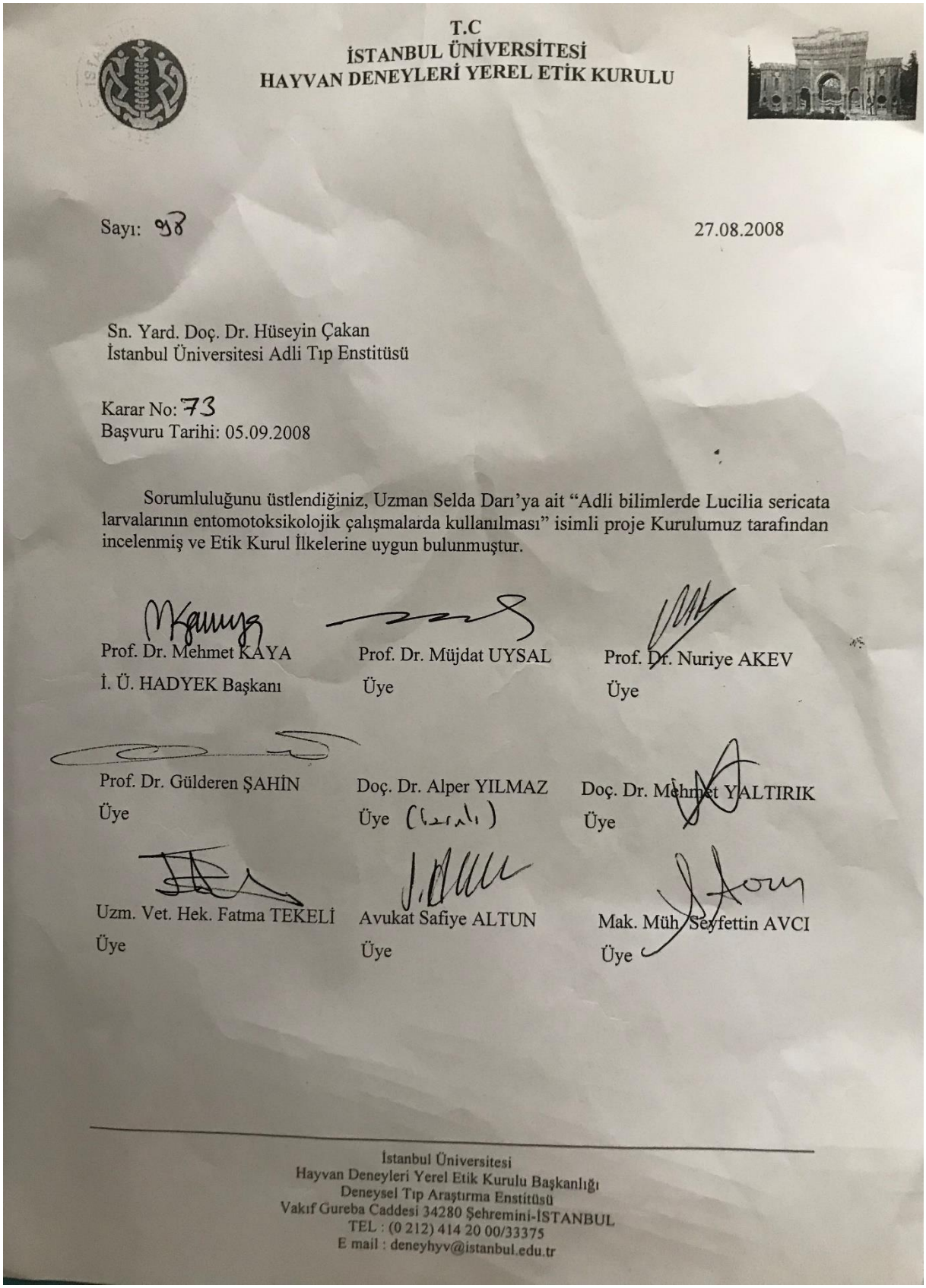
123- Mohamad A. Fouda Alaa G. Al- Dali, Kotb M. Hammad, Mahmoud M. Abdrabou, Mohamad M. Kabadaia. Detection and effect of ephedrine sulphate on the development rate of the forensic blow fly larvae *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae) colonize a dog carcass. Int. J. Adv. Res. Biol. Sci. 2017; 4(11): 118-126.

124- Özdemir E, İnak E. Adli entomolojide DNA ve entomotoksikoloji. Adli Bilimler Dergisi. 2018; 17 (4): 37 – 43.

125- De Carvalho LML, Linhares A X, Palhares FAB. The effect of cocaine on the development rate of immatures and adults of *Chrysomya albiceps* and *Chrysomya putoria* (Diptera: Calliphoridae) and its importance to postmortem interval estimate. Forensic Science International. 2012; 220: 27–32.

Ekler

Ek-1: Deneysel Hayvanlar Etik Kurulu Onay Raporu



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Sayı: 98 27.08.2008

Sn. Yard. Doç. Dr. Hüseyin Çakan
İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü

Karar No: 73
Başvuru Tarihi: 05.09.2008

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Uzman Selda Darı'ya ait "Adli bilimlerde Lucilia sericata larvalarının entomotoksikolojik çalışmalarda kullanılması" isimli proje Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Mehmet KAYA — İ. Ü. HADYEK Başkanı
Prof. Dr. Müjdat UYSAL — Üye
Prof. Dr. Nuriye AKEV — Üye
Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN — Üye
Doç. Dr. Alper YILMAZ — Üye
Doç. Dr. Mehmet YALTIRIK — Üye
Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ — Üye
Avukat Safiye ALTUN — Üye
Mak. Müh. Seyfettin AVCI — Üye

İstanbul Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Vakıf Gureba Caddesi 34280 Şehremini-İSTANBUL
TEL : (0 212) 414 20 00/33375
E mail : deneyhyv@istanbul.edu.tr

Ek-2: Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Proje Özet Raporu

T.C.İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

PROJE ÖZET RAPORU

Proje Yürütücüsü	Doç.Dr. Hüseyin ÇAKAN		
Proje Kodu	2688		
Proje Başlığı	Adli bilimlerde Lucilia sericata larvalarının entomotoksikolojik çalışmalarda kullanılması.		
Proje Türü	Doktora Tez		
Proje Grubu	Tıp Sağlık		
Süresi (Ay)	12		
Proje Durumu	Kapanmış		
Başvuru Tarihi	24.6.2008	Muhtemel Bitiş Tarihi	23.07.2009
Başlangıç Tarihi	23.7.2008	Bitiş Tarihi	2.12.2011
Ek Süre 1 (Ay)		Ek Süre 2 (Ay)	
Onaylanan Bütçesi	10.676,37 ₺		
Ek Ödenek 1	0,00 ₺		
Ek Ödenek 2	0,00 ₺		
Ek Ödenek 3	0,00 ₺		
Toplam Bütçe	10.676,37 ₺	Gerçekleşen Harcama	8.469,20 ₺

Özgeçmiş

Selda Darı

Uyruğu: T.C. Doğum Yeri: Besni/ADIYAMAN

E-mail: seldadari@gmail.com Adres: Gaziantep / TÜRKİYE

EĞİTİM

Doktora	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ, Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri ABD.
Yüksek Lisans	GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ, Fen Bilimleri ABD, Biyoloji Bölümü 2002-2004
Lisans	OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü 1998-2002
Orta ve Lise	Gaziantep F.N.T. Anadolu Lisesi 1990-1997