T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Selda MERCAN

Lucilia sericata LARVALARINDA ICP-MS İLE ARSENİK VE KADMİYUM ANALİZİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Çağdaş ADIÖREN

İSTANBUL, 2020

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Selda MERCAN

Lucilia sericata LARVALARINDA ICP-MS İLE ARSENİK VE KADMİYUM ANALİZİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Çağdaş ADIÖREN

İSTANBUL, 2020

Bu tez projesi İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: **34507**).

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimleriyle desteklerini eksik etmeyen saygıdeğer hocalarım ***Prof. Dr. Faruk Aşıcıoğlu***, ***Prof. Dr. Münevver Açıkkol***, ***Dr. Öğr. Üyesi Selda Mercan***, ***Dr. Öğr. Üyesi Zeynep Türkmen, Doç. Dr. Erdal Polat***, ***Doç. Dr. Hüseyin Çakan***, ***Prof. Dr. Bülent Üner***, ***Doç. Dr. Emel Hülya Yükseloğlu ve Doç. Dr. Gönül Filoğlu Tüfek***'e,

Her koşulda zorlukları ve engelleri aşmama yardımcı olan, bilgi birikimi ile bir hoca; güler yüzü ve pozitifliği ile bir arkadaş olan, danışman hocam ve mentorum ***Dr. Öğr. Üyesi Selda Mercan***'a,

İstanbul'a geldiğimden beri ayakta durmam için elinden gelen tüm çabayı sarfeden, bilgisiyle bana her daim yardımcı olan ***Doç. Dr. Erdal Polat****'a*,

Çalışmalarım boyunca her türlü yardım ve manevi desteklerini hissettiğim dönem arkadaşım ***Sümeyye Zülal Şimşek***'e**,** Adli Toksikoloji Laboratuvarı ekibi ***Ar.Gör. Merve Kuloğlu Genç***, ***Kim. Tuğba Tekin Bülbül*** ve ***Bio. Murat Yayla***'ya, ***Hemşire Hülya Ağgez****'e*,

Her türlü yardım ve manevi desteklerini hissettiğim arkadaşlarım ***Nami Ege Perk, Mert Can Öziçirici, Cankut Karabulut*** ve ***Hüseyin Yiğit Şahin***'e,

Tez çalışmam boyunca manevi desteklerinden dolayı ***Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü'nün idari personeline***,

Ve bugünlere gelmemi sağlayan, uzakta olsalar dahi kendilerini hep yanımda hissettiğim ***Annem***, ***Babam*** ve tüm ***Aileme*** teşekkürü bir borç bilirim.

Çağdaş Adıören

İstanbul, Ağustos 2020

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ v

TABLOLAR DİZİNİ vii

KISALTMALAR DİZİNİ viii

ÖZET x

SUMMARY xii

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Adli Entomoloji 3

2.2. Adli Entomolojinin Tarihçesi 5

2.3. Adli Entomolojide Yararlanılan Böcekler ve Bozunma Süreci 8

2.3.1. Adli Entomolojide Yararlanılan Böcekler 8

2.3.1.1. Ordo: Diptera 8

2.3.1.2. Ordo: Coleoptera 8

2.3.1.3. Ordo: Dermaptera 9

2.3.1.4. Ordo: Hemiptera 9

2.3.1.5. Ordo: Hymenoptera 9

2.3.1.6. Ordo: Lepidoptera 9

2.3.1.7. Ordo: Blattodea 10

2.3.2. Bozunma Süreçleri 12

2.4. Lucilia sericata 15

2.5. Adli Entomotoksikoloji 22

2.6. Çalışmada Araştırılan İnorganik Elementler 24

2.6.1. Arsenik 24

2.6.2. Kadmiyum 27

2.7. ICP-MS ve Çalışma Prensibi 30

3. GEREÇ VE YÖNTEM 32

3.1. Kullanılan Ekipmanlar 32

3.2. Kullanılan Kimyasallar 33

3.3. ICP-MS Sistemi Analiz Parametreleri 34

3.4. Validasyon Çalışmaları 36

3.4.1. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi 36

3.4.2. Tespit Limiti (LOD), Tayin Limiti (LOQ) Çalışmaları 37

3.4.3. Geri Kazanım ve Tekrar Edilebilirlik 37

3.5. Çalışma Basamakları 38

3.5.1. Yumurta Taşıma Prosedürü 38

3.5.2. Besiyerinin Hazırlanması 38

3.5.3. Besiyerinin Dökülmesi, Yumurta Sayımı ve Yumurtaların Besiyerine Ekimi 39

3.2.4. İnkübasyon 42

3.2.5. Larvaların Toplanması, Ölçümü ve Tartımı 42

3.2.6. Örneklerin Analize Hazırlanması 46

3.2.7. Sonuç Hesaplama Yöntemi 47

4. BULGULAR 49

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 67

6. KAYNAKLAR 74

ÖZGEÇMİŞ 87

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 : İnsan Vücudu Diyagramı- Hsi Yüan Lu 5

Şekil 2 : *Piophila casei* (Linnaeus) 10

Şekil 3 : *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) 11

Şekil 4 : *Lucilia sericata* (Meigen) 11

Şekil 5 : *Dermestes ater* (DeGeer) 12

Şekil 6 : *Creophilus maxillosus* (Linnaeus) 12

Şekil 7 : Livor mortis 13

Şekil 8 : Rigor mortis 14

Şekil 9 : *Lucilia sericata*'nın taksonomik yeri 16

Şekil 10 : *Lucilia* sericata'nın yaşam döngüsü 17

Şekil 11 : *Lucilia sericata* yumurtaları (Stereo mikroskop altında, 10x büyütmede) 18

Şekil 12 : *Lucilia sericata*'nın 3. evre larvası (Stereo mikroskop altında, 4x büyütmede) 19

Şekil 13 : *Lucilia sericata* pupaları 20

Şekil 14 : *Lucilia sericata* 3. larval dönem solunum yarıkları (Stereo mikroskop altında, 4x büyütmede) 21

Şekil 15 : *Lucilia sericata* 3. larval dönem solunum yarıkları (Stereo mikroskop altında, 10x büyütmede enine kesit) 22

Şekil 16 : Sarı arsenik 24

Şekil 17: Kadmiyum 28

Şekil 18: ICP-MS sisteminin görüntüsü 30

Şekil 19 : ICP-MS şematik görünümü 31

Şekil 20 : Yumurta ekimi yapılmış besiyeri 41

Şekil 21 : İnkübasyona hazır petri kutusu 42

Şekil 22: Besiyerindeki 3. evre larvalar 43

Şekil 23 : Larvaların alınmasından sonraki besiyeri görünümü 43
Şekil 24 : Besiyerinden tüplere alınan larvalar 44
Şekil 25 : Kumpas ile larvaların boy ölçümü 44
Şekil 26 : Larvaların hassas terazideki tartımı 45
Şekil 27 : Yaş yakma için hazır hale gelmiş örnekler 46
Şekil 28 : 15 mL'lik falkona aktarılan 1 mL numune 47
Şekil 29: Arseniğin kalibrasyon çözeltisi ile yapılan kalibrasyon eğrisi 50
Şekil 30 : Kadmiyumun kalibrasyon çözeltisi ile yapılan kalibrasyon eğrisi 50
Şekil 31 : Arseniğin larva matriksi ile yapılan kalibrasyon eğrisi 51
Şekil 32 : Kadmiyumun larva matriksi ile yapılan kalibrasyon eğrisi 51
Şekil 33 : Arseniğin farklı konsantrasyonlarına ait gün içi tekrar edilebilirlik analiz sonuçları 52
Şekil 34 : Kadmiyumun farklı konsantrasyonlarına ait gün içi tekrar edilebilirlik analiz sonuçları 54
Şekil 35 : Arseniğin farklı konsantrasyonlarına ait günler arası tekrar edilebilirlik analiz sonuçları 56
Şekil 36 : Kadmiyumun farklı konsantrasyonlarına ait günler arası tekrar edilebilirlik analiz sonuçları 57
Şekil 37: Madde konsantrasyonuna bağlı ortalama larva uzunluğu 60
Şekil 38 : Madde konsantrasyonuna bağlı yumurta sağkalım oranları 61
Şekil 39: Besiyerindeki As konsantrasyonuna göre elde edilen larva konsantrasyonlarının grafiği 64
Şekil 40 : Besiyerindeki Cd konsantrasyonuna göre elde edilen larva konsantrasyonlarının grafiği 66

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo I : Çalışmada kullanılan ekipmanlar ve sarf malzemeler 32

Tablo II : Çalışmada kullanılan kimyasallar 34

Tablo III : ICP-MS sistemi analiz parametreleri 35

Tablo IV : Matriks içermeyen kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması 36

Tablo V : Larva matriksi ile oluşturulan kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması 37

Tablo VI: Besiyerine eklenen As ve Cd hacimleri 40

Tablo VII : Ham verilerin hesaplanması 48

Tablo VIII: Arseniğin farklı konsantrasyonlarına ait gün içi tekrar edilebilirlik, ORT, STD, %RSD ve %GK değerleri 53

Tablo IX: Kadmiyumun farklı konsantrasyonlarına ait gün içi tekrar edilebilirlik, ORT, STD, %RSD ve %GK değerleri 55

Tablo X: Arseniğin farklı konsantrasyonlarına ait günler arası tekrar edilebilirlik, ORT, STD, %RSD ve %GK değerleri 56

Tablo XI: Kadmiyumun farklı konsantrasyonlarına ait günler arası tekrar edilebilirlik, ORT, STD, %RSD ve %GK değerleri 58

Tablo XII : Konsantrasyona bağlı ortalama larva uzunluğu 59

Tablo XIII : Blank örneklerinde bulunan As ve Cd değerleri 62

Tablo XIV: Arsenik analizlerinde elde edilen nihai sonuçlar 63

Tablo XV : Kadmiyum analizlerinden elde edilen nihai sonuçlar 65

KISALTMALAR DİZİNİ

As : Arsenik

ASAA : Ateşli Silah Atış Artığı

As_2O_3 : Arsenik Trioksit

As_2O_3 : Arsenik Pentoksit

$AsCl_3$: Arsenik Triklorür

As^{III} : +3 yüklü Arsenik

As^{v} : +5 yüklü Arsenik

Ba : Baryum

Cd : Kadmiyum

Çöz. : Çözelti

dk. : Dakika

DMA : Dimetilarsinat

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

g : Gram

Ga : Galyum

GK : Geri Kazanım

HF : Hidroflorik Asit

HNO_3 : Nitrik Asit

H_2O_2 : Hidrojen Peroksit

H_3AsO_4 : Arsenik Asit

ICP-MS : İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer)

In : İndiyum

Kal. : Kalibrasyon

kg : Kilogram

Kons. : Konsantrasyon

L : Litre

LOD : Tespit Limiti (Limit of Detection)

LOQ : Tayin Limiti (Limit of Quantitation)

mg : Miligram

mm : Milimetre

m^3 : Metreküp

$NaAsO_2$: Sodyum Arsenit

ng : Nanogram

ORT : Ortalama

Pb : Kurşun

PMI : Ölüm sonrası geçen zaman (Post-Mortem Interval)

ppb : Milyarda bir (Parts-Per Billion)

ppm : Milyonda bir (Parts-Per Million)

RSD : Bağıl Standart Sapma (Relative Standard Deviation)

S : Kükürt

Sb : Antimon

sp. : Tür/Türler (species)

STD : Standart Sapma (Standard Deviation)

Tl : Talyum

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

µg : Mikrogram

4x : 4 defa

10x : 10 defa

ÖZET

Adli entomoloji, cesetlere gelen böceklerin ve bu türlerin gelişim aşamalarının incelendiği böcek biyolojisi çalışmalarına verilen genel addır.

Bir cesedin çürüme evresiyle bağlantılı olarak, adli laboratuvarlar her zaman toksikolojik analiz yapacak materyali elde edemeyebilirler. Bu gibi durumlarda kullanılan adli entomotoksikoloji bilimi; kan, idrar veya iç organlar gibi geleneksel matrislerin mevcut olmadığı durumlarda alternatif toksikolojik örnekler olarak böceklerin yararlılığını araştırmaktadır.

Literatürde, Diptera (Çift Kanatlılar) takımının Calliphoridae (Göksinekler) ailesine ait olan türler, çürüme sırasında oluşan gazların kokusuyla ceset üzerinde ilk kolonize olan böceklerdir. Cesede erken gelmeleri ve büyük miktarlarda kolonileşmeleri ile adli entomoloji açısından oldukça önemlidirler. Araştırmada Calliphoridae familyasına ait *Lucilia sericata* (Meigen) türü sineğin larvaları kullanılmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda Calliphoridae ve Sarcophagidae ailelerine ait çeşitli böcek türlerinde alkoller, antidepresan ilaçlar, barbitüratlar, benzodiazepinler, opiatlar ve türevleri, pestisitler ve inorganik elementler çalışılmıştır. Bu inorganik elementler arasında en sık ateşli silah atış artığı belirteci olan antimon, baryum ve kurşun ile yapılan çalışmalara ağırlık verilmiş ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak ateşli silah atış artığı dışında larvada inorganik elementler ile yapılan bir araştırmaya bilgimiz dahilinde rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, arsenik (As) ve kadmiyum (Cd) elementleriyle kirletilmiş karaciğer dokusunda beslenen *Lucilia sericata* türü sinek larvalarının içerdiği As ve Cd konsantrasyonlarının tespit edilmesi için bir analiz yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Kontrol grubu larvaları (kontamine olmamış karaciğer ile beslenen) ile inorganik elemente

maruz bırakılan larvalar gelişim ve inorganik element konsantrasyonu yönünden karşılaştırılmıştır. Larvalar inorganik analiz için çekitleme işlemine tabi tutulmuş hem çalışma hem kontrol grubu larvalarının inorganik element konsantrasyonunu tayin etmek için İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi (ICP-MS) kullanılmıştır. Kantitatif analizler için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş; analize hazır hale getirilen larvalar ICP-MS ile analiz edilmiştir.

Blank larvalarının boy ortalaması (ORT) 1,145 cm bulunmuş olup; As ve Cd'un tüm farklı konsantrasyonlarında gelişen larvaların bu ortalamadan anlamlı bir şekilde düşük olduğu, As ve Cd konsantrasyonun artmasının larva boyutları üzerine negatif etkisi tespit edilmiştir. Geliştirilen kantitatif analiz yönteminde, As ve Cd için korelasyon katsayılarının >0,999, doğrusal aralığın 0,1-100 ng/mL, LOQ değerinin ise sırasıyla 0,08 ve 0,01 ng/mL olduğu bulunmuştur. Arsenik için yüzde geri kazanım oranları %94,33-107,38, Cd için ise %97,98-108,16 bulunmuştur. Tekrar edilebilirlik çalışmalarından elde edilen sonuçlar (%RSD) As için ≤8,51 iken Cd için ≤10,36'dır. As ve Cd için larva çıkışı gözlenen en yüksek besiyeri kosantrasyonları sırasıyla 5 µg/mL ile 15 µg/mL bulunup, bu konsantrasyonlarda gözlenen ortalama As ve Cd değerleri sırasıyla 1,533 µg/g ve 15,206 µg/g tespit edilmiştir. En düşük besiyeri konsantrasyonları ise her iki analit için de 0,5 µg/mL'dir ve elde edilen As ve Cd değerleri sırasıyla 0,603 µg/g ve 1,276 µg/g'dır.

Yapılan bu çalışma sayesinde larvadaki As ve Cd için ICP-MS sistemi ile güvenilir bir yöntem geliştirilmiştir. Bu sayede çalışmanın, larvanın beslendiği dokudaki madde konsantrasyonu hakkında güçlü bir veri sağlayacağı ve adli entomotoksikolojik araştırmalarda yerini alarak yargı ve adalet sistemine hizmet edeceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Adli Entomotoksikoloji, *Lucilia sericata*, Larva, Arsenik, Kadmiyum, ICP-MS

SUMMARY

Forensic entomology, is the general name given to insect biology studies, examines insect invasion into cadavers and the development stages of species.

In connection with the decay stage, forensic laboratories are not always able to obtain proper biological material for toxicological analysis. The science of entomotoxicology used in such cases; explores the usefulness of insects as alternative toxicological samples in the case of traditional matrices such as blood, urine or internal organs are not available.

In the literature, species belonging to the Calliphoridae family of Diptera are the first insects colonizing on the corpse with the smell of gases formed during decay. They are very important in forensic entomology with their early arrival in the body and colonization in large quantities. In this study, larvae of *Lucilia sericata* (Meigen) species were used which belong to the Calliphoridae family.

In previous studies, alcohols, antidepressant drugs, barbiturates, benzodiazepines, opiates and derivatives, pesticides, and inorganic elements were studied in various insect species belonging to the Calliphoridae and Sarcophagidae families. Among these inorganic elements, studies with antimony, barium and lead, which are the most common gunshot residues, have been focused and significant results have been obtained. However, according to our knowledge, there are no further studies conducted with inorganic elements except gunshot residues in larvae.

In this study, it was aimed to develop an analysis method for the determination of arsenic (As) and cadmium (Cd) concentrations in larvae of *Lucilia sericata* species that were fed on the liver tissue contaminated with As and Cd elements. Control group larvae (feeding on uncontaminated liver) and the larvae exposed to the inorganic element were compared in terms of developmental state and elemental concentrations. Larvae samples were extracted for

inorganic analysis, and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) system was used to determine the inorganic element concentration of both study and control groups. Calibration curve was generated for quantitative analysis; prepared larvae samples were analyzed by ICP-MS.

The mean length of blank larvae samples were found 1,145 cm, mean lengths of larvae grown in As and Cd spiked media were significantly lower. A negative effect was detected on the length of larvae grown in increasing element concentrations. In the developed quantitative analysis method, correlation coefficients of As and Cd was >0,999, linear range was between 0,1-100 ng/mL for both, and LOQ values were found 0,08 and 0,01 ng/mL, respectively. Recovery results were found 94,33-107,38% for As and 97,98-108,16% for Cd. Repeatability results (RSD%) were ≤8,51 for As, ≤10,36 for Cd. 5 µg/mL and 15 µg/mL were determined as max. elemental concentrations in liver media for As and Cd respectively which a larvae grown in. Mean As and Cd concentrations of larvae fed on these contamination levels were 1,533 µg/g and 15,206 µg/g respectively. 0,5 µg/mL was determined as min. elemental concentration in liver media, As and Cd concentrations of larvae fed on this contamination level were found as 0,603 µg/g and 1,276 µg/g respectively.

A reliable ICP-MS method was developed to determine As and Cd in larvae samples by means of this study. Thus, powerful data about the media of larvae in a real case could be provided and the study could be in placed for forensic entomotoxicological investigations to serve for the judiciary and justice system.

Keywords: Forensic Entomology, Entomotoxicology, *Lucilia sericata*, Larvae, Arsenic, Cadmium, ICP-MS

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan veya hayvan cesetleri, bu cesetlerin çürüme süreçleri, ceset veya ceset parçaları üzerinde üreyen sinekler ve/veya bunların larvaları insanlar tarafından hep farkedilmiş ve ilgilenilmiş konulardır.

Adli bir olayın aydınlatılmasında ceset en önemli delil olmasına karşın, bir suçun aydınlatılması için her zaman yeterli bilgiyi vermeyebilir. Cesedin ne zaman ve nerede öldüğü, ölen kişinin ölmeden önce kullandığı ya da kullanmaya zorlandığı maddeler ile ilgili sorular; çürüme evresine ve elde edilebilen biyolojik materyalin durumuna göre yanıtlanabilirken kimi zaman da cevapsız kalabilir. Adli entomoloji, klasik otopsi, toksikoloji ve patoloji yöntemleri kullanılarak bulunamayan verileri sağlamak üzere cesetle ilişkili böceklerin kullanılması ile adalete hizmet edebilir (1).

Böceklerin cesede belirli bir sıra ile geldikleri ve bu sıranın böceğin beslenmesine ve cesedin çürüme evresine bağlı olarak gerçekleştiği bilinmektedir (2). *Lucilia sericata,* adli entomologlar için önemli bir türdür; insan kadavralarındaki fauna dizisinin ilk dalgası olarak kabul edilmekte ve en fazla çalışılan türlerin başında gelmektedir (3,4). Türün larvalarının büyüme hızının belirlenmesi ve ceset üzerindeki yaşının adli analizi, post-mortem interval denilen (PMI) ölümden sonraki sürenin tahmini için yasal araştırmalarda kullanılır (5-8). Bunun yanında *Lucilia sericata* üzerinden yapılan çalışmalarda antimon, baryum, kurşun gibi ateşli silah atış artığı araştırmalarında anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (9).

2010 yılında yapılan bir çalışmada araştırıcılar domuzlar üzerinde ateşli silah atış artıklarından olan antimon, baryum ve kurşun elementlerinin analizini yapmış ve ICP-MS analizlerinde anlamlı sonuçlar elde etmiştir (10). Ancak bunun dışında toksik elementler üzerine larva ile yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu tez çalışmasında *Lucilia sericata* türü yardımıyla, akut ve/veya kronik ölüme sebep olabilecek toksisiteye sahip As ve Cd elementlerinin larvadan analizi için bir tayin yöntemi geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Farklı konsantrasyonlarda As ve Cd içeren tavuk karaciğeri ile beslenen ve 3. evreye kadar büyüyen larvanın içerdiği As ve Cd konsantrasyonunun tespit edilmesinin yanı sıra, bu çalışmada element konsantrasyonlarının larvanın büyümesine olan etkisinin de araştırılması amaçlanmıştır. Böylelikle *Lucilia sericata* larvalarında inorganik elementler için kantitatif bir analiz yöntemi geliştirilmiş, yöntemin geçerlilik parametreleri irdelenmiş, larvanın büyümesi ile As, Cd konsantrasyonu arasında ilişki araştırılmış, ayrıca besiyerinin içerdiği As ve Cd konsantrasyonu ile larvadaki As ve Cd konsantrasyonu arasındaki korelasyon da belirlenmiş olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Adli Entomoloji

Entomoloji, böcekleri ve böceklerle ilgili her durumu inceleyen zoolojinin bir alt dalı olan bilim dalıdır. Alan hakkında çalışan bilim insanlarına **entomolog** ya da **böcek bilimci** denir.

Adli entomoloji ise bozunmuş cesetler üzerinde bulunan farklı böceklerin ve eklembacaklı türlerinin gelişim evrelerini inceleyen ve bunu yasal soruşturmalarda yardımcı delil olarak kullanan bilimsel çalışmalar bütünüdür. Birçok ülkede kabul edilmiştir ve kullanılmaktadır (11-13). Bu bilim dalında çalışan kişilere **adli entomolog** ya da **adli böcek bilimci** denir.

Adli entomoloji; olay yeri incelemesi, istismar/ihmal davaları, kazalar, böcek istilaları ve gıda kontaminasyonu dahil olmak üzere çeşitli yasal davalarda devreye girebilir. Temelde 3 alt dala ayrılır.

- Kentsel adli entomoloji, insanların çoğunlukta olduğu yerleşim bölgelerindeki böcek istilalarını, bahçelerdeki zararlı böcek türleri ve doğurduğu sonuçları inceler. Ayrıca bölgede kullanılan belirli pestisit kullanım yöntemlerinin doğru olup olmadığını, kimin hatalı olduğunu bulmaya yardımcı olarak çevre biyolojisine de katkı sağlar (14).
- Depolanmış ürün adli entomolojisi, evde/işyerinde depolanan gıda maddelerini istila eden böcekler üzerinde yapılan çalışmadır. Zararlıların önlenmesi, tespiti ve yok edilmesi ile ilgilenir. Kontamine ürünlerle karşılaşan tüketicilerin, üreticilere karşı yasal işlem başlatmasına olanak sunar (15). Ayrıca baskınlarda ele geçirilen yasadışı maddelerin içinde bulunabilecek böcekler, maddenin menşei tayininde önemli rol oynar (16).

- Mediko-kriminal entomoloji, cinayet, intihar vb. suç vakalarında eklembacaklılardan toplanan kanıtların suçun aydınlatılmasında kullanılmasını sağlayan alandır (5,17,18).

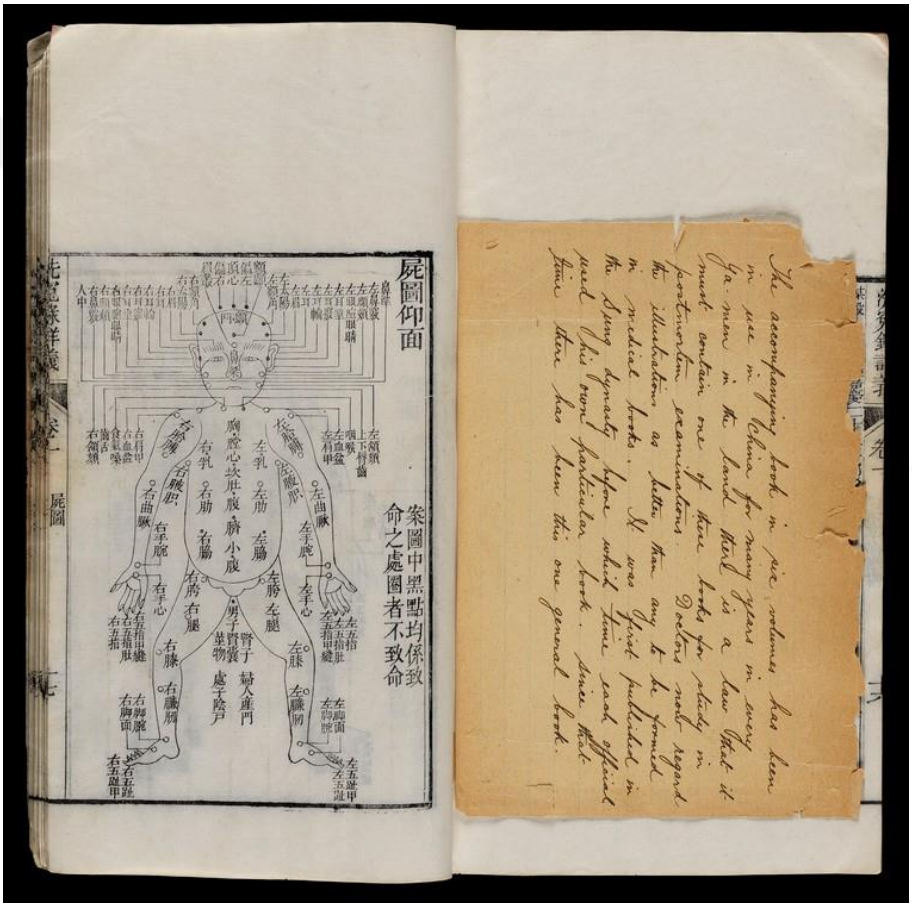
Bulunan kanıtlarla PMI hesabı iki şekilde yapılabilir. Birincisi; ölümün bir ay veya daha az bir süre önce gerçekleştiği vakalarda ceset üstündeki larvaların yaşına ve gelişimine bakılmasıdır (19). İkincisi ise; ölümün üzerinden bir ay ile bir yıl arası veya bir yıldan fazla zaman geçtiği durumlarda hangi aralıklarla cesede geldiği bilinen farklı tür böcek dalgalarına bakılmasıdır (20, 21).

Kanıtlar cesedin ölümden sonra (öldürme yerinden saklanma yerine) taşınmış olup olmadığını veya olay mahallinde öldüğünü belirlemede yardımcı olabilir, ayrıca cinayetin gerçekleştiği bölgenin türü hakkında da bir fikir verebilir. Kısıtlı bir alanda yaşayan ancak farklı bir bölgede bir cesedin üzerinde bulunan böcekler, cesedin ölümden sonra hareket ettirildiğini kanıtlayabilir; bazı sinekler yumurtalarını açık ya da kapalı bir habitatta bırakma eğilimindedirler. Bir iç mekân sineğinin yumurtaları dış ortamdaki bir ceset üzerinde bulunduğunda, kişinin iç mekânda öldürülmüş, daha sonra dışarı çıkarılmış olduğu sonucuna varılabilir (22).

Bir soruşturmada, yalnızca bir kişinin ne zaman öldüğünü öğrenmek değil, aynı zamanda kişinin nasıl öldüğünü (olası ölüm nedenleri) de bulmak önemlidir. Bozunmuş bedenden elde edilen böcekler, toksikolojik analiz için değerli bir araç olabilir. Nolte ve arkadaşları (1992), larvaların cansız bir beden ile beslendiğinde, dokulardaki kimyasalları da yuttuğunu ve bu nedenle toksikolojik analiz için güvenilir bir substrat olarak kullanılabildiğini belgelemişlerdir (23). Böceklerin ilaçları, yasadışı maddeleri ve toksinleri tespit etmek için alternatif örnekler olarak kullanımını Amendt ve arkadaşları 2011 yılında iyi bir şekilde belgelemişlerdir (24).

2.2. Adli Entomolojinin Tarihçesi

İlk adli entomoloji vakası, 13. yüzyılda Çinli avukat ve ölüm araştırmacısı Sung Tz'u tarafından "*Hsi Yüan Lu*" (The Wash Away of Wrongs) adlı adli tıp kitabında bildirilmiştir. Pirinç tarlasında bir cinayet işlenmiştir, cinayetin ertesi günü Sung Tz'u, tüm işçilere oraklarını yere bırakmalarını söylemiştir. Sineklerin yalnızca tek bir orağa (oraktaki görünmeyen kan izlerine) yönelmesiyle, sahibi suçunu itiraf etmiş ve yakalanmıştır (25,26). Kitapta Sung Tz'u tarafından el çizimi insan vücudu diyagramları da vardır (Şekil 1).



Şekil 1 : İnsan Vücudu Diyagramı- Hsi Yüan Lu (27)

18. ve 19. yüzyıllarda Fransa ve Almanya'daki toplu kazılar sırasında adli tıp uzmanları, gömülü cesetlerin üzerinde birçok türden eklembacaklıların yaşadığını gözlemlemişlerdir. Ünlü Fransız tıp doktoru Orfila 1831 yılında, çok sayıda kazı yapmış ve larvaların cesetlerin bozunmuş olmasında önemli bir rol oynadığı anlaşılmıştır (28,29).

1833 yılında Fransız Doktor Bergeret PMI tahminini de içeren ilk modern adli entomoloji vaka raporunu yayınlamıştır (30). Vaka, sinek pupaları ve larva güveleriyle ilgilidir. Bergeret, Hopital Civil d'Arbois'de bir hekim olmasına rağmen, sadece kadavra çalışmalarına olan ilgisi ile farklı bölgelerden getirilen cesetlerin üstündeki canlıların birbirine benzediğini belirtmiştir. Bergeret makalesinde, genel olarak böceklerin yaşam döngüsüne kısa bir bakış sunmuş ancak yanlışlıkla; metamorfozun yani başkalaşımın genellikle tam bir yıl gerektireceğini, dişi böceklerin yazın yumurta bıraktığını ve ilkbaharda pupaya döndüğünü varsaymıştır (31).

1881'de Alman tıp doktoru Reinhard adli tıp alanındaki ilk sistematik çalışmayı bildirdiğinde makalede böceklere de yer vermiştir (32). Saksonya'daki mezarlardan çıkarılan cesetlerle uğraşırken, çoğunluğu entomolog Brauer tarafından taksonomik olarak tanımlanan Phoridae familyasına ait sinekleri toplamış ve belgelemiştir. Ayrıca 13 yıldan daha eski mezarlardaki cesetlerde bulunan böcekleri incelemiş ve tanımlamıştır, ancak bu böceklerin tamamının cesetle ilgili olmadığını, hatta asıl faktörün bitki kökleriyle beslenmeleri olduğunu belirtmiştir. Reinhard'ın çalışması uzun süre bu alandaki en iyi çalışma kabul edildi. Çalışma 1928'de, Phoridae familyası sinek uzmanı Schmitz'in makalesinde geniş bir yer tutmuş ve doğru bilinen yanlışlar böylelikle düzeltilmiştir (33-35).

1894'te Megnin, en önemli kitabı "*La Faune der Cadavres- Application de I'entomologie a la Medicine Legale*"i yayınlamıştır. Kitapta, açıkta bulunan cesetler için sekiz, gömülü haldeki cesetler için iki böcek dalgası bildirmiştir. Kitap, bir dizi familyanın larva ve yetişkin formlarının çizimlerini, tanımlama için böceklerin kanatlarını, posterior spiraküllerini ve genel anatomisini de içermektedir (4, 31).

Alman doktorlar Klingelhöfer ve Maschka ile Krakau Üniversitesi'nden adli patolog Stefan von Horoskiewicz (1902), hamamböceği ve karıncaların cesetlerde bıraktığı ısırık kalıplarıyla ilgili adli böcek çalışmaları yapmışlardır (36-38).

Claude Morley, İngiltere'de hangi türlerin leş böceği olarak sınıflandırılması gerektiği sorusuyla ilgili olan çalışmasını 1907 yılında yayınlamıştır (39).

1920'lerden başlayarak, ekoloji, metabolizma veya anatomiye odaklanarak adli açıdan önemli böceklerle ilgili tür listeleri ve kitaplar yayınlanmıştır (31). G. Bianchini, 1929'da yazdığı raporda, 4 yaşındaki bir çocuğun tamamen mumyalaşmış cesedini ele almıştır. Toplanan eklembacaklılar arasında akarlar, akrepler, küçük böcekler ve karıncalar bulunmaktadır. Karıncaların tanımlanması Profesör Carlo Minozzi tarafından gerçekleştirilmiştir. Bianchini ise cesetteki lezyonlara, ölümden sonraki ilk 24 saatte cesede gelen karıncaların sebep olduğu sonucuna varmıştır (40).

Adli entomoloji 1960'lar ile 1980'lerin ortaları arasında tıp doktoru Marcel Leclecq ve biyoloji profesörü Pekka Nuorteva tarafından geliştirilmiştir. O zamanlardan beri yapılan temel araştırmalar ve gelişmiş uygulamalar; ABD, Rusya, Kanada, Fransa, Japonya, İngiltere ve Hindistan gibi ülkelerde adli entomolojinin rutin olarak kullanılan bir yönteme dönüşmesinin yolunu açmıştır. Dünya çapındaki araştırmacılar cinayet ve diğer yüksek profilli suç vakaları dahil olmak üzere araştırmalarında entomolojiyi kullanmaktadır (31, 41,42).

1990'lardan sonra yapılmaya başlanan DNA tabanlı tanımlamalar, adli entomolojide kullanılan böcekleri tanılamada çok önemli bir yer tutmaktadır. Ölüm sonrası yer değiştirmeden şüpheleniliyor ise ilk ve ikincil alanlardan örneklenen böcekler arasındaki ilişkiler belirlenerek şüpheler kanıtlanabilir. Yapılan birkaç çalışma, kıtalar içinde ve kıtalar arasında aynı türün popülasyonları arasındaki önemli genetik farklılıkları vurgulamıştır (43-48).

Moleküler analizin bir diğer katkısı ise, larvaların sindirim kanalında bulunan insan DNA'sının tanımlanmasıdır. Bu yöntem cesedin genetik profilini belirlemek için, kadavra yokluğunda dahi kanıt olarak kullanılabilmektedir (49-51).

2.3.Adli Entomolojide Yararlanılan Böcekler ve Bozunma Süreci

2.3.1. Adli Entomolojide Yararlanılan Böcekler

Ceset üzerine gelen böcekler çürüme evrelerine göre familya ve tür bazında farklılıklar göstermektedir. Entomologlar, bugüne kadar yapılan birçok çalışma, farklı zaman aralıklarında cesede gelen farklı türleri ortaya koymakta büyük başarı göstermiştir. Wolff ve arkadaşlarının (2001), *Sus scrofa* türü domuz üzerine 207 gün boyunca beslenmeye gelen böceklerin toplanıp tanımlandığı çalışması bu alanda yapılan en iyi çalışmalardan biri kabul edilir. Toplamda 2314 böceğin toplandığı bu çalışmada Ordo'lar (takımlar), Familia'lar (aileler) belirtilmiştir.

2.3.1.1.Ordo: Diptera

Calliphoridae familyası türleri; *Chrysomya sp., Chrysomya albiceps, Cochliomyia sp., Cochliomyia macelleria, Lucilia sp.*

Muscidae familyası türleri; *Fannia sp., Morellia sp., Ophyra sp.*

Phiophilidae familyası türleri; *Phiophila casei*

Sarcophagidae familyası türleri; *Oxisarcodexia sp.*

Syrphidae familyası türleri; *Pseudodoros sp.*

Bunun dışında türü tanımlanamamış Otitidae familyası türü.

2.3.1.2.Ordo: Coleoptera

Cleridae familyası türleri; *Necrobia rufipes*

Dermestidae familyası türleri; *Dermestes sp.*

Histeridae familyası türleri; *Hister sp.*

Scarabaeidae familyası türleri; *Coprophanaeus sp.*

Silphidae familyası türleri; *Oxelytrum sp.*

Staphylinidae familyası türleri; *Hipothelus sp., Lispinus sp., Megalopinus sp., Pseudopsis sp., Creophilus maxillosus, Creophilus erythrocephalus*

Bunun dışında türü tanımlanamamış Carabidae ve Nitidulidae familyası türleri

2.3.1.3.Ordo: Dermaptera

Türü tanımlanamamış Forficulidae familyası türü

2.3.1.4.Ordo: Hemiptera

Türleri tanımlanamamış Coreidae ve Gelastocoridae familyası türleri

2.3.1.5.Ordo: Hymenoptera

Apidae familyası türleri; *Epichaiis sp., Eulaema sp., Partamona sp., Apis sp.*

Formicidae familyası türleri; *Camponotus sp., Linepithema sp., Neivamyrmex sp., Odontomachus sp., Pheidole sp., Pseudomyrmex sp., Solenopsis sp.*

Bunun dışında türleri tanımlanamamış Halictidae, Mutilidae, Vespidae familyası türleri

2.3.1.6.Ordo: Lepidoptera

Hesperiidae familyası türleri; *Urbanus sp.*

2.3.1.7.Ordo: Blattodea

Türleri tanımlanamamış Blattidae familyası türleri

Adli öneme sahip böcek türlerinde bazıları Şekil 2-6 arasında gösterilmiştir ve bu şekillerde kullanılan görsellere Florida Üniversitesi'ne ait açık web kaynağından ulaşılmıştır (*entnemdept.ufl.edu/creatures*).



Şekil 2 : *Piophila casei* (Linnaeus) (52)



Şekil 3 : *Cochliomyia macellaria* (Fabricius) (53)



Şekil 4 : *Lucilia sericata* (Meigen) (54)



Şekil 5 : *Dermestes ater* (DeGeer) (55)



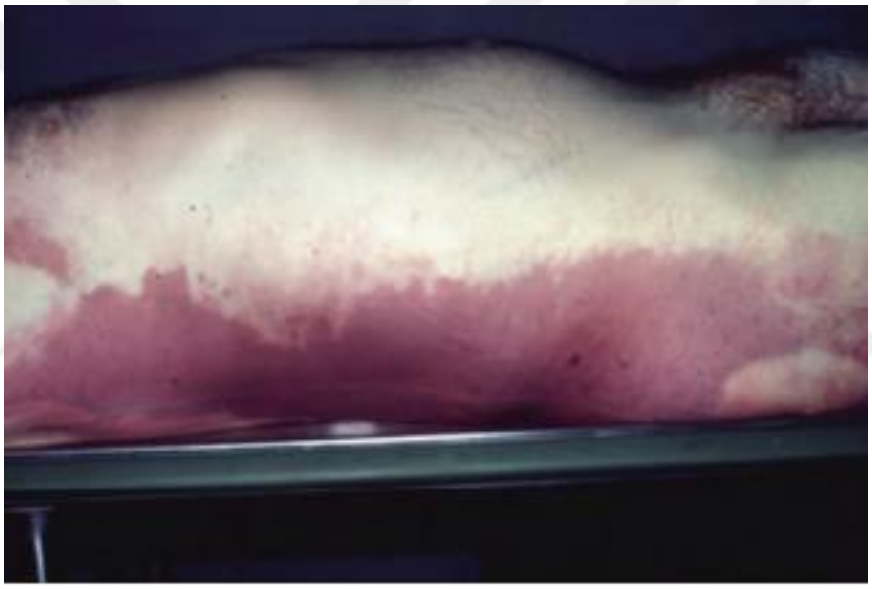
Şekil 6 : *Creophilus maxillosus* (Linnaeus) (56)

2.3.2. Bozunma Süreçleri

Post-mortem değişiklikler ilk andan itibaren cesedin su kaybı ile başlar. Ardından ücut sıvıları ve kanda değişiklikler oluşmaya başlar. Algor mortis, (ölü soğuması), Livor mortis (ölü lekesi) ve Rigor mortis (ölü katılığı) ile değişiklikler devam eder. Bozunmada iki

mekanizma söz konusudur: otoliz ve pütrefikasyon. Bozunma, ölümden kısa süre sonra otoliz şeklinde başlamasına rağmen, pütrefikasyonun gözükmeye başlamasıyla beraber oluşan makroskopik değişikliklerle birlikte belirgin hale gelmeye başlar. Cesedin bulunduğu koşullara bağlı olarak sıcak ve kurak ortamda mumyalaşma; nemli ortamda ise sabunlaşma gözlemlenir (57).

Algor mortis, Livor mortis ve Rigor mortis çıkarımları genellikle cesedin ölümünü takiben 1-2 günlük bir süreçte mümkündür. Rigor mortis ve livor mortis Şekil 7 ve Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 7 : Livor mortis (58)



Şekil 8 : Rigor mortis (58)

- Başlangıç evresi (1-2 gün): Ölüm anında başlar ve şişkinliğin görüldüğü noktaya kadar devam eder. Hücresel bozulma (otoliz) meydana gelse de bu noktada büyük morfolojik değişiklikler meydana gelmez. Morfolojik değişiklikler ve yayılan kokular insanlar için anlaşılması güç olsa da gerçekleşen hücresel bozulmadan salınan kimyasallar bu erken aşamada dahi böcekleri cesede çeker (59, 60). Bu aşamada ortaya çıkan ilk böcek türleri çoğunlukla Sarcophagidae, Muscidae, Calliphoridae ve Formicidae familyalarına aittir (1).
- Şişme evresi (2-7 gün arası): Çürüme bu evrede başlar. Anaerobik bakterilerin aktivasyonu ile ortaya çıkan gazlar, cesedin karın kısmında balon benzeri bir görünüm oluşturur. Bu aşamada cesette en fazla Diptera takımından Calliphoridae familyası yetişkin sinekleri gözükür (60).
- Aktif çürüme evresi (5-13 gün arası): Şişkinlik aşamasının sona ermesiyle başlar. Karın delinir ve ceset biokütlesinin Diptera larva biokütlesine dönüşümü gözlemlenir. Larvalar daha sonra cesetten pupa olmak için ayrılırlar. Bu evrede Calliphoridae ve Muscidae familyalarının yanı sıra Coleoptera türleri de cesede gelmeye başlar (1, 60).

- İleri çürüme evresi (10-23 gün arası): Çürümenin sonuna gelindiğinden koku giderek azalmaya başlar. Bu dönemde cesette yalnızca Coleoptera takımına ait türler vardır (60).
- Kuruma evresi (18-90 gün arası): Yumuşak dokular tamamıyla yok olmuş geriye sadece kurumuş deri kalıntıları, kemikler, saç kalmıştır. Cesede bu dönemde Hymenoptera takımından arı türleri ve Dermestidae familyasından Coleoptera türleri görülmektedir (59-61).

2.4.Lucilia sericata

Diptera, *di-* (iki) ve *-ptera* (kanat) sözcüklerinden oluşan çift kanatlıları tarif eder. Diptera üyeleri iki tam gelişmiş kanata sahiptir. Genellikle açık ön kanatlara sahip olmaları ve *"halter"* adı verilen dengeleyicilere evrilen ikinci çift kanatları ile diğer böceklerden kolayca ayırt edilir. Bu yapılar minik topuzları andırır (16, 62). Türün taksonomik sınıflandırması Şekil 9'da gösterilmiştir.

Diptera ordosuna ait sinekler daha çok nekrotik dokularla beslenmelerine rağmen canlı dermal dokuda oluşan parazitik bir istila olan miyaz hastalığından da sorumludur. Ayrıca mikobakteriyel enfeksiyonları çiftlik hayvanlarına bulaştırırlar (63).



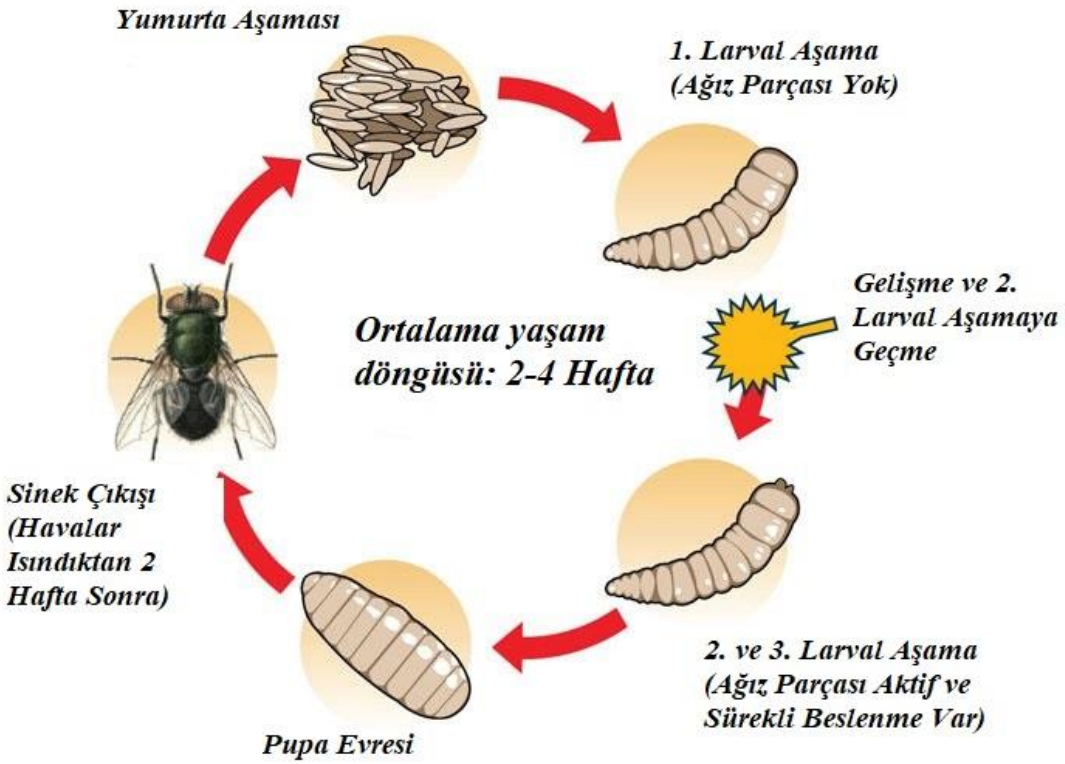
Şekil 9 : *Lucilia sericata*'nın taksonomik yeri (64)

Diptera iki Subordo'ya (alttakım) ayrılır. Bunlar Nematocera ve Brachycera'dır. Lucilia türlerinin bulunduğu alttakım Brachycera'dır. Bunlar Nematocera türlerine kıyasla evrimsel açıdan daha yüksek türlerdir. Nematocera'dan daha kısa; sekiz veya daha az bölümü olan kısa ve küt antenleri vardır. Pupaları, son larva (3. instar) döneminden sonra sertleşmiş kalıntıları olan bir kılıf içinde büyür. Pupalar toprağa düşerek ortalama 2-3 haftalık bir süreçten sonra açılır ve sinek ortaya çıkar.

Eski taksonomik sınıflandırma sisteminde Brachycera'yı oluşturan Tabanomorpha ve Asilomorpha adı verilen Infraordo'lar yer alır. Üçüncü bir Infraordo olan ve *Lucilia sericata'*nın da bulunduğu Muscomorpha, adli bakımdan en önemlisidir. Bu grubun kıllı

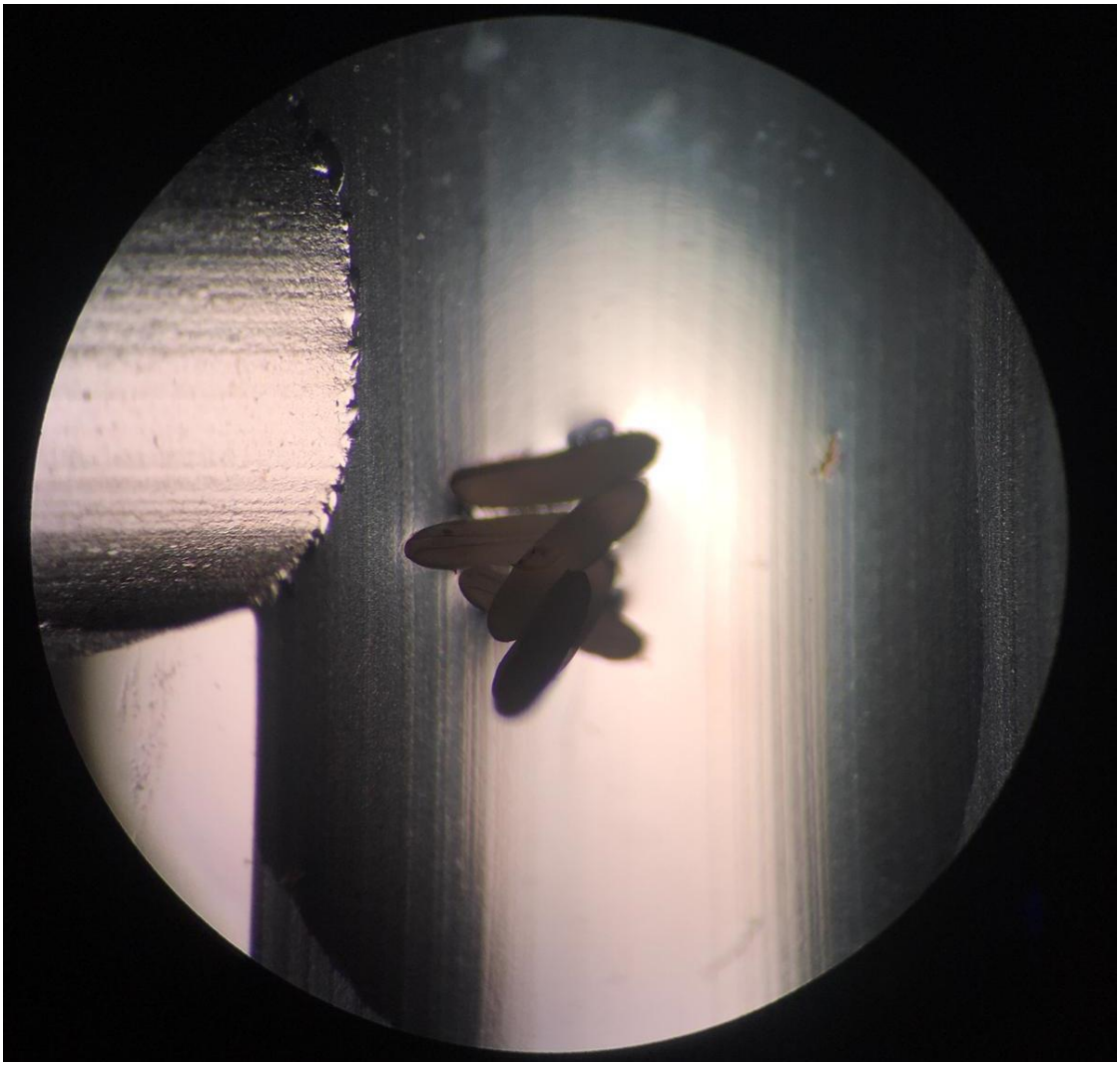
antenleri vardır; larvanın baş ve gövde ayrımı olmayan bir morfolojik düzendeki üç larva aşaması vardır. Bu larva aşamalarının her birine *"instar"* (deri değiştirme) adı verilir.

Lucilia sericata (Diptera, Calliphoridae) yaygın olarak *"yeşil şişe sineği"* olarak bilinir çünkü bu cinsteki tüm sinekler metalik yeşil renktedir. Sarı renkli bir basicostası vardır. Kuzey Amerika'da, *Lucilia sericata*'ya *Phoaenicia sericata* denir. Bu tür, özellikle ağız, göz ve sinüsler başta olmak üzere hayvanların yaralarında bulunur. *Lucilia sericata* larvaları kaşıntı, ağrı, enflamasyon, eozinofili ve bazen de ikincil bakteriyel enfeksiyonlara neden olur. Oluşturduğu enfeksiyonlar ile hayvanların yaşam süresinde ve eşey hücresi üretiminde önemli kayıplara neden olabilir (65-68). Türün tüm yaşam döngüsü Şekil 10'da kısaca şematize edilmiştir.



Şekil 10 : *Lucilia* sericata'nın yaşam döngüsü (69)

Lucilia sericata larvalarının kimliği, larvanın son arka segmentinin kenarına bakılarak doğrulanabilir. Segmentin dış kenarı boyunca bulunan çıkıntılara tüberkül denir; tüberküller üst, iç, orta ve dış (alt) tüberkül olarak dörde ayrılır. İki iç tüberkül arasındaki mesafe, iç ve orta tüberkül arasındaki mesafe ile eşitse, bu tür *Lucilia sericata* olarak tanımlanabilir. Bu özellik, üçüncü evre larvalarının karakteristiğidir (62, 67, 70). Üçüncü evre larva solunum yarıklarının sayısına bakılarak da doğrulanabilir. Şekil 11, 12 ve 13'te sırasıyla yumurta, 3. larval dönem ve pupa dönemi; Şekil 14 ve 15'te ise larval dönemin anlaşıldığı solunum yarıkları gösterilmektedir.



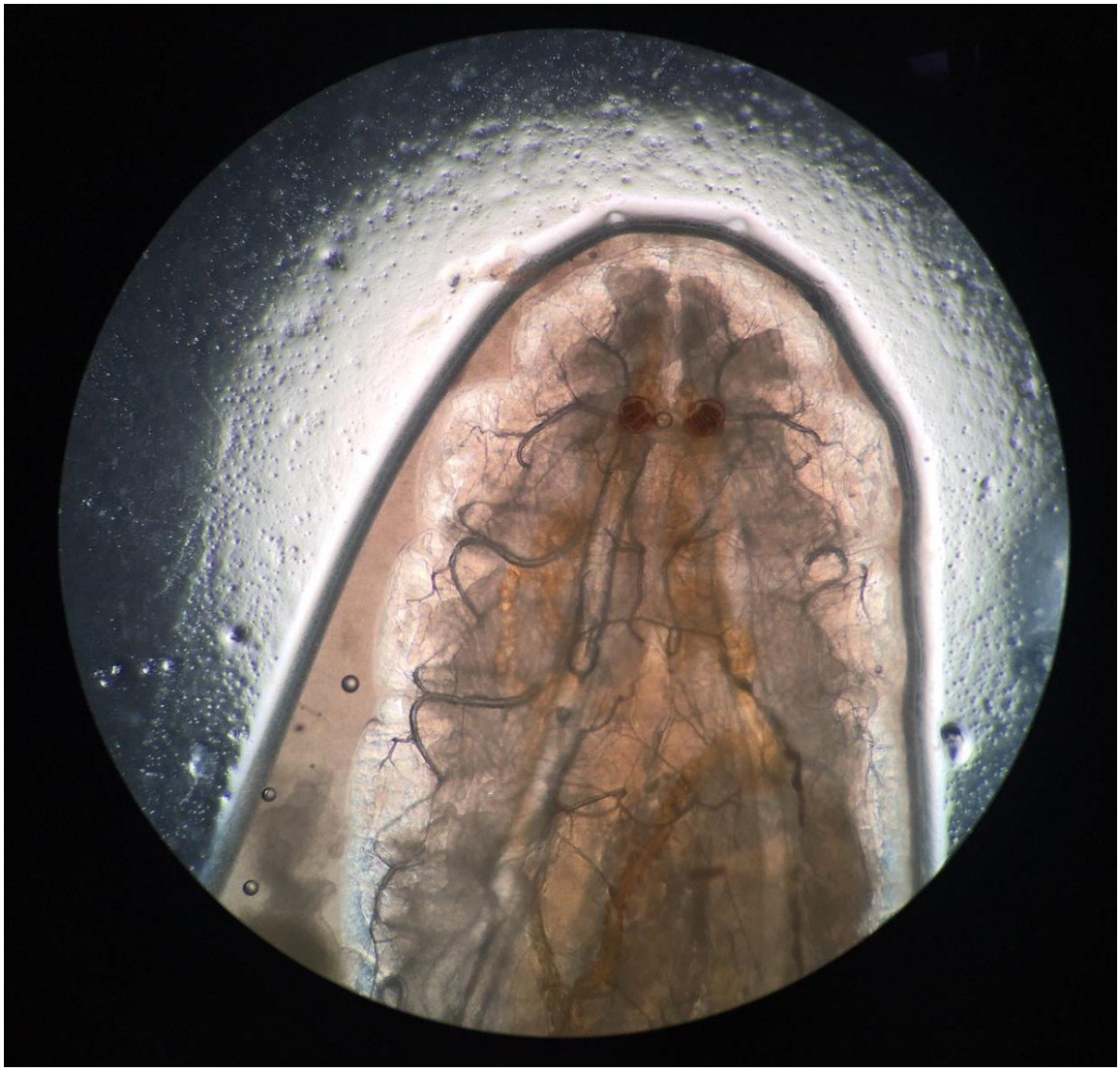
Şekil 11 : *Lucilia sericata* yumurtaları (Stereo mikroskop altında, 10x büyütmede)



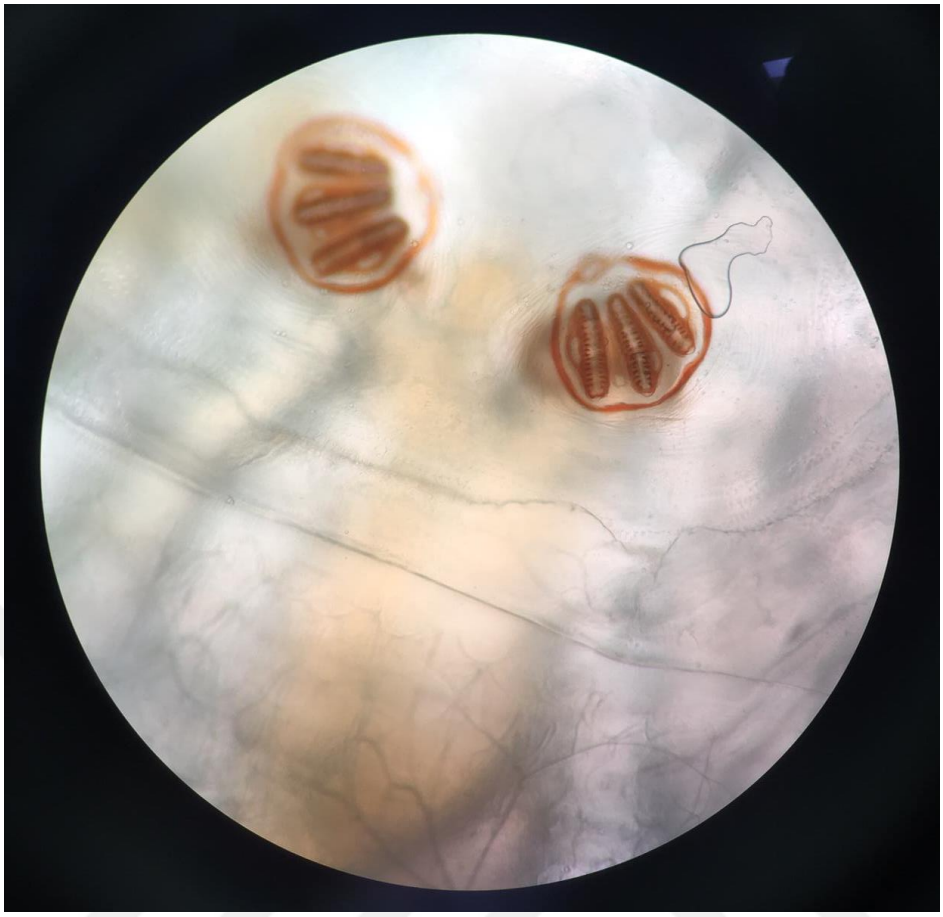
Şekil 12 : *Lucilia sericata*'nın 3. evre larvası (Stereo mikroskop altında, 4x büyütmede)



Şekil 13 : *Lucilia sericata* pupaları



Şekil 14 : *Lucilia sericata* 3. larval dönem solunum yarıkları (Stereo mikroskop altında, 4x büyütmede)



Şekil 15 : *Lucilia sericata* 3. larval dönem solunum yarıkları (Stereo mikroskop altında, 10x büyütmede enine kesit)

2.5.Adli Entomotoksikoloji

Post-mortem toksikolojik araştırmalar için normalde kullanılan dokular ve/veya vücut sıvılarının mevcut olmadığı durumda böcekler, toksikolojik analiz için yararlı bir örnek kaynağıdır (71).

Entomotoksikoloji yeni bir adli bilimler araştırma alanıdır ve geçmişi nispeten yakın tarihe dayanmaktadır. İlk raporlar, yetişkin karasineklerinin (ev sineklerinin) dokularında çevresel maruziyete bağlı bakır, demir, çinko ve kalsiyum gibi farklı metallerin biriktiğini gösteren Sohal ve Lamb tarafından 1970'lerin sonunda yapılmıştır (72,73).

Nuorteva ve Nuorteva (1982) bilinen cıva konsantrasyonları içeren balık dokularıyla beslenen çeşitli Calliphoridae familyası türü sinek larvalarında cıvanın geri kazanılmasını araştırmıştır (74). Finlandiya'nın kırsal bir bölgesinde bulunan çürümüş bir kadın cesedinin larvalarla kaplı olduğu adli bir soruşturmada da benzer bir prosedür uygulanarak larvalarda belirgin derecede düşük cıva seviyesi -cesedin bulunduğu ortam cıva-serbest bir ortam- elde edilmiştir (58).

1985'te Leclercq ve Brahy, Fransa'da kaza sonucu ölen bir kişiyi incelerlerken bulunan Piophilidae, Psychodidae ve Fanniidae familyalarına ait sinek türlerinde arsenik varlığı tespit edilmiştir, ancak çalışmanın detayları ve tespit edilen As konsantrasyonu hakkında herhangi bir bulgu sunulmamıştır (58).

Roeterdink ve ark. (2004), sığır etine ateş etmiş ve *Calliphora dubia* türü üzerinde ICP-MS ile ASAA (ateşli silah atış artığı) araştırması yapmıştır. Kontrol grubu eti ile beslenen larvalara kıyasla, ateş edilmiş sığır eti parçasından beslenen larvalarda anlamlı düzeyde daha yüksek kurşun (Pb), baryum (Ba) ve antimon (Sb) konsantrasyonları tespit edilmiştir. Beslenme süresi arttıkça Pb ve Sb konsantrasyonlarının azaldığı, fakat Ba konsantrasyonun arttığı bulunmuş ve Ba'nın larva içinde biyolojik olarak biriktiği sonucuna varılmıştır (75).

Altunsoy ve Başaran (2011), Talyumun (Tl) *Lucilia sericata* gelişimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Deney ve kontrol grupları arasında vücut uzunluğu ve ağırlığı karşılaştırması yapmışlar ve kontamine olan ile kontamine olmayan diyetlerle beslenen larvaların gelişme oranının önemli ölçüde değiştiğini göstermişlerdir (7).

Costa T. ve arkadaşlarının (2020) yayınladığı ve 2 farklı vakayı ele alan derleme bir çalışmada; Calliphoridae familyasına ait sineklerin larvalarında Pb, Ba ve Sb bulunduğundan söz edilmiştir. Merminin girdiği kısımdan toplanan larvalarda ICP-MS ile yapılan analizler

sonucunda düşük konsantrasyonda da olsa ASAA tespit edilmiştir. İnorganik elementlerin larvadan geldiğini ispatlamak amacıyla cesedin bulunduğu bölgedeki toprak da aynı yöntemle incelenmiştir (76).

2.6.Çalışmada Araştırılan İnorganik Elementler

Bu çalışmada akut veya kronik ölüme yol açabilecek düzeyde toksik etkileri olduğu bilinen Arsenik (As) ve Kadmiyum (Cd) elementleri ile araştırma yapılmıştır. Aşağıda bu elementlerin fiziksel, kimyasal ve toksikolojik özellikleri açıklanmıştır.

2.6.1. Arsenik

Arsenik, sembolü As ve atom numarası 33, standart atom ağırlığı 74.921 olan bir elementtir. Arsenik doğada genellikle kükürt (S) ve diğer metallerle birlikte; aynı zamanda saf bir element kristali olarak da bulunur. Arsenik bir metaloittir (yarı metal); metallerle tepkimesinde ametal, ametallerle tepkimesinde metal özellikleri gösterir (77).

En yaygın üç arsenik allotropu gri, sarı (Şekil 16.) ve siyah arseniktir. Gri arsenik doğada en yaygın olan formudur. Metalik bir görünüme sahip olan bu gri formu endüstri için önemlidir çünkü en dengeli formudur (78). Sarı arsenik yumuşak ve balmumu gibidir ve bir şekilde tetrafosfora (P_4) benzer. Gri ve sarı arseniğin her ikisinde de her bir atomun diğer üç atoma tek bağ ile bağlandığı tetrahedral bir yapı ihtiva eden dört atom vardır.



Şekil 16 : Sarı arsenik (79)

Arsenik 33 bilinen izotopa ve en az 10 izomere sahiptir. Yarılanma ömrü, izotopuna bağlı olmakla birlikte 4-80 gün arasında değişmektedir.

Periyodik Tablonun VA Grubuna aittir ve dört oksidasyon durumunda bulunabilir: –3, 0, +3 ve +5. Arsenit, As^{III} ve arsenat, As^{V}, sırasıyla indirgeyici ve oksijenli koşullar altında yükseltgeyici oksidasyon durumlarıdır (80,81). Biyolojik ve toksikolojik açıdan bakıldığında, üç ana arsenik bileşiği grubu vardır: inorganik arsenik bileşikleri, organik arsenik bileşikleri ve arsin gazı. İnorganik arsenik bileşiklerinden arsenik trioksit (As_2O_3), sodyum arsenit ($NaAsO_2$) ve arsenik triklorür ($AsCl_3$) en yaygın üç değerlikli bileşiklerdir. En yaygın beş değerlikli bileşikler arasında ise arsenik pentoksit (As_2O_5), arsenik asit (H_3AsO_4) ve arsenatlar (örn. kurşun arsenat ve kalsiyum arsenat) bulunur. Yaygın organik arsenik bileşikleri arasında arsanilik asit, metilarsonik asit, dimetilarsinik asit (kakodilik asit) ve arsenobetain bulunur (82).

Arsenik doğada büyük ölçüde sülfür, oksijen ve demir ile bileşik halinde bulunur (83,84). Doğal sudaki arseniğin varlığı ise arsenik içeren kaya ve tortuların zaman içinde aşınmasından kaynaklanır (85,86). İnsanların doğal maruziyet kaynakları arasında volkanik kül, minerallerin ve cevherlerin ayrışması ve mineralize yeraltı suyu bulunur. Arsenik ayrıca yiyeceklerde, suda, toprakta ve havada da bulunabilir.

Arsenik, A Grubu kanserojen olarak sınıflandırılır (87). Bilinen bir nörotoksindir. Arseniğin insanlarda, deri ve akciğer kanserleriyle ilişkili kanserojen bir ajan olduğu doğrulanmıştır (88). Bu sebeplerden ötürü Dünya Sağlık Örgütü (WHO) içme suyundaki arsenik konsantrasyonunun 10 µg/L'yi geçmemesi, içme suyundaki As üst konsantrasyon sınırının ise 50 µg/L olması gerektiğini bildirmektedir (89,90).

Risk Değerlendirme Bilgi Sistemi veri tabanı, "İnorganik arseniğin insanlar için akut ölümcül dozunun yaklaşık 0,6 mg/kg/gün olduğu tahmin edilmektedir" şeklinde belirtmektedir (91).

Akciğerler veya gastro-intestinal yol ile emildikten sonra, arsenik vücutta kan yoluyla geniş çapta dağılır. Vücuttan hızla atılımı yanısıra deri, saç, tırnaklar gibi keratin açısından zengin dokularda, kemik ve dişlere göre daha fazla birikir. Emilen As, esas olarak karaciğer tarafından metabolize edilir ve böbrekler tarafından idrarla atılır. Dışkı, ter ve cilt dökülmesiyle daha küçük miktarlarda da vücuttan uzaklaştırılabilir (92). Organik arseniğin vücuttan atılması As^{V} veya As^{III}'e göre daha kolaydır. Toksisite açısından üç değerlikli türevler, beş değerlikli formlardan daha toksiktir. İnorganik üç değerlikli As^{III} ve beş değerlikli As^{V}, organik formlarından 100 kat daha toksiktir (93).

İntravenöz yolla alınan arsenik ile intihar etmiş 30 yaşında bir kadının post-mortem çalışmasında toksik olan As^{V}'in en fazla karaciğerde biriktiği gösterilmiştir. Karaciğerdeki total inorganik arsenik konsantrasyonunun 8900-202000 µg⁄kg olarak belirtildiği vakada sadece karaciğerde 9870 µg⁄kg As^{V} konsantrasyonu analiz edilmiştir. Akciğer ve böbreklerde ise yüksek oranda dimetilarsinat (DMA) varlığı göze çarpmaktadır (94).

Tietz'e göre, kanda bulunması beklenen normal arsenik seviyesi 0,002-0,023 µg/mL iken kronik zehirlenmelerde bu seviye 0,1-0,5 µg/mL, akut zehirlenmelerde ise 0,6-9,3 µg/mL arasında değişebilmektedir. İdrardaki normal seviye 550 µg/gün iken, kronik zehirlenmede 0.05-5.00 µg/mL, akut zehirlenmelerde ise 1-20 µg/mL arasındadır (95).

Arsenik zehirlenmesi ile ilgili yapılan araştırmalarda, kişinin kanında ve idrarında ölçülen arsenik konsantrasyonlarını etkileyen ana faktörlerin, intoksikasyondan numune toplamaya kadar geçen süre, maruz kalınan arsenik miktarı ve maruziyet sonrası uygulanan tedavi işlemleri olacağı öne sürülmüştür (96).

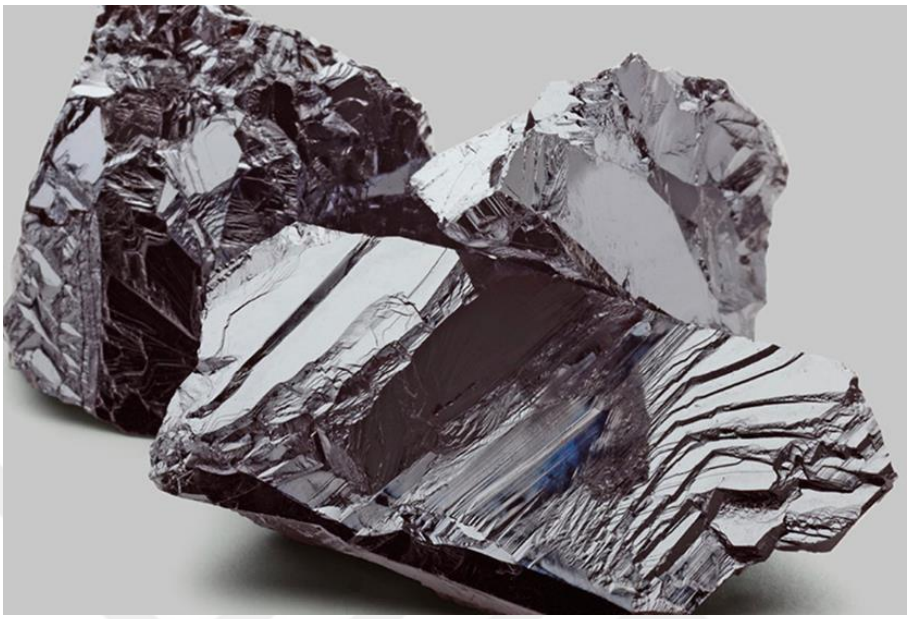
Yayımlanan bir çalışmada yüksek doz As_2O_3 zehirlenmesi sonucu ölen 3 kişinin vücudundaki ante-mortem ve post-mortem arsenik konsantrasyonları gösterilmiştir. Vaka 1-2 ve 3 için ante-mortemde kanlarındaki arsenik konsantrasyonu sırasıyla 11.1, 2.29 ve 2.51 µg/mL'dir. Vaka 1'in daha yüksek olmasının sebebinin hastanede tedavide bulunulmaması ve diğer iki hastaya hastanede uygulanan gastrik lavaj olduğu fakat vaka 2 ve 3 için de gösterilen değerlerin hayli yüksek olduğu belirtilmektedir. Post-mortemde mide içeriğinde sırasıyla 101449, 23369 ve 19410 µg/g; karaciğerde sırasıyla 1623, 1635 ve 62,8 µg/g; böbreklerde sırasıyla 971, 1217 ve 23,5 µg/g; kanda ise sırasıyla 3, 20.1 ve 16,2 µg/mL arsenik konsantrasyonu tespit edilmiştir. Kişilerde ayrıca idrarda ve duedonumda yüksek; Vaka 3'te ise beyinde düşük oranda arsenik bulunmuştur. Sunulan vakalar kanda ve idrarda tespit edilen yüksek seviyelerde arseniğin yanı sıra iç organlarda da aşırı yüksek konsantrasyonları göstermesiyle dikkat çekicidir. Çünkü, bu tür yüksek konsantrasyonlar ölümcül arsenik zehirlenmelerinde post-mortem materyalde çok nadiren bulunurlar. Arsenik konsantrasyonun olması beklenen normal seviyeleri mide içeriği, karaciğer, böbrek ve beyinde sırasıyla 0.037, 0.012, 0.35 ve <0.10 µg/g'dır (93).

2.6.2. Kadmiyum

Kadmiyum, sembolü Cd ve atom numarası 48, standart atom ağırlığı 112.414 olan bir elementtir. Kadmiyum, Dünya'nın kabuğunun yaklaşık 0,1 mg/kg'ını oluşturur. Kadmiyum içeren önemli maden yatakları bilinmemektedir. Önem taşıyan tek kadmiyum minerali olan Grinokit (CdS), neredeyse her zaman Sfalerit (ZnS) ile ilişkilidir. Bu ilişkiye çinko ve kadmiyum arasındaki jeokimyasal benzerlik neden olur ve onları ayıracak jeolojik süreç yoktur. Ayrıca kadmiyum yer kabuğunun yaklaşık 65 mg/kg'ını oluşturan çinkodan çok daha nadir bulunur (97).

Kadmiyum periyodik cetvelde IIB grubunda bulunan; yumuşak, dövülebilir, gümüşi-beyaz renkte iki değerlikli bir metaldir (98) (Şekil 17). Pek çok açıdan çinkoya benzer, ancak

çinkodan daha karmaşık bileşikler oluşturur (99). ^{110}Cd, ^{111}Cd ve ^{112}Cd izotopları kararlı olmakla birlikte 8 adet bilinen izotop bulunur.



Şekil 17: Kadmiyum (98)

Diğer birçok metalin aksine kadmiyum korozyona dayanıklıdır ve sanayide diğer metaller üzerinde koruyucu plaka olarak kullanılır. Suda çözünmez ve yanıcı değildir. Fakat toz halindeyken yanabilir ve zehirli dumanlar salabilir (100).

Kadmiyum, insan ve hayvanlar için en toksik, biyolojik olarak parçalanamayan ağır metallerden biri olarak kabul edilir (101). İnsanlardaki toksisitesine bağlı oluşabilecek potansiyel kanser, kardiyovasküler hastalık ve osteoporoz mekanizmalarına etkisi nedeniyle araştırılan bir kimyasaldır (102,103). Kadmiyuma mesleki maruziyetin en tehlikeli şekli, toz halinin yutulması ve/veya dumanının solunmasıdır. İnhalasyon ile alımında kadmiyum oksit dumanına (200-500 $\mu g/m^3$) akut maruziyet, metal dumanı ateşine benzer semptomlara neden olabilir (104). 8 saat boyunca $1mg/m^3$'ün üzerindeki konsantrasyonlarda akut kimyasal pnömoniye neden olabilir (105). İnsanlar için ölümcül kadmiyum oksit dumanı

konsantrasyonunun 8 saatlik bir maruziyet için yaklaşık 5 mg/m^3 olduğu tahmin edilmektedir (105,106).

Oral alımda ise letal dozun 350-8.900 mg arasında değiştiği bildirilmiştir (104). Fakat Buckler ve ark. (1986), 150 g kadmiyum klorür alımını takiben şiddetli akut kadmiyum zehirlenmesi geçiren 17 yaşındaki bir kadının ölüm vakasını bildirmiştir. Hastada hipotansiyon, solunum durması, metabolik asidoz, pulmoner ödem ve oligüri gelişmiş ve hasta 30 saat içinde ölmüştür. Yapılan otopside gözlenen kadmiyum konsantrasyonları, kanda 23,000 µg/L, idrarda 17,000 µg/L, karaciğerde 0,4 µg/kg, akciğerde 0,2 µg/kg hesaplanmıştır (107).

Çeşitli sebeplerle ölmüş 212 kişi üzerinde yapılan, post-mortem kanda ağır metal düzeylerinin ölçüldüğü bir çalışmada Cd ortalama konsantrasyonu 0,121 µg/mL tespit edilmiştir. PMI'a göre de değerlendirilen örneklerde, kandaki Cd konsantrasyonlarının ileri çürüme evresinde olan bireylerde, çürüme olmayan ve erken dönem çürüme evresinde olan bireylerdeki konsantrasyondan anlamlı olarak daha yüksek olduğu belirtilmiştir (108).

Bir başka çalışmada ise genel popülasyondaki kadmiyum maruziyet düzeylerini değerlendirmek üzere, 61 post-mortem örnek araştırılmıştır. Araştırmada akciğer, karaciğer ve böbrek (korteks) numunelerinde kadmiyum için genel ortalama değerler sırasıyla 0.13, 0.95 ve 15.45 µg/g olarak bulunmuştur (109).

Çalışmalarda oral alım ve/veya inhalasyon yoluyla uygulanan kadmiyum bileşiklerinin laboratuvar hayvanlarında malign tümör oluşturduğuna ya da oluşmasına neden olduğuna dair kesin bir kanıt elde edilmemiştir (110).

2.7.ICP-MS ve Çalışma Prensibi

İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektrometresi ya da kısaca ICP-MS sistemi, 1983 yılında ilk olarak Pittsburgh Konferansı'nda Perkin Elmer tarafından sunulmuştur (111). ICP-MS sistemi element tayini için kullanılan analitik bir tekniktir.

ICP-MS; toprak, çevre, yaşam ve adli bilimler gibi birçok araştırma alanında ve gıda, malzeme, kimya, yarı iletken ve nükleer endüstrilerde kullanılmaktadır. İz elementlerin verimli bir şekilde tespit edilmesinde, tanımlanmasında ve güvenilir bir şekilde ölçülmesinde ICP-MS sistemi kullanılmaktadır (Şekil 18) (112).

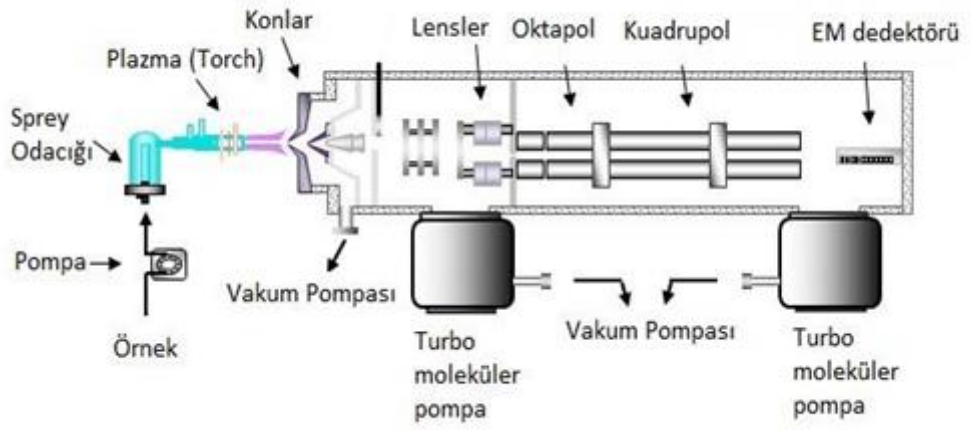


Şekil 18: ICP-MS sisteminin görüntüsü

ICP-MS elementleri kalitatif ve kantitatif olarak tayin edebilen bir tür kütle spektrometresidir. ICP ile kütle spektrometresinin (MS) bileşiminden oluşur. Numunedeki

elementler yüksek sıcaklara ulaşabilen plazmada iyonlaştırılır ve kütle spektrometresine (MS) iletilir. Burada kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılıp ölçülür.

ICP-MS için birçok elementin tayin sınırı milyarda birden daha düşüktür. Analiz edilecek örnek plazmaya düzgün aerosol damlaları halinde gelir. ICP tarafından oluşturulan iyonlar, iyonları kütle/yük oranına göre ayıran yere, MS kütle spektrometresine yönlendirir. Böylece seçilmiş kütle/yük oranlı iyonlar tayin edilip ölçülebilir (113). ICP-MS'in şematik görünümü Şekil 19'da gösterilmiştir.



Şekil 19 : ICP-MS şematik görünümü (114)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Kullanılan Ekipmanlar

Çalışmada kullanılan tüm ekipman ile sarf malzeme listesi marka ve modelleriyle birlikte Tablo I'de listelenmiştir.

Tablo I : Çalışmada kullanılan ekipmanlar ve sarf malzemeler

EKİPMAN ADI	**MARKASI ve MODELİ**
ICP-MS	Thermo Scientific- X-SERIES 2
Mikroskop	Olympus CX41
Otoklav	Nüve OT 4060
Santrifüj Cihazı	Hettich Universal 320R
Çeker Ocak	Airstream ESCO Class II BSC
Buzdolabı	Arçelik
Hassas Terazi	Presica XB220A
Ultra Saf Su Cihazı	MilliQ Synthesis A10
Etüv	Nüve 500 Nüve FN-120 Termal 540SD
Vorteks	Isolab
Petri	Isolab (90x17mm)

Tablo I (devamı) : Çalışmada kullanılan ekipmanlar ve sarf malzemeler

Otoklav Şişesi	Simax (1L)
Thome Lamı	Isolab
Pens	Isolab
50 mL Falkon Tüp	Isolab
15 mL Falkon Tüp	Isolab
Otomatik Pipet	Eppendorf (100 µL, 200 µL, 1000 µL, 5 mL, 10 mL)
Kumpas	Horex
Nitril Eldiven	Isolab
Tüp Sporları	Isolab

3.2.Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar kullanım amaçları ve markalarıyla birlikte Tablo II'de gösterilmiştir.

Tablo II : Çalışmada kullanılan kimyasallar

KULLANIM AMACI	MARKA	STANDART/ÇÖZELTİ
Multi Kalibrasyon Stok Çözelti	High-Purity Standards	ICP-MS Kalibrasyon Standardı-Değiştirilmiş (10 µg/mL in %2 HNO_3 + Tr HF)
Standart Kalibrasyon Çözeltisi		As (1000 µg/mL in %2 HNO_3)
		Cd (1000 µg/mL in %2 HNO_3)
İç Standart	Absolute Grade	In (1000 µg/mL in %2 HNO_3)
		Ga (1000µg/mL in %2 HNO_3)
Numune Hazırlama Çözeltisi (%2 Nitrik Asit)	Merck	Suprapure Nitrik Asit %65
Numune Hazırlama (Reaksiyon Hızlandırıcı)	Merck	Hidrojen Peroksit %30

3.3.ICP-MS Sistemi Analiz Parametreleri

Larvaların analiz edildiği ICP-MS'in analiz sırasındaki sistem parametreleri Tablo III'te belirtilmiştir.

Tablo III : ICP-MS sistemi analiz parametreleri

ICP-MS CİHAZ ANALİZ PARAMETRELERİ		
Nebulizer	Concentric nebulizer	
Spray Chamber	Pyrex, Conical, QD Drain	
Mass Analizator	Quadruple	
RF Power	1350 W	
Ar gas flow rates	0,88	
Plasma coll	13	
Auxiliary	0,9	
Lens 1 Voltage	-1350,00	
Lens 2 Voltage	-83,90	
Lens 3 Voltage	-197,60	
Scanning mode	Peak jumping	
Dwell time	0,6 ms	
Sample Uptake rate	45 sn	
Isotopes	**75As**	**111Cd**

3.4.Validasyon Çalışmaları

3.4.1. Doğrusallık ve Kalibrasyon Eğrisi

Miktar tayini yapılan elementler (As ve Cd) için oluşturulan iki farklı kalibrasyon eğrisinde kullanılan çözeltilerin hazırlanmasına dair detaylı bilgi Tablo IV ve Tablo V'te verildi. Matriks içermeyen, nitrik asit çözeltisinde hazırlanan kalibrasyon eğrisinde kullanılan doğrusal aralık blank numune ile başlayıp 1-100 ppb (ng/mL) arasında artan konsantrasyonlarda hazırlanmışdı. Larva matriksi ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi için ise blank numune ile başlayıp 1-20 ng/mL arasında artan konsantrasyonlarda hazırlandı. Her bir numune 3'er kez tekrar edildi. Çalışmada iç standart olarak In ve Ga elementleri (20 ng/mL) kullanıldı.

Tablo IV : Matriks içermeyen kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Tüp NO	**As ve Cd Kons. (ng/mL)**	**Multi Kal. Çöz. (1 µg/mL)**	**İç Standart In+Ga (2 µg/mL)**	
1	Blank	-	100 µL	Kalibrasyon için hazırlanan bütün tüpler %2 HNO_3 ile 10 mL'ye tamamlanır, vortekslenir.
2	0,1	1 µL		
3	0,2	2 µL		
4	0,5	5 µL		
5	1	10 µL		
6	2	20 µL		
7	5	50 µL		
8	10	100 µL		
9	20	200 µL		
10	50	500 µL		
11	100	1000 µL		

Tablo V : Larva matriksi ile oluşturulan kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması

Tüp NO	**As ve Cd Kons. (ng/mL)**	**Multi Kal. Çöz. (1 µg/mL)**	**İç Standart In+Ga (2 µg/mL)**	
1	Blank	-	100 µL	Kalibrasyon için hazırlanan bütün tüpler %2 HNO_3 ile 10 mL'ye tamamlanıp, vortekslenmiştir.
2	1	10 µL		
3	2	20 µL		
3	5	50 µL		
4	10	100 µL		
5	20	200 µL		

3.4.2. Tespit Limiti (LOD), Tayin Limiti (LOQ) Çalışmaları

Tespit limiti (LOD) ve tayin limiti (LOQ) hesaplamaları için, 10 farklı blank kalibrasyon çözeltisi analiz edildi ve standart sapmaları hesaplandı. LOD değeri, standart sapmanın 3 katı, LOQ değeri ise standart sapmanın 10 katı olacak şekilde hesaplandı.

3.4.3. Geri Kazanım ve Tekrar Edilebilirlik

Geliştirilen yöntemin tekrar edilebilirlik ve geri kazanım çalışmaları her bir analit için 1, 2, 5, 10 ve 20 ng/mL konsantrasyonlarında gerçekleştirildi. İçerisinde herhangi bir analit bulunmayan besiyerinde yetişen blank larvalara yukarıdaki konsantrasyonlarda As ve Cd eklenerek her bir numune 8 kez tekrar edildi. Sonuçların ortalaması, standart sapması (STD), bağıl standart sapması (%RSD) ve geri kazanım (%GK) oranları Microsoft Excel programı kullanılarak hesaplandı. Günler arası tekrar edilebilirlik için ise aynı konsantrasyonlardaki maddeleri içeren 3'er örnek hazırlandı ve farklı bir günde analiz edildi. Gün içi ve günler arası

tekrar edilebilirlik karşılaştırılması için *student's t-test* uygulandı. %95 güven aralığında p=0,05 değerine göre aralarında istatistiksel açıdan anlamlı fark olup olmadığı değerlendirildi.

3.5.Çalışma Basamakları

3.5.1. Yumurta Taşıma Prosedürü

Yumurtalar İ.Ü-Cerrahpaşa TÜBİTAK Biyoterapi Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı'ndan alınıp; kapalı bir kutu içerisinde bulunan termos içinde İ.Ü-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Toksikoloji Laboratuvarı'na getirildi. Termosun içine portatif bir termometre konuldu ve ortamın sıcaklık değişimi kaydedildi.

3.5.2. Besiyerinin Hazırlanması

Taşınan *Lucilia sericata* yumurtalarının besleneceği tavuk ciğeri ile hazırlanmış besiyerlerinin hazırlanışı aşağıdaki gibidir.

- Kasaptan alınan taze tavuk ciğeri işlemlerden önce bozunmaması için +4 °C'de bekletildi.
- 1300 mL distile su kaynatıldı.
- Bir (1) kg taze tavuk ciğeri küçük parçalara ayrılarak bir parçalayıcı yardımı ile homojenize edildi.
- Sıvı bir forma yaklaşması ve parça et kalmamasına özen gösterildi.
- Kaynamış distile suyun içine 40 g agar-agar eklendi ve hızlı bir şekilde karıştırıldı.
- Sıvı kıvama gelen tavuk ciğeri, su-agar karışımının üstüne eklendi.
- Bu karışım parçalayıcı yardımı ile yeniden homojenize hale getirildi.
- Hazırlanmış besiyeri 1 L'lik cam şişeler içine koyularak 121 °C'de otoklava alınıp steril hale getirildi. Otoklava yerleştirilmeden cam şişelerin ağızlarında hafif bir boşluk olmasına dikkat edildi.

3.5.3. Besiyerinin Dökülmesi, Yumurta Sayımı ve Yumurtaların Besiyerine Ekimi

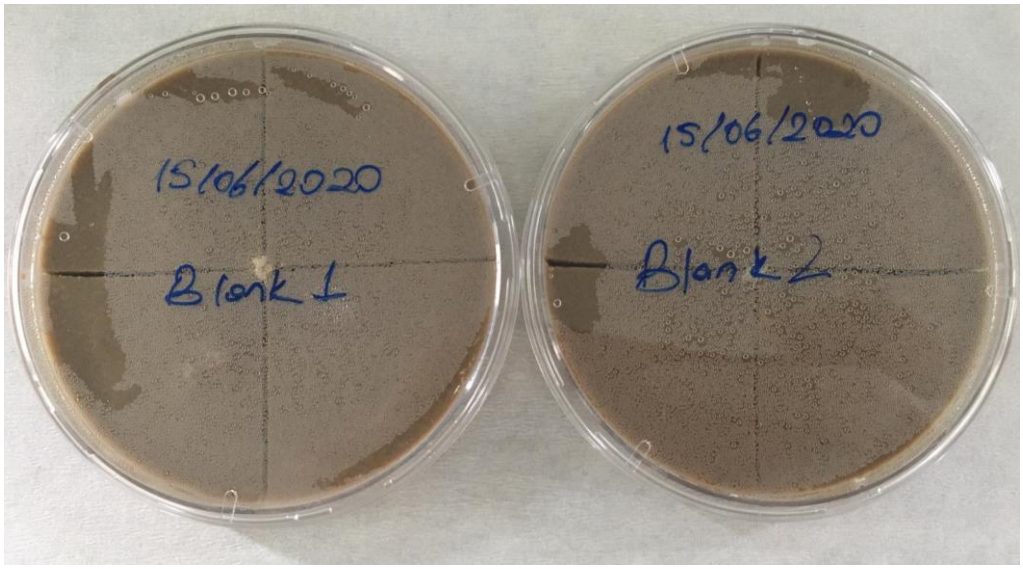
Her yumurta ekimi öncesi cam şişedeki besiyeri otoklavlanarak sterilizasyon sağlandı. Cam şişenin yanında ekim sırasında ihtiyaç olacak pensler de aynı şekilde steril edildi.

- Besiyerinin petri kaplarına dökülmesi ve yumurtaların besiyerine ekim işlemlerinin tümü çeker ocak altında, steril bir ortamda, nitril eldiven kullanılarak gerçekleştirildi.
- Cam şişelerden 50 mL'lik falkon tüplere 40 mL alınıp hassas terazi ile tartılan besiyerleri; üstünde o günkü çalışmanın konsantrasyonları ve tarihi yazılı olan 90x17 mm boyutlarındaki petri kaplarına döküldü.
- Çalışmalarda As için 50, 25, 12.5, 7.5, 5, 2.5, 1 ve 0.5 ppm (µg/mL) konsantrasyonları; Cd için 50, 25, 15, 12.5, 7.5, 5, 2.5, 1, 0.5 µg/mL konsantrasyonları içeren besiyerleri hazırlandı. Petriler, besiyeri miktarı ile birlikte, besiyerine eklenen 1000 µg/mL'lik stok As ve Cd çözeltilerinin toplam hacmi 40 mL olacak şekilde hazırlandı. Stok çözeltilerinden petriye eklenen As ve Cd hacimleri konsantrasyona bağlı olarak Tablo VI'da verilmiştir.

Tablo VI: Besiyerine eklenen As ve Cd hacimleri

Konsantrasyonlar (µg/mL)	**Arsenik (mL)**	**Kadmiyum (mL)**
50	2	2
25	1	1
15	-	0,6
12,5	0,5	0,5
7,5	0,3	0,3
5	0,2	0,2
2,5	0,1	0,1
1	0,04	0,04
0,5	0,02	0,02

- Petrilerin kapakları hemen kapatılmadı ve sıcak besiyerinin kapakta buhar oluşturması engellendi.
- Sıcaklığı azalınca kapakları kapatılan besiyerleri +4 °C'de buzdolabında muhafaza edildi. Bir (1) dk. içinde besiyerleri dondu ve katı bir hale geldi. Katı hale gelen besiyerleri yeniden tartılarak ağırlık değişimi gözlendi. Yumurta ekimi yapılmadan önce 5-10 dk. oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
- Çeker ocak altına alınan besiyerleri pens yardımıyla 4 eşit parçaya ayrıldı (Şekil 20). Bu işlem yumurtaların açıldığında larvaların besiyerine daha kolay penetre olması için gereken bir adımdır.



Şekil 20 : Yumurta ekimi yapılmış besiyeri

Yumurtalar besiyerlerine ekilmeden önce mikroskop altında sayımları yapıldı. Yumurta sayımı yaparken Thoma lamı kullanıldı. Thoma lamı, daha çok eritrosit-lökosit sayımlarında kullanılan bir lam olmasına, yumurtalar Thoma lamı üzerindeki kareler ve Thoma formülü ile hesaplanamayacak kadar büyük olmasına karşın; üstündeki bu kareler yumurtaların lam üzerinde daha net görülmesini ve fiziksel (göz ile) sayımın daha başarılı olmasını sağladığı için kullanıldı.

- Yumurtalar bir damla steril distile su ile birbirinden ayrıldı ve Thoma lamına döküldü.
- Stereo mikroskop altında 4x ve 10x büyütmede sayım yapıldı.
- Sayımdan sonra elde edilen yumurta öbeği pens yardımıyla besiyerinin tam ortasına ekildi.
- Hazırlanan her petriye ≈100 yumurta ekildi. Yumurta sayısına bağlı olmak koşulu ile her bir element için aynı konsantrasyonda 2 farklı petriye eş zamanlı ekim yapıldı.
- Kontaminasyondan kaçınmak için As ve Cd elementlerini içeren besiyerleri ve herhangi bir analit içermeyen blank besiyerleri daha önceden 30 °C'ye ayarlanmış 3 farklı etüv içerisinde inkübasyona bırakıldı.

3.2.4. İnkübasyon

Örnekler etüvde 30 °C'de üstü tül ile örtülü kutular içerisinde 72 saat boyunca 3. evre larva gelişene kadar Şekil 21'deki gibi inkübe edildi.



Şekil 21 : İnkübasyona hazır petri kutusu

Petriler her 24 saatte bir yumurtaların açılıp açılmadığını kontrol etmek üzere gözlemlendi.

3.2.5. Larvaların Toplanması, Ölçümü ve Tartımı

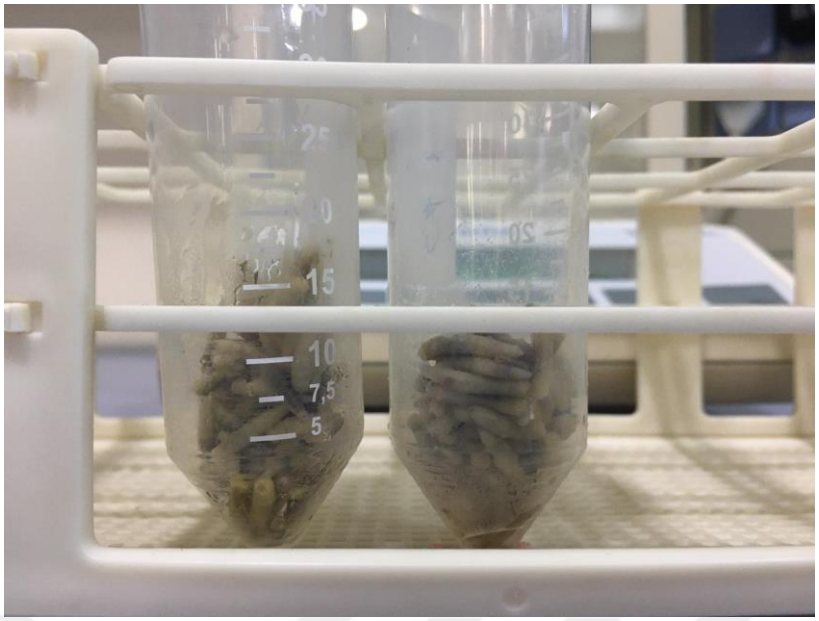
72 saat sonunda inkübasyon sonlandırıldı. Gelişen 3. evre larvalar çeker ocak altında pens yardımıyla toplandı (Şekil 22-23). Her petri için ayrı kodlanan 50 mL'lik falkon tüpler içerisine alındı. Sağkalım hesaplaması için Şekil 24'teki gibi falkon tüpler içerisine alınırken sayımları yapıldı ve yüzde değerleri hesaplandı.



Şekil 22: Besiyerindeki 3. evre larvalar

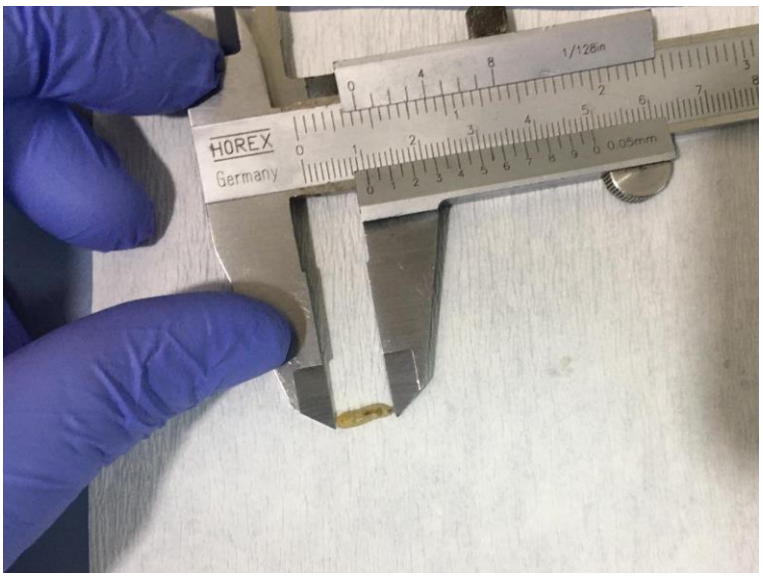


Şekil 23 : Larvaların alınmasından sonraki besiyeri görünümü



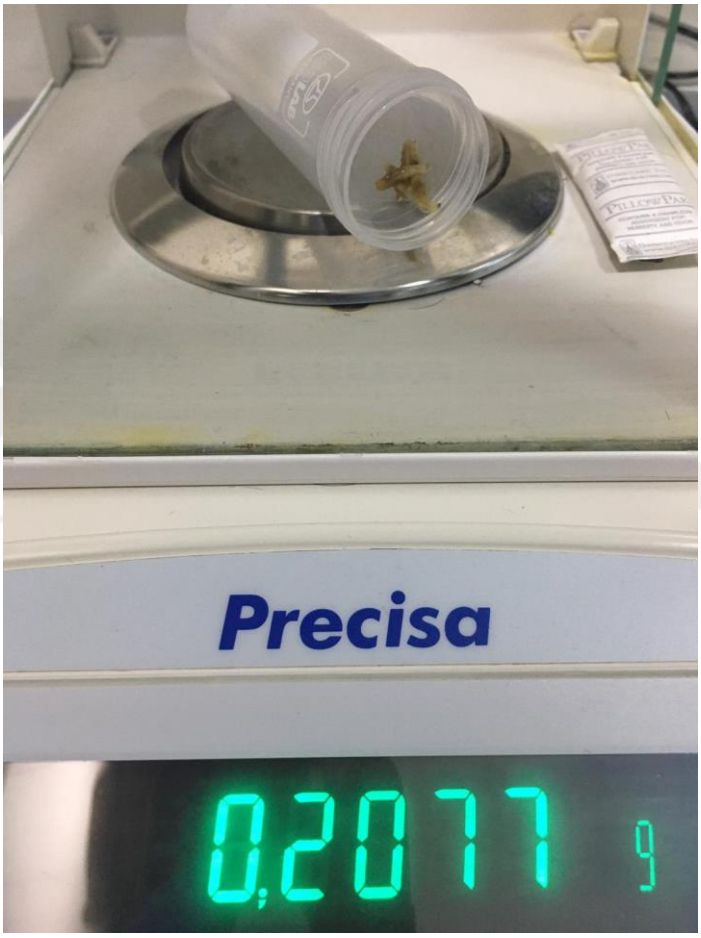
Şekil 24 : Besiyerinden tüplere alınan larvalar

As ve Cd içeren besiyerinde büyüyen larvalar ile blank besiyerinde büyüyen larvalar arasında karşılaştırma yapabilmek adına boy ölçümleri yapıldı. Her petriden (Blank, As, Cd) ayrı ayrı 5 rastgele larva seçilip mekanik kumpas yardımıyla boyları Şekil 25'teki gibi ölçüldü. Seçilen larvaların boy ortalaması alındı ve not edildi.



Şekil 25 : Kumpas ile larvaların boy ölçümü

Analiz edilecek örnekler için 200, 100 ve 50 mg olmak üzere 3 farklı numune miktarı belirlendi. Her petriden gelen larvalar ayrı ayrı hassas terazi altında tartılarak belirlenen numune hazırlandı (Şekil 26). Tüm analizlerde 200 mg numune ≈4-5 larvaya, 100 mg ≈2-3 larvaya, 50 mg ise 1 larvaya karşılık geldi. Farklı numune miktarlarının seçilmesinin sebebi larva sayısı ile analiz edilen As ve Cd konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi gözlemlemektir. Bu nedenle tek 1 larvayı temsil eden 50 mg numune miktarı çalışmada önemlidir.



Şekil 26 : Larvaların hassas terazideki tartımı

Tartım basamağında hata olmaması için, tüm larvalar 2 kez distile su ile yıkanarak kurutma kâğıdında ıslaklığı giderilene kadar kurutuldu. Larvalar hem üstüne yapışıp gelebilecek eriyik besiyerinden, hem de üstünde kalabilecek inorganik As ve Cd'dan

arındırıldı. Böylece besiyerinden gelecek As ve Cd'a bağlı dış kontaminasyon elemine edilmiş oldu.

3.2.6. Örneklerin Analize Hazırlanması

Yukarıda bahsedildiği gibi tartımları yapılıp 200, 100 ve 50 mg şeklinde porsiyonlanan 3. evre larvaların içinde bulunduğu 50 mL'lik falkon tüplere reaksiyon hızlandırıcı olarak 5 mL %65'lik nitrik asit (HNO_3), 2 mL hidrojen peroksit (H_2O_2) eklendi. Tüpler tüp sporlarına yerleştirildikten sonra daha önceden 95 °C'ye ısıtılmış etüv içerisine alındı.

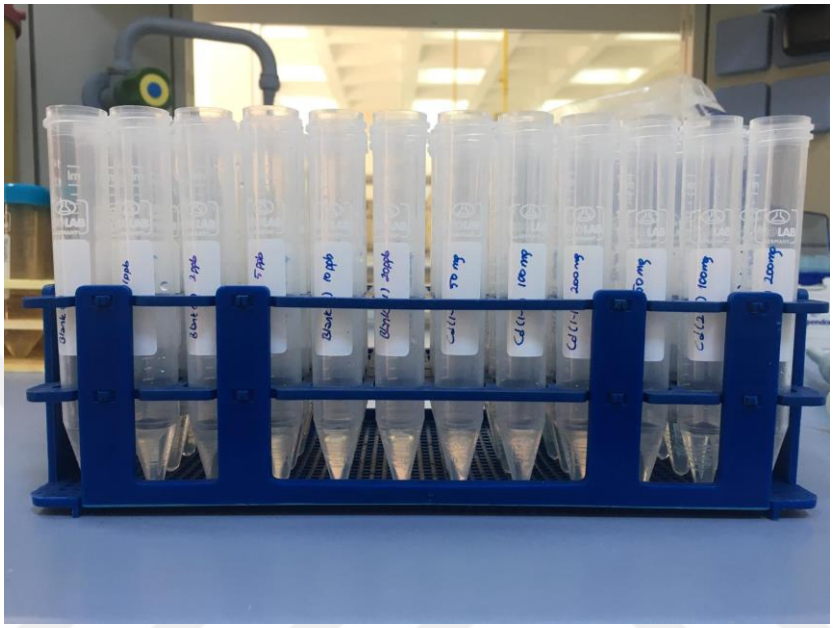
Reaksiyondan oluşacak asit buharı ile olası bir patlama yaşanmaması adına, tüplerin kapakları tam olarak kapatılmadı. Örnekler 1 saat boyunca 95 °C'de Şekil 27'deki gibi reaksiyona bırakıldı.



Şekil 27 : Yaş yakma için hazır hale gelmiş örnekler

Bir saat sonra etüvden çıkarılan örnekler analizden önce santrifüj edildi ve larvanın kitinize dış kabuğu gibi asitte zor eriyebilen olası tortuların dibe çökmesi sağlandı. Tortunun üstünde kalan sıvı faz otomatik pipet yardımıyla 50 mL'lik yeni falkon tüplere aktarıldı.

Örnekler %2'lik HNO_3 ile 20 mL'ye tamamlanarak seyreltildi. Vortekslendikten sonra örneklerden otomatik pipet ile 1 mL alınıp Şekil 28'deki 15 mL'lik falkon tüplere aktarıldı. Üzerlerine 100 µL, In ve Ga içeren iç standart (IS) çözeltisi eklendi. Örnekler ultra saf su ile 10 mL'ye tamamlanarak seyreltildi ve analiz edildi.



Şekil 28 : 15 mL'lik falkona aktarılan 1 mL numune

3.2.7. Sonuç Hesaplama Yöntemi

ICP-MS analizi sonrası elde edilen ham verilerden, numune miktarı ve seyreltme faktörlerinin dikkate alındığı bir hesaplama yöntemi kullanılarak bulgular elde edildi. Kullanılan formül Tablo VII'de gösterildi. Hesaplama yönteminde ham sonuç kısmına ICP-MS sisteminden alınan değer (ng/mL cinsinden), ağırlık kısmına g cinsinden numune miktarı, seyreltme kısmına ise (SEY1, SEY2) numunenin analiz öncesinde hazırlanırken seyreltildiği hacimler kullanıldı. Larva katı formda olduğundan hesaplanan sonuç µg/g cinsinden elde edildi.

Tablo VII : Ham verilerin hesaplanması

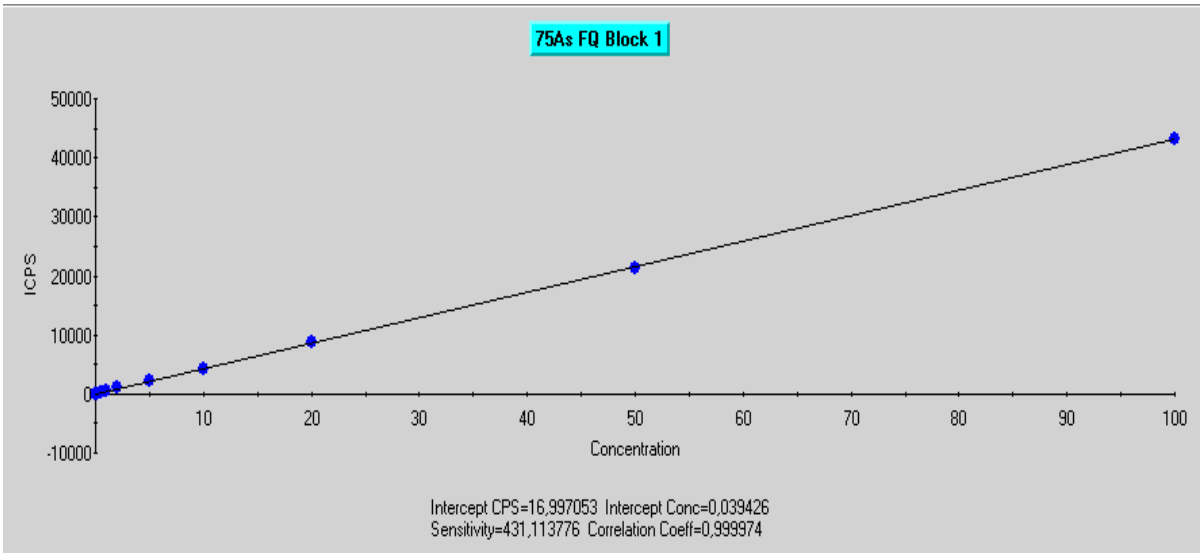
	SONUÇLAR							
	Ham Sonuç (ng/mL)	**ng/mL ise 1000**	**Ağırlık (g)**	**SEY1**	**SEY1-1**	**SEY2**	**SEY2-2**	**Hesaplanan Sonuç µg/g**
75As		1000	?	1	20	1	10	0,000
111Cd		1000	?	1	20	1	10	0,000

4. BULGULAR

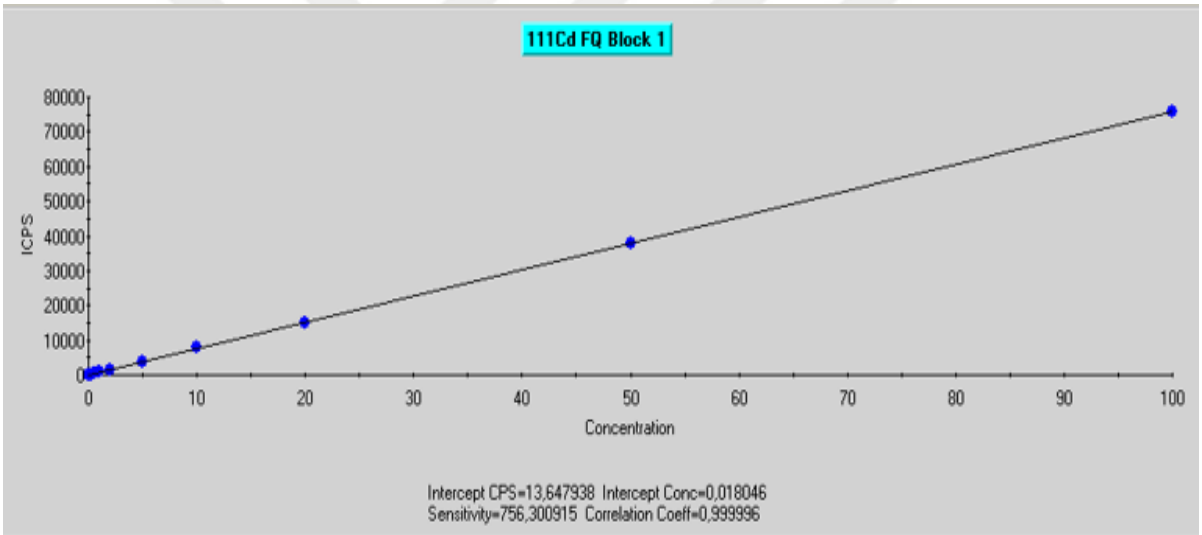
Bu çalışmada As ve Cd'un farklı konsantrasyonlarını içeren besiyerinde yetişen 3. evre larvaların ICP-MS ile analizi için bir yöntem geliştirildi. Çalışmanın kontrollü bir şekilde yürütülmesi için herhangi bir analit içermeyen besiyerinde yetişen blank larvalar kullanıldı. Her farklı besiyerinde yetişen larvaların boyları, sağkalım oranları belirlendi. Örnek hazırlama ve ICP-MS yöntemlerinin geçerlilik çalışmaları yapıldıktan sonra ise larvaların içerdiği analit konsantrasyonları belirlenerek değerlendirildi.

Yöntemin doğrusallık çalışmaları için 2 farklı kalibrasyon eğrisi elde edildi. Bunlardan ilki matriks içermeyen kalibrasyon çözeltisinden elde edilen kalibrasyon eğrisi, ikincisi ise larva matriksine standart ekleme yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisiydi.

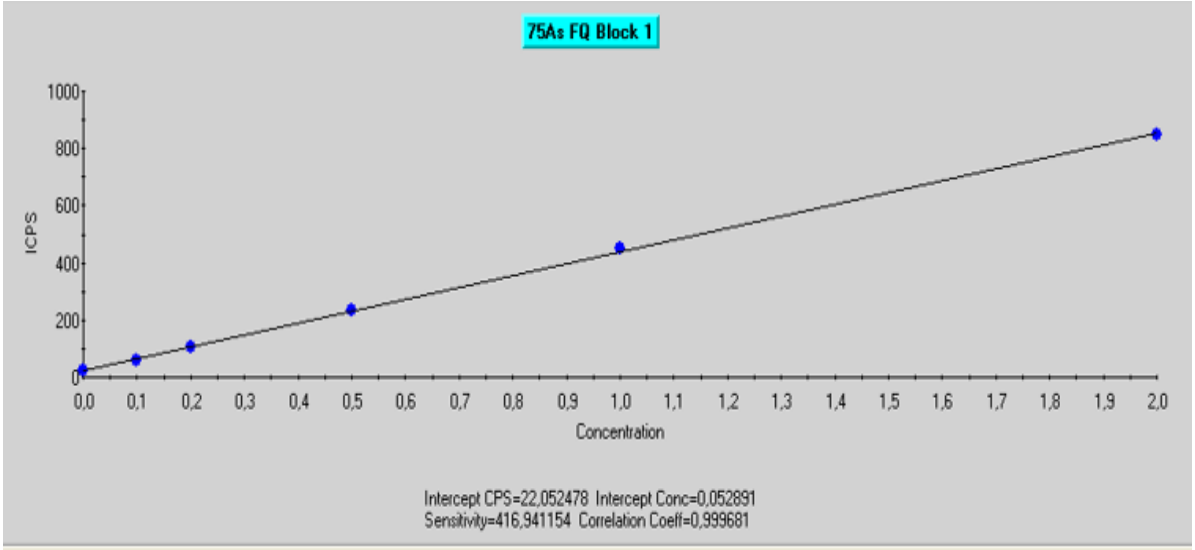
Arsenik ve kadmiyum elementlerine ait artan konsantrasyonlarda hazırlanan kalibrasyon çözeltilerinin ICP-MS analizi sonrasında doğrusal kalibrasyon eğrileri elde edildi. Kalibrasyon çözeltisi ile elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 29 ve Şekil 30'da, larva matriksi ile elde edilen kalibrasyon eğrileri ise Şekil 31 ve Şekil 32'de gösterildi. Her iki doğrusallık çalışmasından elde edilen kalibrasyon eğrilerinde As ve Cd için korelasyon katsayılarının >0,999 olduğu bulundu. Her iki analitin de doğrusal aralıkları kalibrasyon çözeltisi ile yapılan kalibrasyon eğrisi için 0,1-100 ng/mL, larva matriksi ile yapılan kalibrasyon eğrisi için 1-20 ng/mL'dir.



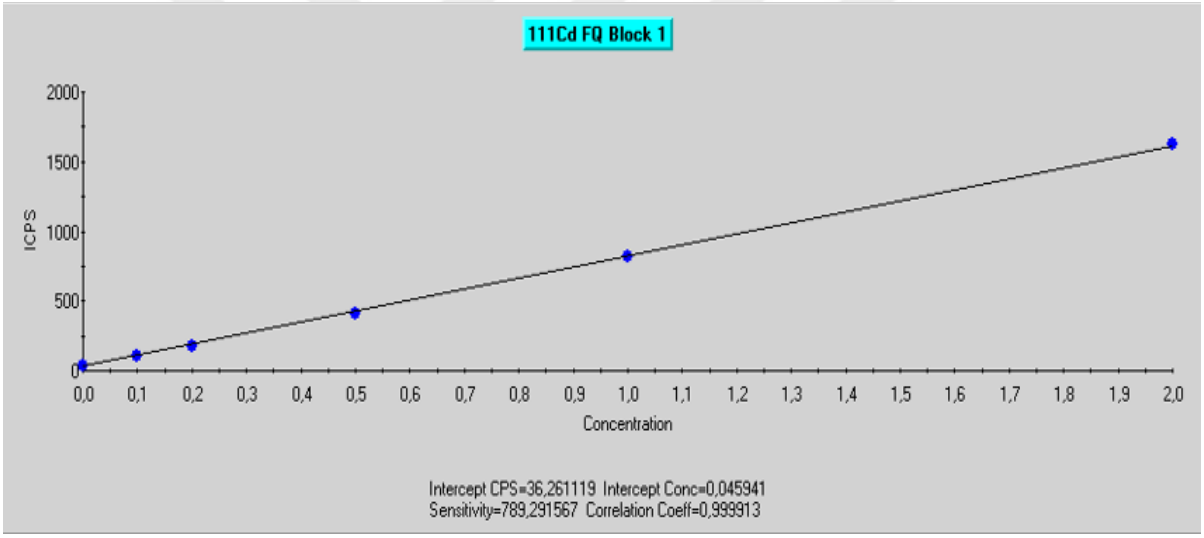
Şekil 29: Arseniğin kalibrasyon çözeltisi ile yapılan kalibrasyon eğrisi



Şekil 30 : Kadmiyumun kalibrasyon çözeltisi ile yapılan kalibrasyon eğrisi



Şekil 31 : Arseniğin larva matriksi ile yapılan kalibrasyon eğrisi

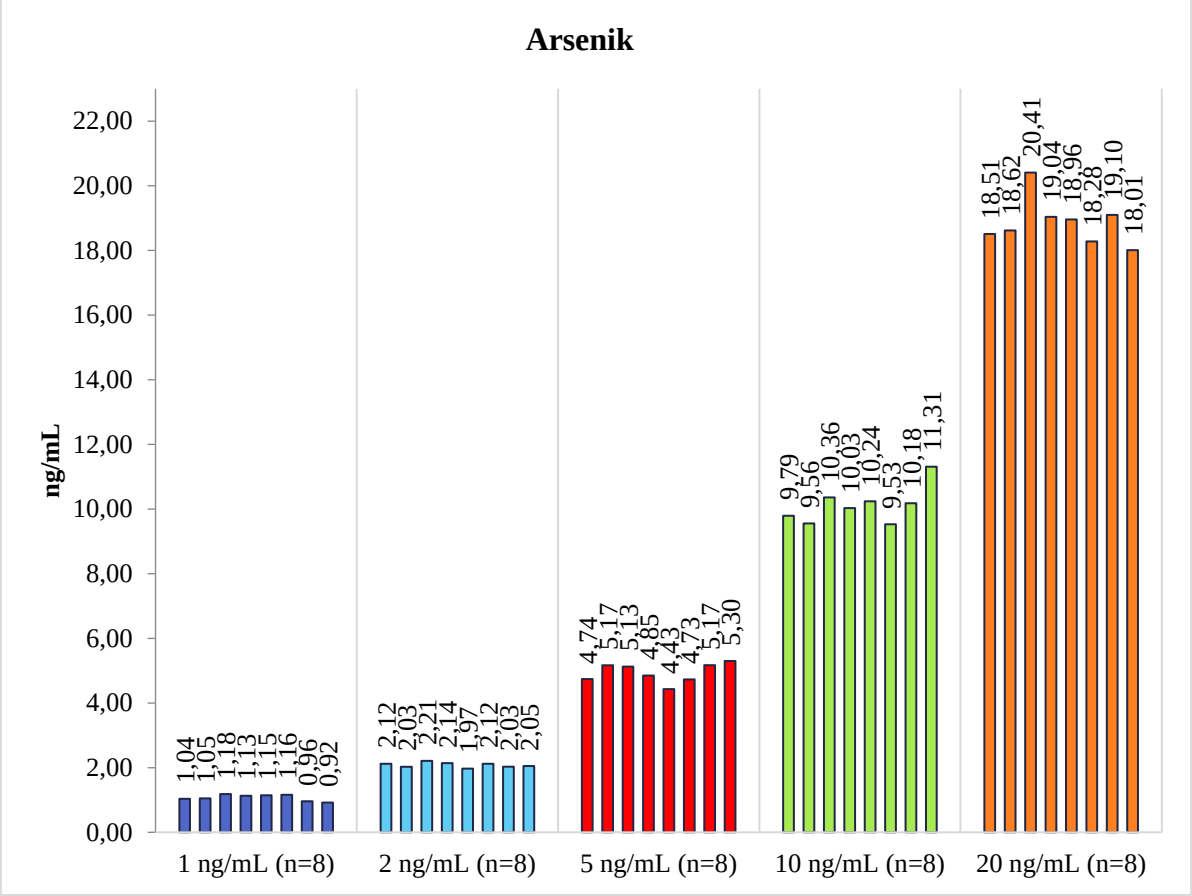


Şekil 32 : Kadmiyumun larva matriksi ile yapılan kalibrasyon eğrisi

LOD ve LOQ belirlenmesi için yapılan çalışma sonuçlarına göre; kalibrasyon çözeltisi ile yapılan kalibrasyon eğrisine göre elde edilen As'in LOD değeri 0,02 ng/mL, LOQ değeri ise 0,08 ng/mL; Cd'un LOD değeri 0,003 ng/mL, LOQ değeri ise 0,01 ng/mL'dir. Larva matriksi ile yapılan kalibrasyon eğrisine göre elde edilen As'in LOD değeri 0,059 ng/mL, LOQ değeri ise 0,132 ng/mL; Cd'un LOD değeri 0,027 ng/mL, LOQ değeri ise 0,067 ng/mL'dir.

Her bir analit için 1, 2, 5, 10 ve 20 ng/mL konsantrasyonlarında gerçekleştirilen tekrar edilebilirlik ve geri kazanım çalışmalarının sonuçları aşağıda detaylıca anlatıldı.

Arseniğin farklı konsantrasyonlarına ait gün içi tekrar edilebilirlik analiz sonuçları ve ortalamaları Şekil 33'te gösterildi. Bu analizlere ait bulgular, STD, %RSD, %GK değerleri ise Tablo VIII'de sunuldu. ICP-MS sistemini kullanarak uygulanan yöntemde 5 farklı geri kazanım çalışmasının sonuçları %94,33-107,38 arasında, %RSD değerleri ise %3,46-8,51 arasında bulundu. STD değerleri ise ≤0,68 bulunan çalışma, örnek hazırlama verimliliği ve gün içi tekrar edilebilirlik parametreleri için uygun bulundu.

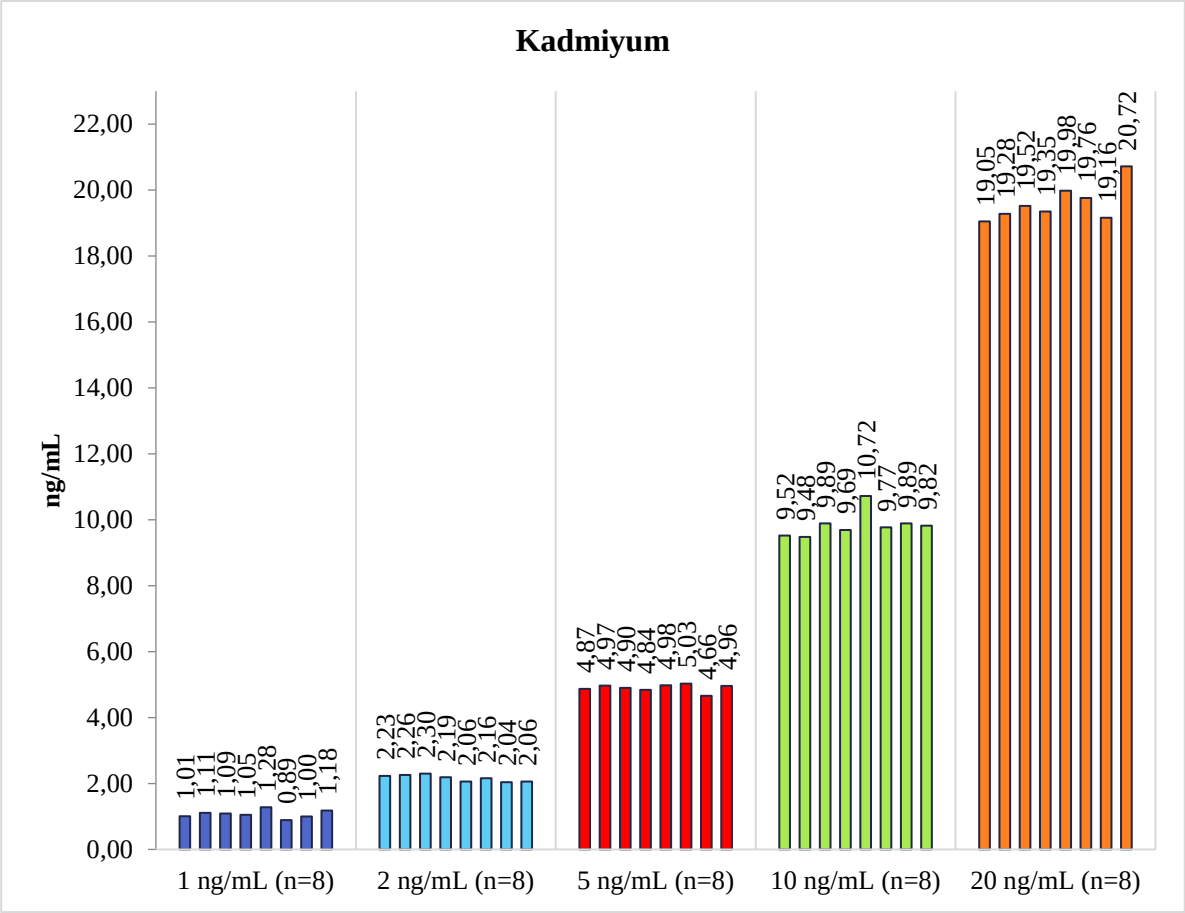


Şekil 33 : Arseniğin farklı konsantrasyonlarına ait gün içi tekrar edilebilirlik analiz sonuçları

Tablo VIII: Arseniğin farklı konsantrasyonlarına ait gün içi tekrar edilebilirlik, ORT, STD, %RSD ve %GK değerleri

Analiz No.	1 ng/mL	2 ng/mL	5 ng/mL	10 ng/mL	20 ng/mL
1. Analiz	1,04	2,12	4,74	9,79	18,51
2. Analiz	1,05	2,03	5,17	9,56	18,62
3. Analiz	1,18	2,21	5,13	10,36	20,41
4. Analiz	1,13	2,14	4,85	10,03	19,04
5. Analiz	1,15	1,97	4,43	10,24	18,96
6. Analiz	1,16	2,12	4,73	9,53	18,28
7. Analiz	0,96	2,03	5,17	10,18	19,1
8. Analiz	0,92	2,05	5,3	11,31	18,01
ORT	1,07	2,08	4,94	10,12	18,87
STD	0,09	0,07	0,28	0,53	0,68
%RSD	8,51	3,46	5,65	5,27	3,62
%GK	107,38	104,19	98,8	101,25	94,33

Kadmiyumun farklı konsantrasyonlarına ait gün içi tekrar edilebilirlik analiz sonuçları ve ortalamaları Şekil 34'te gösterildi. Bu analizlere ait bulgular, STD, %RSD, %GK değerleri ise Tablo IX'da sunuldu. ICP-MS sistemini kullanarak uygulanan yöntemde 5 farklı geri kazanım çalışmasının sonuçları %97,98-108,16 arasında, %RSD değerleri ise %2,22-10,36 arasında bulundu. STD değerleri ise ≤0,51 bulunan çalışma, örnek hazırlama verimliliği ve gün içi tekrar edilebilirlik parametreleri için uygun bulundu.

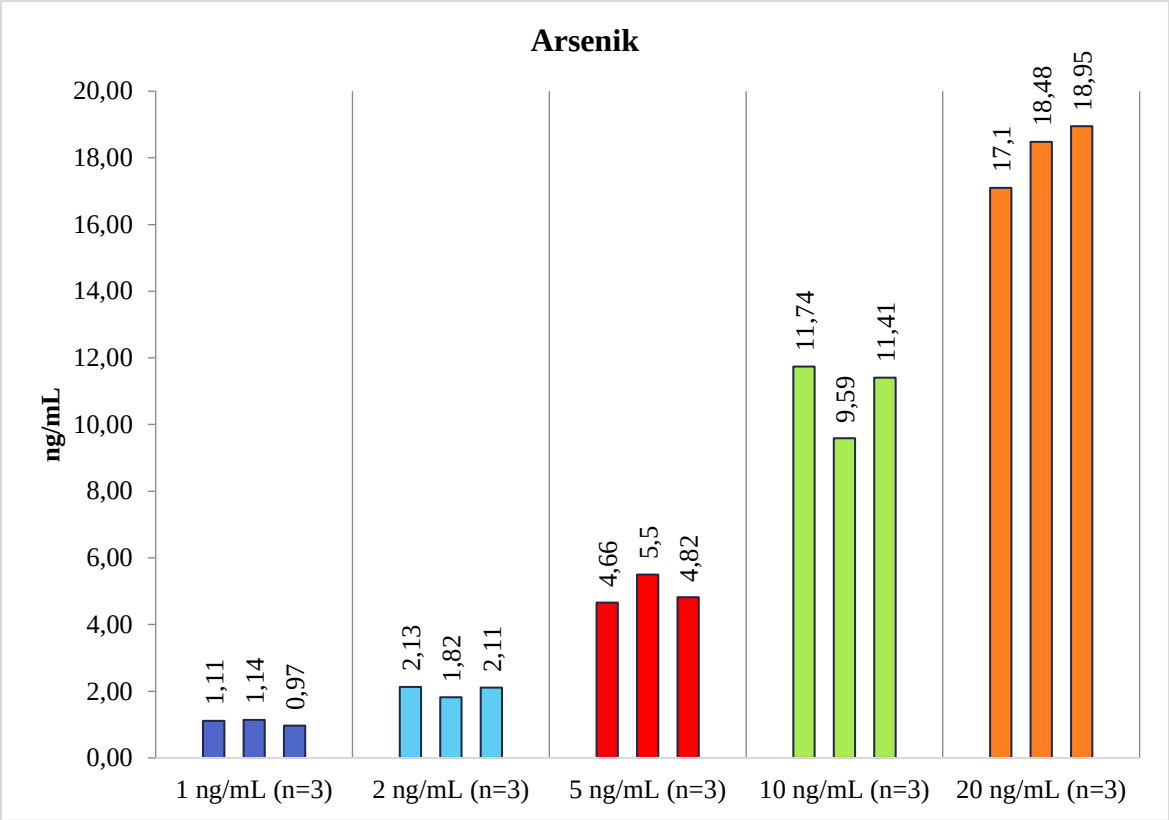


Şekil 34 : Kadmiyumun farklı konsantrasyonlarına ait gün içi tekrar edilebilirlik analiz sonuçları

Tablo IX: Kadmiyumun farklı konsantrasyonlarına ait gün içi tekrar edilebilirlik, ORT, STD, %RSD ve %GK değerleri

Analiz No.	1 ng/mL	2 ng/mL	5 ng/mL	10 ng/mL	20 ng/mL
1. Analiz	1,01	2,23	4,87	9,52	19,05
2. Analiz	1,11	2,26	4,97	9,48	19,28
3. Analiz	1,09	2,3	4,9	9,89	19,52
4. Analiz	1,05	2,19	4,84	9,69	19,35
5. Analiz	1,28	2,06	4,98	10,72	19,98
6. Analiz	0,89	2,16	5,03	9,77	19,76
7. Analiz	1	2,04	4,66	9,89	19,16
8. Analiz	1,18	2,06	4,96	9,82	20,72
ORT	1,08	2,16	4,9	9,85	19,6
STD	0,11	0,09	0,11	0,36	0,51
%RSD	10,36	4,33	2,22	3,65	2,61
%GK	107,59	108,16	97,98	98,47	98,01

Arseniğin farklı konsantrasyonlarına ait günler arası tekrar edilebilirlik analiz sonuçları ve ortalamaları Şekil 35'te gösterildi. Bu analizlere ait bulgular, STD, %RSD, %GK değerleri ise Tablo X'da sunuldu. ICP-MS sistemini kullanarak uygulanan yöntemde 5 farklı geri kazanım çalışmasının sonuçları %90,88-109,13 arasında, %RSD değerleri ise %4,32-8,66 arasında bulundu. STD değerleri ise ≤0,95 bulunan çalışma, örnek hazırlama verimliliği ve günler arası tekrar edilebilirlik parametreleri için uygun bulundu.

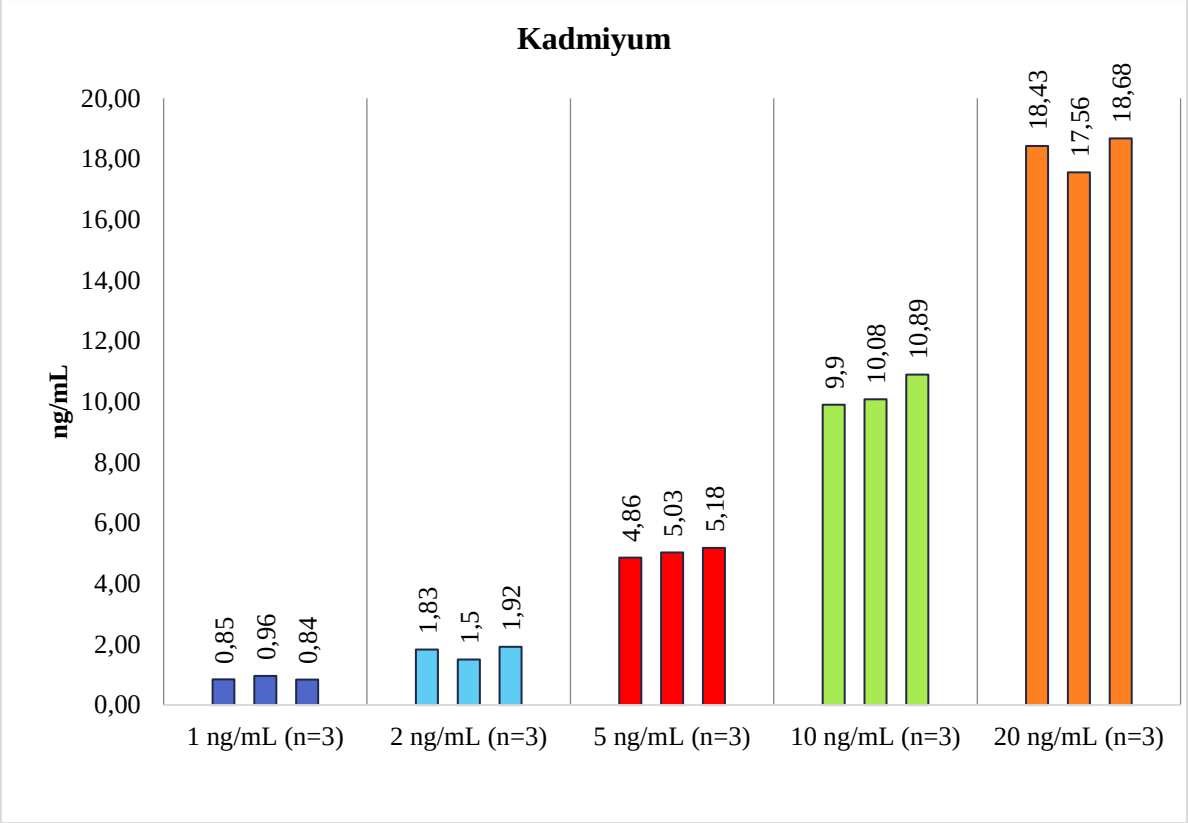


Şekil 35 : Arseniğin farklı konsantrasyonlarına ait günler arası tekrar edilebilirlik analiz sonuçları

Tablo X: Arseniğin farklı konsantrasyonlarına ait günler arası tekrar edilebilirlik, ORT, STD, %RSD ve %GK değerleri

Analiz No.	1 ng/mL	2 ng/mL	5 ng/mL	10 ng/mL	20 ng/mL
1. Analiz	1,11	2,13	4,66	11,74	17,1
2. Analiz	1,14	1,82	5,5	9,59	18,48
3. Analiz	0,97	2,11	4,82	11,41	18,95
ORT	1,07	2,02	4,99	10,91	18,18
STD	0,07	0,14	0,36	0,95	0,79
%RSD	6,9	7,01	7,29	8,66	4,32
%GK	107,33	101	99,87	109,13	90,88

Kadmiyumun farklı konsantrasyonlarına ait günler arası tekrar edilebilirlik analiz sonuçları ve ortalamaları Şekil 36'da gösterildi. Bu analizlere ait bulgular, STD, %RSD, %GK değerleri ise Tablo XI'de sunuldu. ICP-MS sistemini kullanarak uygulanan yöntemde 5 farklı geri kazanım çalışmasının sonuçları %87,50-102,90 arasında, %RSD değerleri ise %2,6-10,32 arasında bulundu. STD değerleri ise ≤0,48 bulunan çalışma, örnek hazırlama verimliliği ve günler arası tekrar edilebilirlik parametreleri için uygun bulundu.



Şekil 36 : Kadmiyumun farklı konsantrasyonlarına ait günler arası tekrar edilebilirlik analiz sonuçları

Tablo XI: Kadmiyumun farklı konsantrasyonlarına ait günler arası tekrar edilebilirlik, ORT, STD, %RSD ve %GK değerleri

Analiz No.	1 ng/mL	2 ng/mL	5 ng/mL	10 ng/mL	20 ng/mL
1. Analiz	0,85	1,83	4,86	9,9	18,43
2. Analiz	0,96	1,5	5,03	10,08	17,56
3. Analiz	0,84	1,92	5,18	10,89	18,68
ORT	0,88	1,75	5,02	10,29	18,22
STD	0,05	0,18	0,13	0,43	0,48
%RSD	6,15	10,32	2,6	4,18	2,63
%GK	88,33	87,5	100,47	102,9	91,12

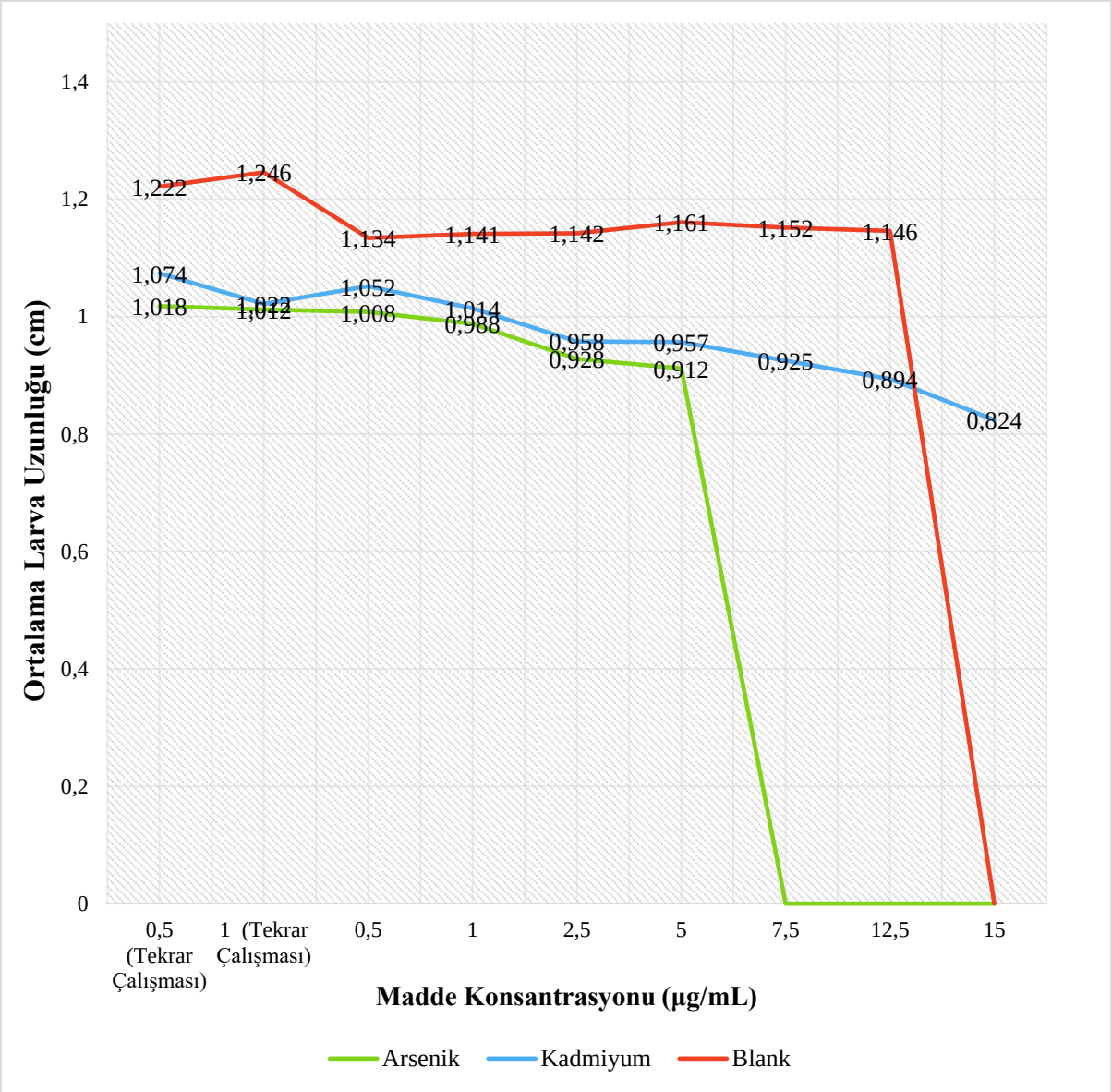
Gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik sonuçları her bir konsantrasyon için *student's t-test* ile değerlendirildiğinde, As için hiçbir konsantrasyonda istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0,05$; %95 CI). Cd için ise 1 ve 20 ng/mL konsantrasyonlarının günler arası bulguları arasında anlamlı fark bulundu ($p<0,05$; %95 CI), ancak, STD ve %RSD değerlerinin kabul edilebilir aralıkta olması ve %GK oranlarının da %80-120 arasında olması sebebiyle günler arası tekrar edilebilirlikte bulunan fark dikkate alınmadı.

Larvaların ortalama boyları, her bir petriden rastgele seçilen 5 larvanın uzunluklarının ölçülmesi ile hesaplandı. İçerdiği analit konsantrasyonuna göre hazırlanan ortalama larva boyları ve standart sapma değerleri Tablo XII'de gösterildi. Tabloda ayrıca içerisinde herhangi bir analit bulunmayan blank besiyerinde yetişen larvaların ortalama boyları da listelendi.

Tablo XII : Konsantrasyona bağlı ortalama larva uzunluğu

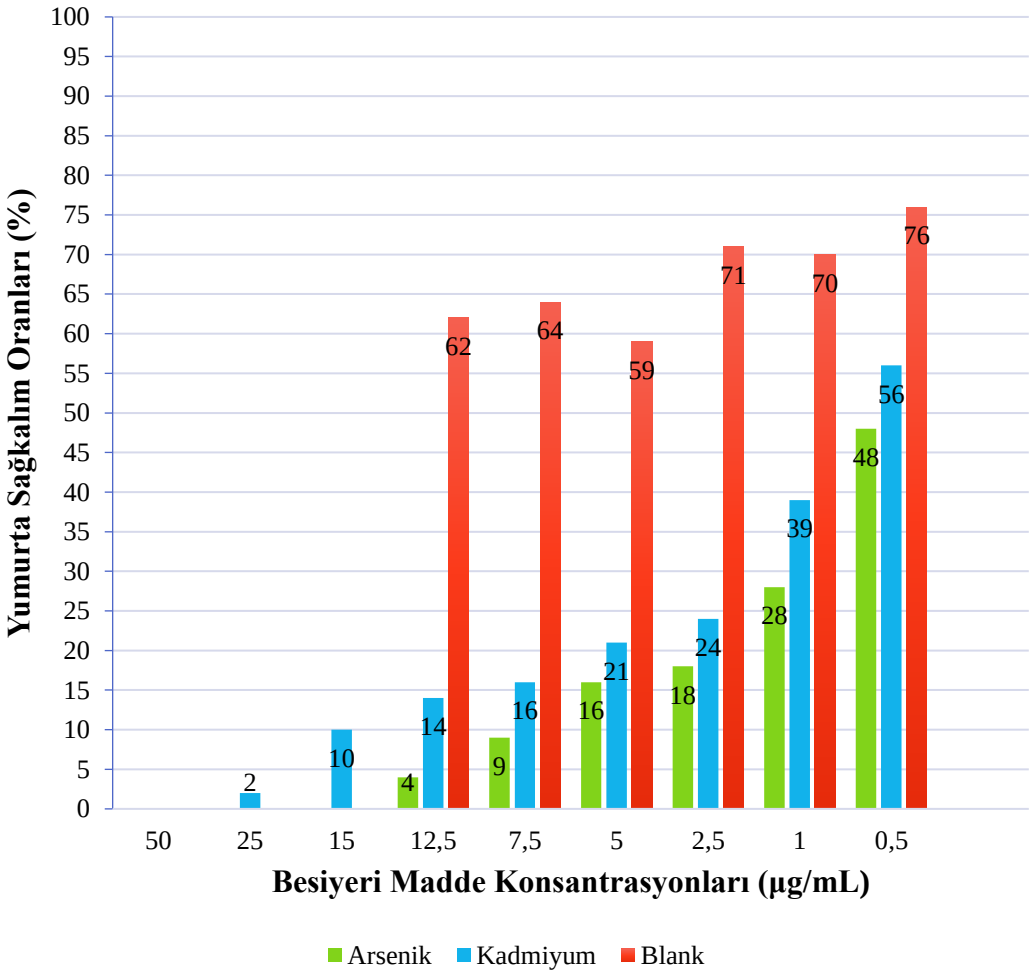
Konsantrasyon (µg/mL)	Ortalama Larva Uzunluğu (cm±STD)		
	Blank	**Arsenik**	**Kadmiyum**
15		-	0,824 ± 0,039
12,5	1,146 ± 0,095	-	0,894 ± 0,037
7,5	1,152 ± 0,099	-	0,924 ± 0,048
5	1,162 ± 0,070	0,912 ± 0,058	0,956 ± 0,055
2,5	1,142 ± 0,067	0,928 ± 0,048	0,958 ± 0,049
1	1,142 ± 0,067	0,988 ± 0,027	1,014 ± 0,132
0,5	1,134 ± 0,114	1,008 ± 0,570	1,052 ± 0,028
1 (Tekrar Çalışması)	1,246 ± 0,134	1,012 ± 0,062	1,022 ± 0,072
0,5 (Tekrar Çalışması)	1,222 ± 0,121	1,018 ± 0,049	1,074 ± 0,088

Şekil 37'de bu değerlerin artan konsantrasyonlara göre grafiksel ifadesine yer verildi. Tablo ve şekilden de anlaşılacağı üzere, içerdiği As ve Cd konsantrasyonu arttıkça larva boylarının azaldığı görüldü. Öte yandan blank besiyerinde yetişen larvaların boylarının ortalama değerinin 1,145 cm ve standart sapmasının 0,009 olduğu görüldü. As ve Cd içeren besiyerinde ve hiçbir analit içermeyen blank besiyerinde yetişen larvaların büyüklükleri *student's t-test* ile karşılaştırıldığında; Blank-As ve Blank-Cd serileri arasında istatiktiksel açıdan anlamlı fark bulunurken ($p<0.05$); As-Cd serileri arasında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil 37: Madde konsantrasyonuna bağlı ortalama larva uzunluğu

Larvaların sağkalım oranları değerlendirildiğinde, madde konsantrasyona bağlı yumurta sağkalım oranları karşılaştırmalı olarak Şekil 38'de gösterildi. Blank larva örneklerinde %59-76 arasında sağkalım oranı elde edildi. Madde konsantrasyonları azaldıkça As ve Cd içeren besiyerine ekilen yumurtaların sağkalım oranlarının doğrusal bir şekilde arttığı gözlendi. Her iki analit için de 0,5-50 µg/mL aralığındaki konsantrasyonları içeren besiyerleri ekilen yumurtalarda; As için en yüksek 12,5 µg/mL, Cd için ise en yüksek 25 µg/mL konsantrasyonda ilk sağkalımlar gözlendi. Her ne kadar As için ilk sağkalım 12,5 µg/mL (%4), Cd için 25 µg/mL (%2) olsa da yetişen larvaların 3. evreye tam olarak geçmedikleri ve analize uygun olmadıkları tespit edildi. As ve Cd için analize uygun ilk larvalar sırasıyla 5 µg/mL ve 15 µg/mL konsantrasyonunda elde edildi.



Şekil 38 : Madde konsantrasyonuna bağlı yumurta sağkalım oranları

Besiyerinde yetişen larvalardan elde edilen analiz sonuçları değerlendirildiğinde; yapılan tüm blank larva analizlerinde bulunan As ve Cd konsantrasyonları hesaplandı ve ortalama değerleri Tablo XIII'te verildi.

Tablo XIII : Blank örneklerinde bulunan As ve Cd değerleri

Blank	**Arsenik (ng/g)**	**Kadmiyum (ng/g)**
200 mg	0,061	0,026
	0,027	0,021
	0,097	0,007
	0,019	0,008
	0,024	0,036
	0,029	0,007
	0,066	0,027
	0,065	
	0,031	0,026
100 mg	0,146	0,016
	0,090	0,022
50 mg	0,148	0,016
	0,044	0,068
ORTALAMA	0,065	0,023
STD	0,024	0,010

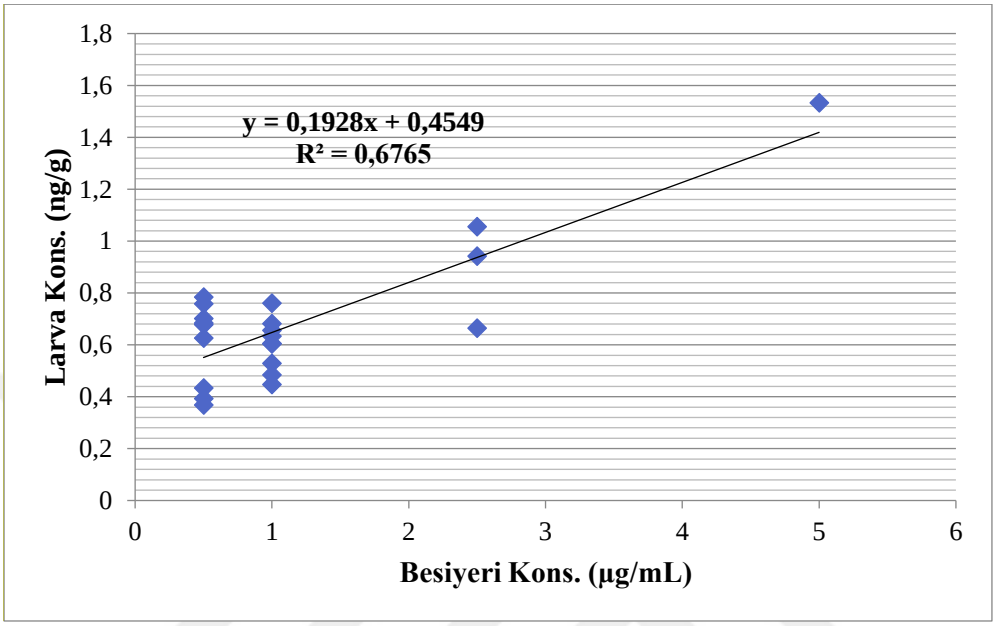
Arsenik için 0,5-1-2,5-5 µg/mL konsantrasyon içeren besiyerinde yetişen larvaların 200, 100 ve 50 mg numune miktarlarında yapılan analiz sonuçları Tablo XIV'te verildi.

Hesaplama, elde edilen verilerden Tablo XIII'te belirtilmiş olan blank larvalardaki ortalama As değeri (0,065) çıkarılarak, Tablo VII'deki geri hesaplama ile yapıldı. Tablo XIV'teki "TE" ifadesi aynı konsantrasyonda yapılmış tekrar çalışmasını temsil etmektedir. 5 µg/mL As içeren besiyerinde yetişen larva sayısı az olduğu için yalnızca 200 mg numune miktarı ile çalışıldı.

Tablo XIV: Arsenik analizlerinde elde edilen nihai sonuçlar

Element-(Petri)-Porsiyon-Konsantrasyon	Sonuç (µg/g)
AS-200MG-5 µg/mL	1,533
AS-200MG-2,5 µg/mL	0,664
AS-100MG-2,5 µg/mL	0,942
AS-50MG-2,5 µg/mL	1,056
AS-1-200MG-1 µg/mL	0,447
AS-1-100MG-1 µg/mL	0,656
AS-1-50MG-1 µg/mL	0,484
AS-2-200MG-1 µg/mL	0,529
AS-2-100MG-1 µg/mL	0,682
AS-2-50MG-1 µg/mL	0,760
AS-200MG-TE1 µg/mL	0,605
AS-100MG-TE1 µg/mL	0,634
AS-50MG-TE1 µg/mL	0,604
AS-1-200MG-0,5 µg/mL	0,393
AS-1-100MG-0,5 µg/mL	0,684
AS-1-50MG-0,5 µg/mL	0,678
AS-2-200MG-0,5 µg/mL	0,368
AS-2-100MG-0,5 µg/mL	0,434
AS-2-50MG-0,5 µg/mL	0,784
AS-200MG-TE0,5 µg/mL	0,626
AS100MG-TE0,5 µg/mL	0,758
AS-50MG-TE0,5 µg/mL	0,701

Besiyerinin içerdiği As konsantrasyonuna karşılık gelen larvalardaki As bulgularının grafiksel görüntüsü Şekil 39'daki gibidir, elde edilen doğrusallık formülünde korelasyon katsayısının 0,677 olduğu görülmektedir.



Şekil 39: Besiyerindeki As konsantrasyonuna göre elde edilen larva konsantrasyonlarının grafiği

Kadmiyum için 0,5-1-2,5-5-7,5-12,5,15 µg/mL konsantrasyon içeren besiyerinde yetişen larvaların 200, 100 ve 50 mg numune miktarlarında yapılan analiz sonuçları Tablo XV'te verildi. Hesaplama, elde edilen verilenden Tablo XIII'te belirtilmiş olan blank larvalardaki ortalama Cd değeri (0,023) çıkarılarak, Tablo VII'deki geri hesaplama ile yapıldı. Tablo XV'teki "TE" ifadesi aynı konsantrasyonda yapılmış tekrar çalışmasını temsil etmektedir.

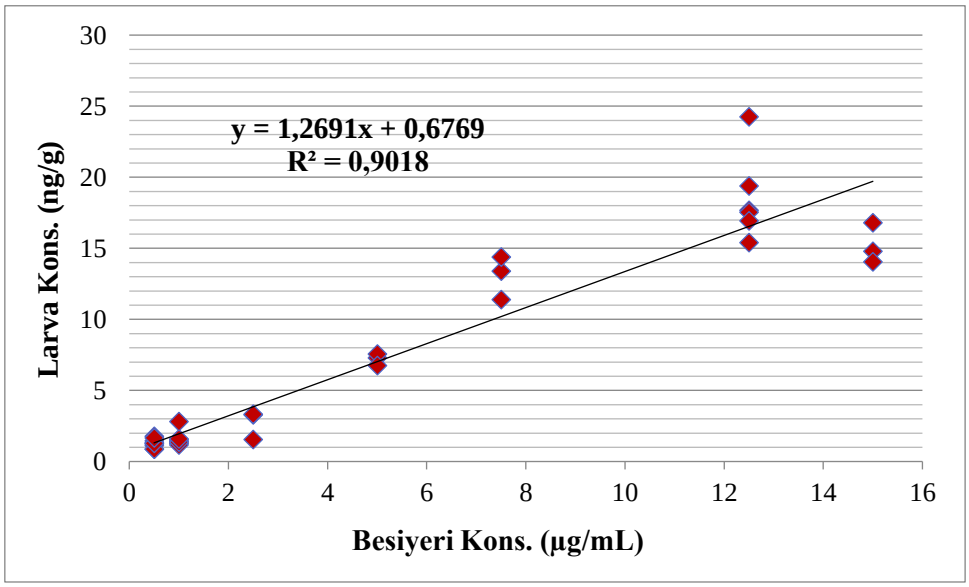
Tablo XV : Kadmiyum analizlerinden elde edilen nihai sonuçlar

Element-(Petri)-Porsiyon-Konsantrasyon	Sonuç (ng/g)
CD-200MG-15 µg/mL	14,784
CD-100MG-15 µg/mL	14,045
CD-50MG-15 µg/mL	16,790
CD-1-200MG-12,5 µg/mL	17,664
CD-1-100MG-12,5 µg/mL	15,389
CD-1-50MG-12,5 µg/mL	19,366
CD-2-200MG-12,5 µg/mL	17,534
CD-2-100MG-12,5 µg/mL	16,931
CD-2-50MG-12,5 µg/mL	24,234
CD-200MG-7,5 µg/mL	11,387
CD-100MG-7,5 µg/mL	13,391
CD-50MG-7,5 µg/mL	14,366
CD-200MG-5 µg/mL	7,282
CD-100MG-5 µg/mL	7,563
CD-50MG-5 µg/mL	6,738
CD-200MG-2,5 µg/mL	3,267
CD-100MG-2,5 µg/mL	3,317
CD-50MG-2,5 µg/mL	1,534
CD-1-200MG-1 µg/mL	1,409
CD-1-100MG-1 µg/mL	1,537
CD-1-50MG-1 µg/mL	1,298
CD-2-200MG-1 µg/mL	1,438
CD-2-100MG-1 µg/mL	1,253
CD-2-50MG-1 µg/mL	1,146

Tablo XV (devamı) : Kadmiyum analizlerinde elde edilen nihai sonuçlar

CD-200MG-TE1 µg/mL	1,369
CD-100MG-TE1 µg/mL	1,577
CD-50MG-TE1 µg/mL	2,806
CD-1-200MG-0,5 µg/mL	1,213
CD-1-100MG-0,5 µg/mL	1,451
CD-1-50MG-0,5 µg/mL	1,758
CD-2-200MG-0,5 µg/mL	0,865
CD-2-100MG-0,5 µg/mL	1,305
CD-2-50MG-0,5 µg/mL	1,118
CD-200MG-TE0,5 µg/mL	0,866
CD-100MG-TE0,5 µg/mL	1,265
CD-50MG-TE0,5 µg/mL	1,642

Besiyerinin içerdiği Cd konsantrasyonuna karşılık gelen larvadaki Cd bulgularının grafiksel görüntüsü Şekil 40'taki gibidir, elde edilen doğrusallık formülünde korelasyon katsayısının 0,902 olduğu görülmektedir.



Şekil 40 : Besiyerindeki Cd konsantrasyonuna göre elde edilen larva konsantrasyonlarının grafiği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ölümlü bir vakada bir olay yeri inceleme uzmanının en önemli görevi ölüm sebebine ulaşmaya yönelik delilleri tespit etmek, doğru şekilde toplanmasını ve transfer edilmesini sağlamaktır. Büyük oranda çürümüş halde olan cesetlerin yanı sıra orta veya hafif derecede çürümüş cesetlerde dahi ölüme ilişkin bulgular elde edilmesi oldukça zordur. Bu tür durumlarda nekrofajik böceklerin çürüyen cesetlerle olan ilişkisi genellikle muhtemel ölüm nedeni ile ilgili olarak yararlı bilgiler sağlayabilmektedir (75). Çürümüş bir bedenden alınan doku veya vücut sıvısı örnekleri ile yapılacak kimyasal ve toksikolojik incelemeler, her zaman doğru ve güvenilir sonuç vermeyebilir. Alternatif yöntemler arasında yer alan entomotoksikoloji, kimyasal ve toksikolojik araştırma gerektiren ancak sağlıklı biyolojik örneğe ulaşılamayan durumlarda oldukça faydalı bilgiler edinilmesine olanak tanır (70).

Her ne kadar adli entomotoksikolojiye ait ilk kayıtlar 1970'li yıllara dayansa da bu alandaki çalışmalar son 20 yılda hız kazanmıştır, araştırmalar genellikle ilaç etken maddeler, yasa dışı maddeler ve pestisitler üzerine yoğunlaşmıştır. Elementel entomotoksikoloji çalışmaları ise özellikle ateşli silah atış artığı alanında yapılmaktadır (75, 76).

Bu çalışmada As ve Cd gibi yüksek toksisite gösteren inorganik elementleri içeren besin kaynağı ile beslenen *Lucilia sericata* (Meigen) türü sinek larvalarının tayinine yönelik analitik bir yöntem geliştirilmiştir. Çalışmada, tavuk ciğeri ile hazırlanan besiyerleri belirli konsantrasyonlarda As ve Cd ile ayrı ayrı kirletilerek *Lucilia sericata* yumurtalarının bu besiyerlerinde büyümesi için uygun ortam sağlanmıştır. Gelişiminin 3. evresine gelen larvaların büyümesi durdurularak ICP-MS ile larvalardaki As ve Cd konsantrasyonları tayin edilmiştir.

Çalışmada, yumurtadan larva çıkışı gözlenen en yüksek As ve Cd konsantrasyonları, larvaların farklı konsantrasyonlardaki büyüklükleri, yüzde sağkalım oranları, farklı

konsantrasyonlarda analit içeren besiyerinde yetişen larvaların içerdiği As ve Cd miktarları ve ICP-MS'in tespit limitine bağlı olarak yumurtadan larva çıkışı gözlenen en düşük As ve Cd konsantrasyonları belirlenmiştir.

Elde edilen bulgulara göre As içeren besiyerinde yumurtadan larva çıkışı gözlenen en yüksek konsantrasyonun 5 µg/mL olduğu ve bu konsatrasyonda yetişen larvada tespit edilen As konsantrasyonunun ortalama 1,533 µg/g (n=1) olduğu bulunmuştur. En düşük konsantrasyon olan 0,5 µg/mL As içeren besiyerinde yetişen larvaların ortalama As konsantrasyonunun 0,603 µg/g (n=9) olduğu bulunmuştur.

Cd içeren besiyerinde yumurtadan larva çıkışı gözlenen en yüksek konsantrasyonun 15 µg/mL olduğu ve bu konsatrasyonda yetişen larvada tespit edilen Cd miktarının ortalama 15,206 µg/g (n=3) olduğu bulunmuştur. En düşük konsantrasyon olan 0,5 µg/mL Cd içeren besiyerinde yetişen larvaların ortalama Cd konsantrasyonunun 1,276 µg/g (n=9) olduğu bulunmuştur.

Çalışmada 200, 100 ve 50 mg olmak üzere üç farklı numune miktarı ile tekrarlı çalışmalar yapılmış, yapılan analizlerin değerlendirilmesi sonucu en güvenilir sonucun 200 mg numune miktarı ile yapılan analizler olduğu kanaatine varılmıştır.

50 mg numune miktarı ile yapılan çalışma ortalama 1 (bir) yetişkin larvanın ICP-MS ile analiz edilmesinden oluşmakta iken, 100 mg numune miktarı ise ortalama 2 (iki) yetişkin larvaya, 200 mg numune miktarı ise ortalama 4 (dört) yetişkin larvaya karşılık gelmektedir. Olay yerinde çürümüş bir cesedin vücut boşluklarında büyüyen larva sayısının oldukça fazla olacağı ve olay yeri inceleme ekiplerinin toplayacağı larva sayısı düşünüldüğünde, örnekleme için 200 mg larvanın (≈4-5 adet) uygun olacağı düşünülmektedir. Analiz sonuçlarına bakıldığında hem As hem de Cd için 50 ve 100 mg numune miktarı ile yapılan analizlerden birbirine yakın sonuçlar bulunmuş, artan konsantrasyona bağlı larvada tespit edilen madde

konsantrasyonun doğrusal bir şekilde artmadığı görülmüştür. Buna karşın 200 mg larva ile yapılan çalışmalarda daha güvenilir sonuçlar elde edildiği tespit edilmiştir.

İçerisinde herhangi bir element bulunmayan besiyerinde yetişen larvaların ICP-MS ile yapılan analiz sonuçlarına bakıldığında, blank larvalarda As 0,065±0,024 µg/g, Cd ise 0,023±0,010 µg/g bulunmuştur (n=13). Öte yandan larva matriksi ile yapılan kalibrasyon eğrisine göre elde edilen As'in LOQ değeri 0,132 ng/mL; Cd'un ise 0,067 ng/mL'dir. Dolayısı ile tek bir larva ile yapılan analizde matriks etkisinin daha fazla olacağı, ayrıca beslendiği ortamdaki madde miktarına bağlı olarak LOQ değerinin altında kalabileceği düşünülmektedir.

Blank besiyerinde yetiştirilen larvaların 6 farklı çalışmasının sağkalım ortalaması %66,3, standart sapması 6,947'dir. Yumurtaların İ.Ü-Cerrahpaşa TÜBİTAK Biyoterapi Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı'ndan alındıktan sonra Adli Toksikoloji Laboratuvarı'na gelmesinin yaklaşık 1,5 saat sürdüğü düşünüldüğünde, yumurta kalitesinde düşüklük olduğu düşünülebilir. Bunun yanı sıra larva taşınması sırasında yaşanan sıcaklık ve nem değişikliği, besiyerine ekiminden önce geçen süre vb. etkenler de sağkalım oranlarının düşük olmasına sebep olabilmektedir.

Öte yandan, birbirinden bağımsız zamanlarda gerçekleştirilen 6 farklı blank besiyeri ile yapılan çalışmadan elde edilen larvaların sağkalım oranlarının standart sapmalarının düşük olması da çalışmanın bu aşamasında tekrar edilebilir sonuçlar elde edildiğini ortaya koymaktadır. Aynı şekilde blank besiyerinde yetiştirilen larvaların büyüklerinin ortalama değerinin 1,145 cm ve standart sapmasının 0,009 olması gerçekleştirilen larva yetiştirme prosedürünün tekrar edilebilir olduğunu göstermektedir.

0,5 ve 1 µg/mL As ve Cd konsantrasyonları ile yapılan tekrar edilebilirlik çalışmalarında tatmin edici sonuçlar elde edilmiştir. Farklı zamanlarda yapılan iki çalışma

karşılaştırıldığında 0,5 µg/mL için aralarında istatistiksel açıdan anlamlı fark olmadığı, yapılan *student's t-test* ile belirlenmiştir (As ve Cd için sırasıyla p=0,139, p=0,921). 1 µg/mL için de aynı şekilde anlamlı bir fark bulunmamıştır (As ve Cd için sırasıyla p=0,695, p=0,331)

Larvanın büyüme eğrisine etki eden faktörlerden bazıları sıcaklık, nem, besiyeri içeriği, yumurtanın transfer koşullarıdır (115). As, Cd içeren besiyerinde ve hiçbir analit içermeyen blank besiyerinde yetişen larvaların büyüklükleri karşılaştırıldığında; Blank-As ve Blank-Cd serileri arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunurken ($p<0.05$); As-Cd serileri arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bu bulgular ışığında As ve Cd elementlerinin larvanın büyüme eğrisinde gecikmeye neden olduğu gözlemlenmiştir. Bu konuda, Talyumun *Lucilia sericata* gelişimi üzerinde olumsuz etkisi olduğuna dair yapılan çalışma, bizim elde ettiğimiz bulguyu destekler niteliktedir (7).

Şekil 39 ve 40'da elde edilen grafikler değerlendirildiğinde, larvada tespit edilen As ve Cd konsantrasyonlarından yola çıkılarak larvanın beslendiği dokunun içerdiği madde miktarı hakkında yorum yapılması mümkün olabilmektedir. Besiyeri ile larva arasındaki korelasyonun Cd için daha yüksek (R^2=0,902) iken; As için daha düşük (R^2=0,677) olduğu görülmektedir. Bu bulgu da Cd zehirlenmesi sonucu ölen bireyin vücudundan toplanan larvanın analizinin, As'nin korelasyon değerine kıyasla doğruya daha yakın sonuçlar vereceğini göstermektedir. As için elde edilen korelasyon eğrisinde 0,5 ve 1 µg/mL'nin birbirine yakın sonuçlar verdiği görülmektedir. Ek olarak, olay yerinden elde edilen toprak numunesi gibi çevresel örneklerin de analiz edilmesi ve larva konsantrasyonu ile mukayese edilmesi bu yoruma destekleyici nitelikte olacaktır.

Çalışmada her iki analit için de 0,5 µg/mL konsantrasyonun altında kalan seviyelerde çalışma yapılmamıştır. Çünkü her iki analit için de 0,5 µg/mL konsantrasyonunda elde edilen ICP-MS sonuçları LOQ değerlerine yakın bulunmuş, daha düşük konsantrasyonlarda yetişecek larvalardan elde edilecek sonuçların ise LOQ değerinin altında kalacağı

düşünülmüştür. Ancak yine de Şekil 39 ve 40'da elde edilen korelasyon katsayısının farklı konsantrasyonlar üzerinde yapılacak çalışmalar ile iyileştirilmesi mümkün olabilecektir. Şöyle ki, analiz edilen numune miktarının arttırılması ile As ve Cd için belirlenen LOQ değerlerinin üzerinde bulgu elde edilmesi sağlanabilecektir.

Çalışmayı gerçekleştirmek için geliştirilen analiz yöntemi değerlendirildiğinde, tatmin edici bulgular elde edilmiştir. Larva matriksinde geliştirilmiş bir sertifikalı referans materyal bulunmamaktadır. Bu nedenle geri kazanım, tekrar edilebilirlik (gün için ve günler arası), matriks etkisi ve doğrusallık çalışmaları, içerisinde As ve Cd elementleri bulunmayan besiyerinde büyüyen blank larvalara standart madde ekleme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada %2 HNO_3 çözeltisine ve larva matriksine katılan kalibrasyon standartlarından elde edilmiş iki ayrı kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve her iki doğrusallık çalışmasında da korelasyon katsayısı As ve Cd elementleri için >0,999 bulunmuştur. Kalibrasyon çözeltilerinden elde edilen lineer aralık As ve Cd için 0,1-100 ng/mL iken; larva matriksinden elde edilen kalibrasyon eğrisinde ise doğrusal aralık 1-20 ng/mL bulunmuştur. Tekrar edilebilirlik çalışmalarının sonuçlarına bakıldığında, 1, 2, 5, 10 ve 20 ng/mL için %RSD değerleri As için %3,46-8,51, Cd için ise %2,22-10,36 bulunmuştur. Elde edilen %RSD değerleri çalışmanın tekrar edilebilir olduğunu göstermektedir. Günler arası tekrar edilebilirlikte ise yine her iki elementin tüm konsantrasyonlarında %RSD değerlerinin <20 olduğu tespit edilmiş ve geliştirilen yöntem tekrar edilebilir ve kesin bulunmuştur. Örnek hazırlama yönteminin veriminin değerlendirildiği geri kazanım çalışmalarında As için yüzde geri kazanım oranlarının 1, 2, 5, 10 ve 20 ng/mL için %94,33-107,38 arasında olduğu, yine aynı konsantrasyonlarda Cd için geri kazanım yüzdelerinin ise %97,98-108,16 arasında olduğu bulunmuştur. Elde edilen bulgular %80-120 arasında olduğundan geri kazanım oranları tatmin edici bulunmuştur. Geri kazanım yüzdeleri konsantrasyonlara göre değerlendirildiğinde, düşük konsantrasyonlardaki yüzde geri kazanım oranlarının ideal

değerden uzaklaştığı görülmekte, bunun nedeninin de larva matriksinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Farklı günlerde aynı konsantrasyonlar için yapılan günler arası tekrar edilebilirlik değerleri arasında uygulanan *student's t-test* sonuçlarına göre, As'nin tüm konsantrasyonları için istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmazken (p>0,05; %95 CI), Cd'nin 1 ve 20 ng/mL konsantrasyonları arasında anlamlı fark görülmüş (p<0.05; %95 CI), diğer konsantrasyonları arasında ise anlamlı fark görülmemiştir (p>0,05; %95 CI). Ancak geri kazanım değerleri kabul edilebilir aralıkta olduğu ve her bir gün içi çalışmanın %RSD değerleri <20 olduğu için bu bulgular göz ardı edilebilir bulunmuştur.

Yapılan literatür taramalarında kadmiyuma bağlı bir akut zehirlenme vakasında kanda 23 µg/mL, idrarda 17 µg/mL, karaciğerde 0,4 ng/g, akciğerde 0,2 ng/g Cd bulunmuştur (106). Akut arsenik zehirlenmesi sonucu karaciğerde total inorganik arsenik konsantrasyonun 8,9-20,2 µg⁄g belirtildiği vakada sadece karaciğerde 9,870 µg⁄g As^V konsantrasyonu analiz edilmiştir (94). Bu çalışmalarda elde edilen bulgular akut intoksikasyona bağlı ölüm sonrası otopsi materyallerinden elde edilen bulgular olup, bu alanda sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Ancak, ölüm sebebi As ve Cd'a bağlı olan ve çürüme evresindeki bir olguda yapılmış toksikolojik bir analiz sonucuna bilgimiz dâhilinde rastlanmamıştır. Bu nedenle yaptığımız deneysel çalışmanın sonuçlarının gerçek örneklerden elde edilen bulgular ile karşılaştırılması mümkün olmamıştır. Akut As ve Cd zehirlenmesi sonucu ölen kişinin vücut sıvı ve dokularında tespit edilen konsantrasyonlar bizim çalışmamıza göre yumurtadan larva çıkışını engelleyecek düzeydedir. Fakat sinek, yumurtasını, cansız bir bedende öncelikli olarak ağız, burun, kulak vb. akut zehirlenmelerde tespit edilen çok yüksek konsantrasyonların bulunmadığı vücut boşluklarına bırakarak yumurtadan larva çıkışını sağlamış olacaktır. Yumurtadan çıkan larvalar daha sonra cesedin diğer bölgelerinde beslenerek gelişirken, bu bölgelerdeki konsantrasyonlar çürümeye bağlı dağılıma uğrayacak, analitin yarılanma ömrüne bağlı olarak ise azalacaktır. Bu bilgiden yola çıkıldığında,

çalışmamıza ek olarak steril bir şekilde yumurtadan çıkmış 1. evre larvaları As ve Cd ile kirletilmiş besiyeri ortamına bırakarak çalışmayı daha ileri boyuta taşımakta fayda olacağı düşünülmektedir. Ayrıca geliştirilen yöntem sadece akut As ve Cd zehirlenmeleri için değil kronik maruziyeti tespit etmek için de kullanılabilir.

Entomotoksikolojinin çalışma kapsamında genellikle ASAA analizleri, yasal ve yasadışı madde zehirlenmelerine rastlanmaktadır. As ve Cd zehirlenmesine bağlı ölüm olgularında larva analizlerinin yol gösterici olması bakımından bu çalışma ülkemizde ve dünyada gerçekleştirilmiş ilk deneysel araştırmadır. Larvadan elde edilen bulgular larvanın beslendiği dokudaki madde konsantrasyonu hakkında güçlü bir veri sağlayacaktır. Öte yandan ICP-MS ile larvada As ve Cd analizi için geliştirilen analitik yöntemin kısmi validasyonunun sağlanması, bu yöntemin diğer inorganik elementler için de kullanılmasını mümkün kılacaktır. Araştırmanın daha farklı konsantrasyonlar çalışılarak ileri boyutlara taşınması ve besiyerine alternatif olabilecek deney hayvanları ile geliştirilmesi adli bilimlerde entomotoksikolojik araştırmaların ilerlemesine katkı sağlayacaktır. Böylelikle sıra dışı post-mortem zehirlenme vakalarında larvadan faydalanılarak ölüm sebebinin araştırılması ve elde edilen bulguların olayın aydınlatılmasında yol gösterici olması sağlanmış olacaktır.

6. KAYNAKLAR

1. Wolff, M., A. Uribe, A. Ortiz & P. Duque, 2001. A preliminary study of forensic entomology in Medellin, Colombia. Forensic Science International, 120: 53-59.

2. Zeinab A.El-MoatyAbd Elmoneim M.Kheirallah, 2013. Developmental variation of the blow fly Lucilia sericata (Meigen, 1826) (Diptera: Calliphoridae) by different substrate tissue types, 297-300.

3. Vanin, Stefano, et al. (2008). Use of Lucilia species for forensic investigations in Southern Europe. For. Sci. Int., 177.1: 37-41.

4. Mégnin, P. (1894). La faune des cadavres: application de l'entomologie à la médecine légale. Gauthier-Villars.

5. Hall, R., Huntington, T. (2009). Perceptions and Status of Forensic Entomology: 1-16 (in) Byrd, J.H. & Castner, J.L. (eds.) Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations. Ed. CRC, Boca Raton, FL.

6. I.R. Dadour, D.F. Cook, J.N. Fissioli, W.J. Bailey, (2001). Forensic entomology: application, education and research in Western Australia, Forensic Sci. Int. 120; 48–52.

7. Altunsot, F., Başaran, A. (2011). Effects of thallium on the larval development of Lucilia sericata Meigen 1826 and PMI estimation. Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri Ve Biyoteknoloji, 1(2), 103-12.

8. Verma, K., Paul, R. (2016). Lucilia sericata (Meigen) and Chrysomya megacephala (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) Development Rate and its Implications for Forensic Entomology. Journal of Forensic Science and Medicine, 2(3), 146.

9. LaGoo, L., Schaeffer, L. S., Szymanski, D. W., & Smith, R. W. (2010). Detection of gunshot residue in blowfly larvae and decomposing porcine tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Journal of forensic sciences, 55(3), 624-632.

10. Haskell, N. H., & Williams, R. E. (2009). Entomology & Death: A Procedural Guide.: Forensic Entomology 454 Partners. Clemenson, SC, USA, 455.

11. Magni, P., Massimelli, M., Messina, R., Mazzucco, P., & Di Luise, E. (2008). Entomologia Forense–Gli insetti nelle indagini giudiziarie e medico-legali. Minerva Medica.

12. Verma, K., Paul, R. (2016). Lucilia sericata (Meigen) and Chrysomya megacephala (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) Development Rate and its Implications for Forensic Entomology. Journal of Forensic Science and Medicine, 2(3), 146.

13. Catts, E. P., Goff, M. L. (1992). Forensic entomology in criminal investigations. Annual review of Entomology, 37(1), 253-272.

14. Krischik, V., Burkholder, W. (1991). Stored-product insects and biological control agents. Circular E-Oklahoma State University, Cooperative Extension Service (USA).

15. Goff, M. L., Brown, W. A., Hewadikaram, K. A., & Omori, A. I. (1991). Effect 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. Journal of Forensic Science, 36(2), 537-542.

16. Byrd, J. H., Tomberlin, J. K. (Eds.). (2019). Forensic entomology: the utility of arthropods in legal investigations. CRC press.

17. Aggarwal, A. D. (2005). Estimating the postmortem interval with the help of entomological evidence. Anil Aggrawal's Internet Journal of Forensic Medicine and Toxicology, 6.

18. Resh, V. H., Cardé, R. T. (Eds.). (2009). Encyclopedia of insects. Academic press.

19. Goff, M. L. (1993). Estimation of postmortem interval using arthropod development and successional patterns. Forensic Science Review, 5, 81-81.

20. Nabity, P. D., Higley, L. G., & Heng-Moss, T. M. (2006). Effects of temperature on development of Phormia regina (Diptera: Calliphoridae) and use of developmental data in determining time intervals in forensic entomology. Journal of medical entomology, 43(6), 1276-1286.

21. Anderson, G. S. (1995). The use of insects in death investigations: an analysis of cases in British Columbia over a five year period. Canad. Soc. of For. Sci. J., 28(4), 277-292.

22. Benecke, M. (1998). Six forensic entomology cases: description and commentary. Journal of Forensic Science, 43(4), 797-805.

23. Nolte, K.B.; Pinder, R.D. and Lord, W.D. (1992). Insect larvae used to detect cocaine poisoning in a decomposed body. J. Forensic Sci., 37: 1179–1185.

24. Amendt, J., Richards, C. S., Campobasso, C. P., Zehner, R., & Hall, M. J. (2011). Forensic entomology: applications and limitations. Forensic science, medicine, and pathology, 7(4), 379-392.

25. Herbert A. G., (1924). "The Hsi Yuan Lu' or 'Instructions to Coroners'", Proceedings of the Royal Society of Medicine, 17:59-107.

26. B. von McKnight, (1981). Sung Tz´u, The Washing Away of Wrongs (Original title: Hsi yu¨ an chi lu), Book 2, Center for Chinese Studies, University of Michigan, Ann Arbor, (Chapter 3)

27. https://anatomiesofintelligence.github.io/posts/2019-09-2-chinese-diagram-of-human-body (Son Erişim Tarihi: 24.08.2020)

28. Nuorteva P., Schumann, H., Isokoshi, M., Laiho, K. (1974). Studies on the possibilities of using blowflies (Dipt., Calliphoridae) as medicolegal indicators in Finland. – Annales entomologici Fennici 40: 70–74.

29. M.J.B. Orfila, C.A. Lesueur, (1831). Traite´ des exhumations juridiques, et considerations sur les changements physiques que les cadavres e´prouvent en se pourrissant dans la terre, dans l'eau, dans les fosses d'aisance et dans le fumier (Handbook for the use at legal exhumations, and notes on the physical changes of corpses buried in the earth, in water, in cesspools, and in the manure), Paris, Be´chet Jeune, 1831, pp. 331–333

30. Bergeret, M. (1855). Infanticide, momification naturelle du cadavre. Ann Hyg Publique Med Leg, 4, 442-452.

31. Benecke, M. (2001). A brief history of forensic entomology. Forensic science international, 120(1-2), 2-14.

32. H. Reinhard, (1882). Beitrage zur Graberfauna‖, Verh Kaiserl. Konigl. Zool. Bot. Ges. Wien, 31, pp. 207-210

33. Schneider, P., Ehmke, H., Jaenicke, G., Leisner, W. (2013). Prinzipien der Verfassungsinterpretation. Gefährdungshaftung im öffentlichen Recht: Aussprache zu den Berichten in den Verhandlungen der Tagung der deutschen Staatsrechtslehrer zu Freiburg vom 4. bis 7. Oktober 1961 (Vol. 20). Walter de Gruyter.

34. Schmitz S. J., (1928). Phoriden in doodkisten. Natuurhist Maandblad 17:150–153

35. Karsch F., (1888). Uber Leichenwurmer (On corpse worms), Naturwiss Wochenschr, 3, pp. 88-90

36. G. Fraenkel, (1933). Observations and experiments on the Blow-fly (Calliphora erythrocephala) during the first day after emergence, Proc. Zool. Soc. (Lond.), 103; 893-904.

37. Heymons R., Lengerken Hv., Bayer M. (1929). Studien uber die Lebenserscheinungen der Silphini (Coleopt.). 4. Blitophagaopaca L. (Glattstreifiger Rubenaaskafer). 14:234–260

38. S. von Horoszkiewicz, (1902). Casusistischer Beitrag zur Lehre von der Benagung der Leichen durch Insecten (A case report concerning the feeding of insects on human corpses), Vjschr. Ger. Med. (3 Folge) 23; 233–239.

39. Morley, C. (1907). Ten years work among vertebrate carrion. Entomologists Monthly Magazine, 43, 45-51.

40. Brouardel, P. (1879). De la détermination de l'époque de la naissance et de la mort d'un nouveau-née, faite al'aide de la présence des acares et des chenilles d'aglosses dans cadavre momifié [Determination of the time of birth and of death of a new-born child, made using the presence of mites and Aglossa caterpillars on the mummified corpse]. Ann. Hyg. Pub. Med. Leg, 2, 153-158.

41. P. Nuorteva, M. Isokoski, K. Laiho, (1967). Studies on the possibilities of using blowflies (Dipt.) as medicolegal indicators in Finland. 1. Report of four indoor cases from the city of Helsinki, Ann. Entomol. Fenn. 33 217– 223.

42. P. Nuorteva, H. Schumann, M. Isokoski, K. Laiho,. (1974). Studies on the possibilities of using blowflies (Dipt., Calliphoridae) as medicolegal indicators in Finland. 2. Four cases where species identification was performed from larvae, Ann. Entmol. Fenn. 40 70–74.

43. Picard, C. J., Villet, M. H., Wells, J. D. (2012). Amplified fragment length polymorphism confirms reciprocal monophyly in Chrysomya putoria and Chrysomya chloropyga: a correction of reported shared mtDNA haplotypes. Medical and veterinary entomology, 26(1), 116-119.

44. Hall, M. J. R., Edge, W., Testa, J. M., Adams, Z. J. O., Ready, P. D. (2001). Old World screwworm fly, Chrysomya bezziana, occurs as two geographical races. Medical and Veterinary Entomology, 15(4), 393-402.

45. Boehme, P., Spahn, P., Amendt, J., Zehner, R. (2013). Differential gene expression during metamorphosis: a promising approach for age estimation of forensically important Calliphora vicina pupae (Diptera: Calliphoridae). International journal of legal medicine, 127(1), 243-249.

46. Desmyter, S., Gosselin, M. (2009). COI sequence variability between Chrysomyinae of forensic interest. Forensic Science International: Genetics, 3(2), 89-95.

47. Sonet, G., Jordaens, K., Braet, Y., Bourguignon, L., Dupont, E., Backeljau, T., Desmyter, S. (2013). Utility of GenBank and the Barcode of Life Data Systems (BOLD) for the identification of forensically important Diptera from Belgium and France. Zookeys, (365), 307.

48. Lyra, M. L., Fresia, P., Gama, S., Cristina, J., Klaczko, L. B., de Azeredo-Espin, A.M.L. (2005). Analysis of mitochondrial DNA variability and genetic structure in populations of New World screwworm flies (Diptera: Calliphoridae) from Uruguay. Journal of medical entomology, 42(4), 589-595.

49. Campobasso, C. P., Di Vella, G., Introna, F. (2001). Factors affecting decomposition and Diptera colonization. Forensic science international, 120(1-2), 18-27.

50. Wells, J. D., Sperling, F. A. (2001). DNA-based identification of forensically important Chrysomyinae (Diptera: Calliphoridae). Forensic Science International, 120(1-2), 110-115.

51. Benecke M., Wells J., (2002). DNA techniques for forensic entomology. In: Byrd JH, Castner JL, eds. Forensic Entomology: The Utility of Arthropods in Legal Investigations (Second Edition). Boca Raton. 341-352

52. http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/flies/cheese_skipper04.jpg (Son Erişim Tarihi: 22.08.2020)

53. http://entnemdept.ufl.edu/creatures/livestock/secondary_screwworm01.jpg (Son Erişim Tarihi: 22.08.2020)

54. http://entnemdept.ufl.edu/creatures/livestock/flies/lucilia_sericata04.jpg (Son Erişim Tarihi: 22.08.2020)

55. http://entnemdept.ufl.edu/creatures/misc/beetles/dermestes_ater01.jpg (Son Erişim Tarihi: 22.08.2020)

56. http://entnemdept.ufl.edu/creatures/misc/beetles/Creophilus_maxillosus04.jpg (Son Erişim Tarihi: 22.08.2020)

57. Almulhim, A. M., & Menezes, R. G. (2020). Evaluation of Postmortem Changes. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.

58. Amendt, J., Goff, M. L., Campobasso, C. P., Grassberger, M. (Eds.). (2010). Current concepts in forensic entomology (pp. 3-5, 212-215). London: Springer Netherlands.

59. LeBlanc, H. N., Logan, J. G. (2009). Exploiting insect olfaction in forensic entomology. In Current concepts in forensic entomology (pp. 205-221). Springer, Dordrecht.

60. Joseph, I., Mathew, D. G., Sathyan, P., Vargheese, G. (2011). The use of insects in forensic investigations: An overview on the scope of forensic entomology. J. of For. Dent. Sci., 3(2), 81-89.

61. Tullis, K., Goff, M. L. (1987). Arthropod succession in exposed carrion in a tropical rainforest on O'ahu Island, Hawaii. Journal of medical entomology, 24(3), 332–339.

62. Gennard, D. (2012). Forensic entomology: an introduction. John Wiley & Sons.

63. Banumathi, B., Vaseeharan, B., Malaikozhundan, B., Ramasamy, P., Govindarajan, M., Alharbi, N. S., Benelli, G. (2018). Green larvicides against blowflies,

Lucilia sericata (Diptera, Calliphoridae): Screening of seven plants used in Indian ethno-veterinary medicine and production of green-coated zinc oxide nanoparticles. Physiological and molecular plant pathology, 101, 214-218.

64. https://animaldiversity.org/accounts/Lucilia_sericata/classification/ (Son Erişim Tarihi: 24.08.2020)

65. Talar, S. A., Sadr, S., Doroudgar, A., Talari, M. R., Gharabagh, A. S. (2004). Wound myiasis caused by Lucilia sericata.

66. Strikewise, Blowfly strike. http://www.strikewise.com/blowfly.html) 2007. (Erişim Tarihi: (21 Aralık 2019)

67. Cristiansen J.R., Tomerlin J.K., (2009). Three dimensional polygonal model visualization of Lucilia sericata from SEM and streomicroscopic data. Proc. Amer. Acad. Foren. Sci.; 15: 274.

68. Dodge, H.R., (1953) Domestic flies: Pictorial key to common species in southern US. US Department of Health, Education and Welfare, International Congress of Entomology, New York, 12-494.

69. https://www.glanbiaconnect.com/farm-management/detail/article/blowfly-control-in-sheep-clarifying-the-key-issues (Son Erişim Tarihi: 24.08.2020)

70. James, M.J., (1947). The flies that cause myiasis in man. Washington; pp 2-89

71. Gagliano-Candela, R., & Aventaggiato, L. (2001). The detection of toxic substances in entomological specimens. International Journal of Legal Medicine, 114(4-5), 197-203.

72. Sohal R.S., Lamb R.E., (1977). Intracellular deposition of metals in the midgut of the adult housefly, Musca domestica. J Insect Physiol 23: 1349–1354

73. Sohal R.S., Lamb R.E., (1979) Storage-excretion of metallic cations in the adult housefly, Musca domestica. J Insect Physiol 25: 119–124

74. Nuorteva P., Nuorteva S., (1982). The fate of mercury in sarcosaprophagous flies and in insects eating them. AMBIO 11: 34– 37

75. Roeterdink E.M., Dadour I.R., Watling R.J., (2004). Extraction of gunshot residues from the larvae of the forensically important blowfly Calliphora dubia (Macquart) (Diptera: Calliphoridae). Int J Legal Med. ;118(2):63-70

76. Costa, R. A., Dos Santos, N. A., Corrêa, T. S., Wyatt, N. L., Chamoun, C. A., Carneiro, M. T., Romão, W. (2020). Detection of Pb, Ba, and Sb in Cadaveric Maggots and Pupae by ICP-MS. J. of For. Sci.

77. Meija, J., Coplen, T. B., Berglund, M., Brand, W. A., De Bièvre, P., Gröning, M., Prohaska, T. (2016). Atomic weights of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, 88(3), 265-291.

78. Godfrey, S. M., McAuliffe, C. A., Mackie, A. G., Pritchard, R. G. (1998). In Chemistry of Arsenic, Antimony, and Bismuth; Norman, N. C, Ed.; Blackie Academic & Professional: London, 94.

79. https://m.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB2761163_EN.htm (Son Erişim Tarihi: 23.08.2020)

80. WHO (2001). Arsenic and Arsenic Compounds (Environmental Health Criteria 224), 2nd ed. Geneva: World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

81. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2004). Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 84, 1–477.

82. WHO (2000). Air Quality Guidelines for Europe, 2nd ed. Copenhagen: WHO Regional Publications, European Series, No. 91, 288 pp.

83. Brewster, M.D. (1992). Removing arsenic from contaminated wastewater. Wat. Environ. Technol., 4(11), 54–57

84. Das, D., Samanta, G., Mandal, B. K., Chowdhury, T. R., Chanda, C. R., Chowdhury, P. P., ... & Chakraborti, D. (1996). Arsenic in groundwater in six districts of West Bengal, India. Environ. Geochem. and Health, 18(1), 5-15.

85. Robertson F. N., (1989). Arsenic in ground-water under oxidizing conditions, south-west United States. Environmental geochemistry and health, 11(3-4), 171–185.

86. Hering, J. G., & Elimelech, M. (1995, June). International perspective on arsenic in groundwater: problems and treatment strategies. In Proc. AWWA, Annual Conference.

87. Dibyendu, Sarkar; Datta, Rupali (2007). "Biogeochemistry of Arsenic in Contaminated Soils of Superfund Sites". EPA. U.S. Environ. Protect. Agen.

88. 5. International Agency For Research On Cancer IARC monographs on the evaluation of carcinogen risks to humans. (2004). (Erişim Tarihi: 25 Nisan 2020)

89. Smedley P., Kinniburgh D., (2002) A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. Appl. Geochem. 17: 517-568.

90. Edwards M., Johnson L., Mauer C., Barber R., Hall J., (2014). Regional specific groundwater arsenic levels and neuropsychological functioning: a cross-sectional study. Int. J. Environ. Health. Res. 24: 546-557.

91. Opresko D.M., (1992). Risk Assessment Information System Database, Oak Ridge Reserv. Environ. Restor. Prog.

92. Chen SJ., Yan XJ., Chen Z. (2013) Arsenic in Tissues, Organs, and Cells. In: Kretsinger R.H., Uversky V.N., Permyakov E.A. (eds) Encyclopedia of Metalloproteins. Springer, New York, NY.

93. Lech, T., & Trela, F. (2005). Massive acute arsenic poisonings. For. Sci. İnt., 151(2-3), 273-277.

94. Tournel, G., Houssaye, C., Humbert, L., Dhorne, C., Gnemmi, V., Bécart-Robert, A., Lhermitte, M. (2011). Acute arsenic poisoning: clinical, toxicological, histopathological, and forensic features. J. of For. Sci., 56, S275-S279.

95. Finley, P. R., & Tietz, N. W. (Eds.). (1996). Clinical guide to laboratory tests. WB Saunders company. 72–74.

96. Duncan, A., Taylor, A., Leese, E., Allen, S., Morton, J., & McAdam, J. (2015). Homicidal arsenic poisoning. Annals of Clin. Biochem., 52(4), 510-515.

97. Wedepohl, K. H. (1995). The composition of the continental crust. Geochimica et Cosmochimica Acta. 59 (7): 1217–1232.

98. https://movingcocoa.com/wp-content/uploads/2019/12/2019-12-11-16_03_37-Cadmium-Telluride.png (Son Erişim Tarihi: 24.08.2020)

99. Holleman A.F., Wiberg E., Wiberg Nils. (1985). Cadmium. Lehrbuch der Anorganischen Chemie, 91–100.

100. "Case Studies in Environmental Medicine (CSEM) Cadmium". Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (Erişim Tarihi: 20 Ağustos 2020)

101. Subhan, F., Khan, A., Wahid, F., Shehzad, A., & Jan, A. U. (2011). Determination of optimal toxic concentration and accumulation of cadmium in broiler chicks. Toxicological research, 27(3), 143–147.

102. Luevano, J., Damodaran, C., (2014). A Review of Molecular Events of Cadmium-Induced Carcinogenesis. J. of Environ. Path., Toxicology and Oncology. 33 (3): 183–194.

103. Rahim, F., Jalali, A., Tangestani, R., (2013). Breast cancer frequency and exposure to cadmium: A meta-analysis and systematic review (PDF). Asian Pacific J. of Cancer Preven. 14 (7): 4283–7.

104. Bernard A., Lauwerys R., (1986). Effects of cadmium exposure in humans. In: Foulkes, E.C. ed. Handbook of experimental pharmacology, 80:135-177.

105. Friberg L., Elinder C.G., (1983). Cadmium and compounds. In: Parmeggiani, L., ed. Encyclopedia of occupational health and safety, Geneva, Int. Labour Org. Publications, pp. 356-357.

106. Friberg L., Piscator M,. Nordberg G.F., Kjellstrom T., (1974). Cadmium in the environment, 2nd ed., Cleveland, CRC Press.

107. Buckler H.M., Smith W.D.F., Rees W.D.W., (1986) Self poisoning with oral cadmium chloride. Br. Med. J., 292:1559-1560.

108. Ragab, A. R., Al Mazroua, M. K., Younis, S. M., Emam, A. A., Moagel, N. M. A., Buaijan, A. Y. A., Abadie, A. M. A. (2017). Comparative Study of Blood Metal Levels in Post-Mortem and Living Population Samples from Dammam, KSA. J. of For. Res., 08(04).

109. Satarug, S., Baker, J. R., Reilly, P. E. B., Moore, M. R., & Williams, D. J. (2002). Cadmium Levels in the Lung, Liver, Kidney Cortex, and Urine Samples from Australians without Occupational Exposure to Metals. Archives of Environ. Health: An Int. J., 57(1), 69–77.

110. International Agency for Research on Cancer (1976). Cadmium and cadmium compounds. In: Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, 11: 39-74.

111. Galazka R, (2011). Modern Analytical Methods in Environmental Analysis-ICP-MS Technique.

112. Amman A., (2007), Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS): A Versatile Tool. Journal of Mass Spectrometry: JMS.

113. İndüktif Eşleşmiş Plazma-Kütle Spektroskopisi (ICP-MS), Merkezi Araştıma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi. Alıntı: https://arum.ogu.edu.tr/Sayfa/Index/69/induktif-eslesmis-plazma-kutle-spektroskopisi-icp-ms Erişim: (24.08.2020)

114. Tatlıdil A, Su Örneklerinde ICP-MS ile Kükürt Tayini İçin Yeni Bir Yöntem Geliştirilmesi. (Yüksek Lisans Tezi). Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı (2019).

115. Roe, A., & Higley, L. G. (2015). Development modeling of Lucilia sericata (Diptera: Calliphoridae). PeerJ, 3, e803.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Çağdaş ADIÖREN

Doğum Yeri ve Tarihi: İzmir / 21.11.1993

E-posta : cagdas.adioren4@gmail.com

Eğitim Bilgileri

2018-2020	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Fen Bilimleri Anabilim Dalı, Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü (Tezli Yüksek Lisans Programı)
2011-2016	Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı (Lisans Programı)

Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler

Ekim 2019	Testing the Waters-4th International Conference on Wastewater Analysis, Foshan, Çin, (Sunum) Illicit drug consumption of Istanbul from 14 WWTPs in the city
Ekim 2019	Testing the Waters-4th International Conference on Wastewater Analysis, Foshan, Çin, (Poster) Monitoring the life habits of Istanbul: Caffeine, nicotine and alcohol