

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ADLI TIP ANABİLİM DALI

**POSTMORTEM RAT SERUM VE DOKULARINDA
PARASETAMOL DAĞILIMI VE STABİLİTESİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Kimya Müh. DİLEK BATTAL

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI

Doç.Dr. Ahmet Hilal

**Bu Tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Bütçesinden
TF 2007-D5 nolu proje olarak desteklenmiştir.**

Tez No:

ADANA-2009

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Adli Tıp Doktora Programı Çerçevesinde yürütölmüş olan **Postmortem Rat Serum ve Dokularında Parasetamol Dağılımı ve Stabilitesinin Araştırılması** adlı çalışma aşğıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

Jüri Başkanı
Doç.Dr. Ahmet Hilal
Ç.Ü. Tıp Fak. Adli Tıp ABD

Prof.Dr. Mete K. Gülmen
Ç.Ü. Tıp Fak. Adli Tıp ABD

Prof.Dr. Tölin Söylemezoğlu
Ankara Ü. Adli Tıp Enstitüsü

Prof.Dr. Şahan Saygı
Mersin Ü. Eczacılık Fak.

Prof.Dr. Yusuf Karataş
Ç.Ü. Tıp Fak. Farmakoloji ABD

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulunun
ile kabul edilmiştir.

2009 tarih ve sayılı kararı

Prof.Dr.Halil KASAP
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerini paylaşan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Ahmet HİLAL'e

Eğitim dönemimde gösterdikleri ilgi ve destekleri için Adli Tıp Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Mete K. GÜLMEN'e, Sayın Prof. Dr. Necmi ÇEKİN'e ve Sayın Prof. Dr. Behnan ALPER'e,

Kendilerine zaman ayırmamı sabırla bekleyen sevgili oğlum'a ve sevgili kızım'a, maddi ve manevi desteği ile yanımda olan sevgili anne ve babama, eğitim hayatıma katkılarından dolayı sevgili abla ve ağabeyim Nihal-Turan Fırat'a,

Yardımları ile bana kolaylık sağlayan çalışma arkadaşlarım Fadile Yener ve Pınar Efeoğlun'a, deneysel uygulamalara önemli katkıları olan Vet. Dr. Kenan Dağlıoğlu'na ve TIPDAM çalışanlarına,

TF2007-D5 no'lu Araştırma Fonu ile tezin gerçekleştirilmesine katkıda bulunan Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonuna teşekkür ederim.

Saygılarımla

Kimya Mühendisi Dilek Battal

İÇİNDEKİLER

Kabul ve onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Adli Bilimler ve Adli Toksikoloji	3
2.2. Zehirlerin Giriş Yolları, Absorbsiyonları, Dağılım ve Atılımları	4
2.2.1. Giriş Yolları ve Absorbsiyon	4
2.2.2. Dağılım	5
2.2.2. Biyotransformasyon ve Biyoaktivasyon	6
2.2.3. Atılım	8
2.3. Parasetamol	9
2.3.1. Parasetamolün Farmakolojik Özellikleri	10
2.3.2. Parasetamolün Farmakokinetiği ve Biyotransformasyon ve Biyoaktivasyon Mekanizması	10
2.3.3. Parasetamolün Terapötik Kullanımı	14
2.3.4. Parasetamolün Toksik Etkileri	15
2.3.4.1. Parasetamol Kaynaklı Hepatotoksisite	16
2.3.4.2. Parasetamol Kaynaklı Renal Toksisite	17
2.3.5. Parasetamol Zehirlenmelerinde Tedavi	17
2.4. Akut Toksisite Testleri	18
2.5. Parasetamolün Serum ve Organlarda Tayini İçin Kullanılan Yöntemler	19
2.5.1. Katı Faz Ekstraksiyon Yöntemi ile Örnek Hazırlama	19
2.5.2. Kromatografik Yöntemler	21

2.5.2.1. Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi (GC/MS)	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM	24
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler	24
3.1.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Araç ve Gereçler	24
3.1.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler	25
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Deney Hayvanlarına Parasetamol Uygulanması, Biyolojik Örneklerin Alınması ve Saklanması	25
3.2.2. Standartların ve Tampon Çözeltinin Hazırlanması	26
3.2.3. Gaz Kromatografi Kütle Spektrometresi (GC/MS) Çalışma Şartları	26
3.2.3.1. Standart Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi	27
3.2.3.2. Geri Kazanım (Recovery) Çalışmaları	27
3.2.3.3. Kantitatif Alt Limit (LQD) Çalışması ve Minimum Dedeksiyon Limiti (LOD) Çalışması	27
3.2.4. Serum Örneklerinde Parasetamolün SPE (Katı Faz)Yöntemi ile Ekstraksiyonu	27
3.2.5. Karaciğer, Böbrek ve Beyin Dokularından Parasetamolün SPE (Katı Faz) Yöntemi ile Ekstraksiyonu	29
3.2.5.1. Dokuların Katı Faz (SPE) Ekstraksiyonuna Hazırlanması	29
3.2.5.2. Dokuların Katı Faz Ekstraksiyonu	30
3.3. İstatistiksel Analiz	31
4. BULGULAR	
4.1. Parasetamolün Serum ve Dokularda Tayini	32
4.1.1. Serum Örneklerinin Analiz Sonuçları	34
4.1.1.1. Günlere Göre Değerlendirilen Serum Parasetamol Konsantrasyonu Sonuçları	35
4.1.1.2. Saklama Koşullarına Göre Değerlendirilen Serum Parasetamol Konsantrasyonu Sonuçları	36
4.1.2. Kontrol Grubu Sonuçları	37
4.1.3. Karaciğer Örneklerinin Analiz Sonuçları	37
4.1.3.1. Günlere Göre Değerlendirilen Karaciğer Parasetamol Konsantrasyonu Sonuçları	38

4.1.4. Karaciğer, Beyin ve Böbrek Örneklerinde Parasetamol Dağılımı	38
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	50
7. KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İlacın Absorbsiyon Yerinden Kana Geçişinin Şematik Gösterimi.	5
Şekil 2.2. Parasetamol'un Açık Kimyasal Formülü.	9
Şekil 2.3. Parasetamol Molekülünün Üç Boyutlu Görüntüsü.	9
Şekil 2.4. Parasetamolün Biyotransformasyonu ve Biyoaktivasyonu.	13
Şekil 2.5. Parasetamolün İnsanlarda Dağılımı ve Metabolizması.	14
Şekil 2.6. SPE Yöntemi ile Maddelerin Ayrılma Şekilleri.	20
Şekil 3.1. Serum Örneklerinden Parasetamolün SPE (katı faz) Yöntemi ile Ekstraksiyonun Akış Şeması.	28
Şekil 3.2. Dokuların Katı Faz (SPE) Ekstraksiyonuna Hazırlanması.	29
Şekil 3.3. Dokuların Katı Faz Ekstraksiyonu Akış Şeması.	30
Şekil 4.1. Parasetamol ve Procain Standardlarının GC/MS Kromatogramı.	32
Şekil 4.2. Parasetamolün GC/MS'de Belirlenen Kalibrasyon Eğrisi.	33
Şekil 4.3. Serum Parasetamol Konsantrasyonundaki Yüzde Değişim Boxplot Grafiği.	34
Şekil 4.4. Serum Parasetamol Konsantrasyonunun Günlere Göre Değişim Boxplot Grafiği.	35
Şekil 4.5. Serum Parasetamol Konsantrasyonunun Günlere ve Saklama Koşullarına Göre Değişim Boxplot Grafiği.	36
Şekil 4.6. Kontrol Grubu Parasetamol Değişiminin Günlere ve Saklama Koşullarına Göre Boxplot Grafiği.	37
Şekil 4.7. Karaciğer Parasetamol Konsantrasyonunun Günlere Göre Değişim Boxplot Grafiği.	38
Şekil 4.8. Organlarda Parasetamol Dağılımının Boxplot Grafiği ile Gösterilmesi.	38
Şekil 4.9. Parasetamol Kütle Spektrometri İyon Penceresi.	39
Şekil 4.10. Procaine Hidroklorikasit Kütle Spektrometri İyon Penceresi.	40
Şekil 4.11. Serum Parasetamol Kromatogramı.	40
Şekil 4.12. Karaciğer Örneği Parasetamol Kromatogramı.	41
Şekil 4.13. Beyin Örneği Parasetamol Kromatogramı.	41
Şekil 4.14. Böbrek Örneği Parasetamol Kromatogramı.	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. İlaç Metabolize Edici Aktivitenin Organlara Göre Dağılımı	7
Çizelge 4.1. Parasetamol'ün Alıkonma Zamanı, Korelasyon Katsayısı ve Dedeksiyon Limiti	33
Çizelge 4.2. Serum Parasetamol Konsantrasyonlarının Saklama Koşulları ve Günlere Göre Değerlendirilmesi.	34
Çizelge 4.3. Karaciğer Parasetamol Konsantrasyonlarının Günlere Göre Değerlendirilmesi.	37
Çizelge 4.4. Akut Parasetamol Zehirlenmesinde Organlarda Parasetamol Dağılımı	39

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACN	Asetonitril
AST	Aspartat amino tansferaz
COX	Siklooksijenaz
EI	Electron Impact, Elektron Çarpma
GC/MS	Gaz Kromatografi/Kütle Spektrometrisi
gr	Gram
GSH	Glutasyon
HCl	Hidroklorik asit
HLB	Hydrophilic-Lipophilic Balance, Hidrofilik-Lipofilik Ayarlı
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
IS	İnternal Standart
kg	Kilogram
LC/MS	Sıvı Kromatografi/Kütle Spektrometrisi
LD ₅₀	Bir defada verildiğinde test grubundaki hayvanların % 50'sini öldüren doz
LOD	Limit of Dedection, Minimum Dedeksiyon Limiti
LQD	Limit of Quantitation, Kantitatif Alt Limit
MCX	Mixed-mode strong cation-exchange, karışık yapıda güçlü katyon değiştirici
MeOH	Metanol
mg	Miligram
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
MW	Molecular Weight, Moleküler Ağırlık
NSAİİ	Nonsteroidal anti-inflamatuvar ilaçlar
NAPQI	N-asetil-p- benzoquinone imine

NAPSQI	N-acetyl-p-benzosemiquinone imine
NH ₄ OH	Amonyum Hidroksit
PAR	Parasetamol
PAR-CG	Parasetamolün sisteinilglisin konjugatı
PAR-Cys	Parasetamolün sistein konjugatı
PAR-GLUC	Parasetamolün glukuronid konjugatı
PAR-NAC	Parasetamolün merkaptirik asit formu
PAR-SG	Parasetamolün glutasyon konjugatı
PAR-SULP	Parasetamolün sülfat konjugatı
PGES	Prostaglandin endoperoksit sentetaz
ppm	Per Part of Milion, Milyonda Bir Birim
rpm	Dakikada katedilen dairesel açđ
SPE	Solid Phase Extraction, Katı Faz Ekstraksiyonu
ST	Sülfotransferaz
STA	Sistematik toksikolojik analiz
UDPGT	Üridin difosfoglukuronil transferaz

ÖZET

Postmortem Rat Serum ve Dokularında Parasetamol Dağılımı ve Stabilitésinin Araştırılması

Parasetamol, analjezik etkili ilaçlar arasında yaygın kullanımı ve reçetesiz kolaylıkla elde edilebilmesi nedeni ile kaza ve intihar amaçlı ölümlere sıklıkla neden olur. Adli olgularda ölüme neden olan akut zehirlenmelerin uygun biyolojik örneklerde gösterilmesi ve postmortem toksikolojik analizi yapılan bu örneklerin yasa ile belirlenen süre saklanması zorunludur. Bu saklama süresi boyunca örnek içindeki madde miktarı çeşitli nedenlerden dolayı (saklama koşulları, koruyucu konulmaması v.b) değişebilir. Yapılan çalışmada, Wistar Albino cinsi ratlardan akut parasetamol zehirlenmesi sonucu elde edilen postmortem serum ve karaciğer örneklerinin değişik saklama koşullarında (serum örnekleri, +4°C ve -20°C'de, karaciğer örnekleri -20°C'de, katı faz ekstraksiyon ve GC/MS cihazı kullanılarak) parasetamol stabilitesinin araştırılmasının yanı sıra postmortem serum, böbrek, beyin ve karaciğer dokularında dağılımının gösterilmesi amaçlanmıştır.

Çukurova Üniversitesi Tıbbi ve Deneysel Araştırmalar Merkezinden elde edilen 42 adet Wistar Albino cinsi rat gavaj yöntemi kullanılarak akut parasetamol zehirlenmesine uğratılmıştır. Serum örnekleri +4°C ve -20°C'de 30 gün bekletilerek parasetamol stabilitesi değerlendirilmiştir (başlangıç, 1., 2., 3., 10., 14., 21. ve 30. günlerde yapılan ölçümlerle). Serum parasetamol konsantrasyonlarının, günlere bağlı olarak değişim gösterdiği gözlenmiştir. Buna göre 30. gün değişim değerlerinin diğer günlerdeki değişimden istatistiksel olarak farklı olduğu bulunmuştur. (p<0.001).

Serum örneklerinin saklanma koşulları çalışma sonucunda sadece 30. gün ölçümünde anlamlı farklılık saptanmıştır (p=0.05). 30. gün değerleri için saklama koşullarına göre yüzde değişimi -20°C'de %33.78, +4°C'de %66.30 olarak belirlenmiştir. -20°C'de saklanan karaciğerdeki parasetamol stabilitesi de 30 gün için değerlendirilmiştir. 1. gün karaciğer örneğinde parasetamol konsantrasyonu değişimi % 30.26, 30. gün karaciğer örneğinde parasetamol konsantrasyonu değişimi %94.97 olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmada parasetamolün organ dağılımı; karaciğer örneklerinde 2.68 mg/g, böbrekte 1.11 mg/g ve beyinde 0.68 mg/g olarak ölçüldü.

Sonuç olarak, akut parasetamol zehirlenmelerinde serum ve karaciğer örneklerindeki parasetamol miktarı, 30. güne kadar ölçüldüğünde başlangıç değerine göre anlamlı farklılık göstermemiştir. Serum ve karaciğer örneklerinin, 30 günden fazla saklanması konusunda ileri çalışmalar yapılmalıdır.

Anahtar Sözcükler: Parasetamol, APAP, Asetaminofen, Adli Toksikoloji

ABSTRACT

Distribution and Stability of Paracetamol in Postmortem Rat Serum and Tissues

Paracetamol is a common analgesic and antipyretic over the counter agent that frequently causes accidental and suicidal deaths. In legal cases, it is mandatory to show the acute poisoning in proper biological samples and to keep these samples which are analyzed toxicologically for the time defined by law in many countries as well as in Turkey. During this time, the amount of substance in the sample may be changed due to various reasons (storing conditions, not to use preservatives for storing purposes etc.)

We aimed to investigate the stability of paracetamol in different storing conditions such as, serum samples stayed at +4⁰C and -20⁰C, whilst liver samples at -20⁰C. We used solid phase extraction and GC/MS in samples of the paracetamol intoxicated Wistar Albino rats. We tried to show the distribution in postmortem serum, liver, kidney and brain tissues.

42 Wistar Albino rats were intoxicated acutely by paracetamol, using the gavage method. The serum samples were stored for 30 days and evaluated for stability of paracetamol. We measured the values of paracetamol from the beginning of the experiment and repeated to measure it by the days one, two, three, ten, fourteen, twenty one and thirty. We observed that serum paracetamol concentrations had changed daily. We had observed statistical differences in various days ($p < 0.001$).

The values of various measurements are compared and we had noticed a significant difference ($p = 0.05$) on the thirtieth experimental day. We had obtained that paracetamol serum levels were changing for the thirtieth day in various ratios, 66.30% and 33.78%, depending on the storing conditions respectively “+4⁰C” and -20⁰C. The stability of paracetamol in liver stored at -20⁰C was also evaluated for 30 days. We also observed that the paracetamol concentration levels were changed as 30.26% on the first day and as 94.97% on the thirtieth day in the liver sample extractions. The distribution of paracetamol levels measured in various organs were as 2.68 mg/g, 1.11 mg/g, and 0.68 mg/g in liver, kidney and brain samples respectively.

We had concluded that the amount of paracetamol in serum or liver samples in acute paracetamol poisonings did not show any meaningful differences during thirty days of storage in comparison to the starting values. Further studies can be of valuable and various studies should be performed in understanding the exact storage period of liver and serum samples in intoxication cases.

Key Words: Paracetamol, APAP, Acetaminophen, Forensic Toxicology

1. GİRİŞ

Toksikoloji kelime olarak “zehir bilimi”dir. Toksikoloji denilince akla ilk olarak Paracelsus gelir. 16. yüzyılda Paracelsus’un (1493-1541) zehiri tanımlarken kullandığı “Her madde zehirdir. Zehir olmayan madde yoktur; zehir ile ilacı ayıran dozdur” şeklindeki ifade, bugünkü modern toksikolojinin de çıkış noktasıdır.

Vücuda çeşitli yollarla toksik veya letal dozda alınan maddelerin, uygun örneklerde, doğru, güvenilir ve gelişmiş yöntemlerle belirlenmesi klinik toksikolojide, tedavinin şekli ve dozunun belirlenmesinde, adli toksikolojide de adalet mekanizmasının işlerliği açısından önemlidir.

Parasetamol (asetaminofen) yaygın olarak kullanılan analjezik ve antipiretik etkili bir ilaçtır. Doza bağımlı ilaç toksisitesi için parasetamol iyi bir örnektir. Bir çok ülkede olduğu gibi Amerika Birleşik Devletleri’nde parasetamol toksisitesi akut karaciğer yetmezliğinin en sık nedeni olarak belirtilmektedir. İntihar girişimleri ya da tedavi amacı ile verilen parasetamolün zehirlenmeye yol açması durumunda spesifik antidot tedavisine başlanabilmesi için kan parasetamol düzeyi bilinmelidir. Bu sebeple klinik toksikoloji açısından, kan parasetamol düzeyinin saptanmasında duyarlı hızlı ve spesifik bir yöntemin kullanılmasına ihtiyaç vardır⁽¹⁻⁶⁾.

Vücuda çeşitli yollarla toksik veya letal dozda alınan maddelerin, uygun örneklerde, doğru, güvenilir ve gelişmiş yöntemlerle belirlenmesi klinik toksikolojide tedavinin şekli ve dozunun belirlenmesinde, adli toksikolojide ise adalet mekanizmasının işlerliği açısından önemlidir.

Günümüzde bilinçsiz ilaç kullanımı, ilaçların özensiz ve çocukların ulaşabileceği şekilde saklanması birçok kaza ve intihar olgularının sebebi olarak gözlenmektedir.

Adli olgularda ölüme neden olan akut zehirlenmelerin uygun biyolojik örneklerde analiz edilmesi ve postmortem toksikolojik analizi yapılan bu örneklerin yasa ile belirlenen süre saklanması zorunludur⁽⁷⁾. Bu saklama süresi boyunca örnek içindeki madde miktarı çeşitli nedenlerden dolayı (saklama koşulları, koruyucu konulmaması v.b) değişebilir. Bu amaçla literatürde çeşitli maddelerin (etanol, ilaçlar, uyutucu, uyuşturucu maddeler, pestisitler vb.) biyolojik örneklerde, değişik saklama koşullarında stabilitesini belirlemek üzere yapılmış bir çok çalışma yer almaktadır.

Son yıllarda geliştirilen duyarlı yöntemler, düşük miktarlarda analitlerin tayinlerine imkan vermektedir. Literatürde Parasetamol (asetaminofen) miktar tayini için çeşitli matrisler içinde birçok çalışma mevcuttur. Miktar tayini amacıyla kullanılan yöntemler arasında spektrofotometrik yöntemler, farklı dedektör sistemlerinin kullanıldığı kromatografik yöntemler, elektrokimyasal yöntemler vb. sayılabilir⁽⁸⁻¹²⁾.

Yapılan çalışmada, adli ve klinik toksikoloji laboratuvarı olarak hizmet veren Adli Tıp Anabilim Dalı Toksikoloji laboratuvarımızda deney hayvanları kullanılarak, akut parasetamol zehirlenmesi sonucu ölen olgularda, postmortem serum ve karaciğer örneklerinin değişik saklama koşullarında (+4°C ve -20°C'de, GC/MS cihazı kullanılarak) 30 günlük parasetamol stabilitesi araştırılmış ve parasetamolün postmortem serum, böbrek, beyin ve karaciğer dokularında dağılımı gösterilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, akut parasetamol zehirlenmelerinde, klinik veya adli amaçlı parasetamol düzeyi tesbiti için alınan biyolojik örneklerdeki parasetamolün dağılımını ve stabilitesini araştırarak bu konu ile ilgili veri tabanı oluşturmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adli Bilimler ve Toksikoloji

Rönesans devri bilginlerinden olan Paracelsus (M.S. 1493-1541), bilim ve felsefe arasında yer alan bir ekolün temsilcisiydi. O zamanki bir çok görüşleri bugünkü toksikoloji disiplininin konularına girmektedir. “Bütün maddeler zehirdir, zehir olmayan hiçbir madde yoktur. Zehirle devayı (ilacı) birbirinden ayıran onun dozudur” şeklindeki görüşü ile ilk kez biyolojik etkide doz-cevap ilişkisinin önemini vurgulamıştır.

Loomis, 1974 yılında toksikolojiyi çevre toksikolojisi, ekonomik toksikoloji ve adli toksikoloji olarak üç temel sınıfa ayırmış ise de günümüzde bunlara analitik toksikoloji ve klinik toksikoloji de eklenmiştir.

Adli Bilimler, en genel anlamı ile bilimin yasalara uygulanmasıdır. Geniş anlamda adli bilimler, adli tıp, adli toksikoloji, adli odontoloji, adli antropoloji, adli kimya, adli seroloji ve kriminalistik gibi bir çok alanı kapsar. Adli bilimler geçmişte olan bir olayı bilimsel yöntemlerle yeniden canlandırarak hukuk ve yasalar açısından değerlendirilmesine yardımcı olur.

Adli bilimler içerisinde yer alan adli toksikoloji, zehirlenmeleri adli tıp açısından inceler. Zehirlenmenin (kaza veya kasıtlı), hukuksal açıdan değerlendirilmesinde, maruz kalınan kimyasal maddenin neden-etki ilişkisinin saptanması önemlidir. Bu ilişkinin saptanması ise biyolojik materyalden (kan, idrar, doku ve organlar) alınan örnekteki toksik maddenin miktarını saptamak, bulunan miktarın ise doz-etki açısından yorumunu yapmaktır.

Günlük adli tıp uğraşlarında gerek klinik muayenelerde gerekse postmortem incelemelerde olgunun doğru değerlendirilmesi, sağlıklı bir sonuç yorumunun gerçekleştirilebilmesi ve ölüm nedeninin aydınlığa kavuşturulabilmesi için diğer inceleme yöntemlerinin yanı sıra adli toksikolojide önemli bir yer tutmaktadır.

Adli toksikoloji, adli bilimler tarihinde adli tıptan sonra gelişen ikinci daldır. Modern toksikolojinin kurucusu olarak bilinen Mathiev J.B. Orfila (1783-1853) ilk kez adli olaylarda bilimsel delilin gerekliliğini toksikolojik açıdan göstermiştir.

Orfilla'nın Adli Toksikolojiye en önemli katkısı zehirlerin oral alınmasından sonra gastrointestinal yolla absorbe olarak çeşitli organlara dağıldığını açıklamak olmuştur. O zaman kadar zehirlerin analizi için sadece mide içeriği kullanılıyordu.

Bir kimyasal maddenin biyolojik sistemlerde analitik yöntemlerle araştırılması ve sonucun pozitif bir delil olarak kullanılmasının adli bilimler içinde önemli bir yeri vardır. Zehirlenme olaylarının tanımlanmasında doğru örnek seçimi, örnek alma şekli, saklanması, laboratuvara gönderilmesi ve analize hazırlanması belirli bir sistematik düzen içinde yapılır. Buna göre, zehirlenmeye neden olan kimyasal maddenin belirlenmesinde ve kalitatif/kantitatif analizinde belirli bir sıraya göre izlenen yöntem sistematik toksikolojik analiz (STA) denir. Sistematik toksikolojik analiz; analize uygun örnek seçimi ve alınması, örneğin korunması ve laboratuvara gönderilmesi, toksikolojik analiz ve analitik bulguların değerlendirilmesi olarak sıralanabilir⁽¹³⁾.

Sistematik toksikolojinin en önemli basamaklarından biri olan toksikolojik analize başlamadan önce bazı faktörlerin göz önüne alınması gerekir. Bu faktörler alınabilen numune miktarı, zehirlenmeye neden olduğu düşünülen şüpheli maddenin içeriği ve biyotransformasyonu ve postmortem doku veya sıvılarda oluşabilecek bozulma maddeleridir. Toksikolojik analize başlamadan önce olguya özgü, bu konular hakkında bilgi edinilmelidir⁽¹⁴⁾.

2.2. Zehirlerin Giriş Yolları, Absorbsiyon, Dağılım ve Atımları

Bir kimyasal maddenin toksik etkisini göstermesi için, belirli giriş yollarından absorbe olması ve etki yerinde belirli konsantrasyona ulaşması gerekir. Ancak bir ksenobiyotiğin etki yerindeki konsantrasyonunu etkileyen faktörler, o maddenin organizmadaki uğradığı değişime bağlıdır. Bu değişimler; giriş yolları ve absorbsiyon, dağılım, biyotransformasyon ve atımdır.

2.2.1. Giriş Yolları ve Absorbsiyon

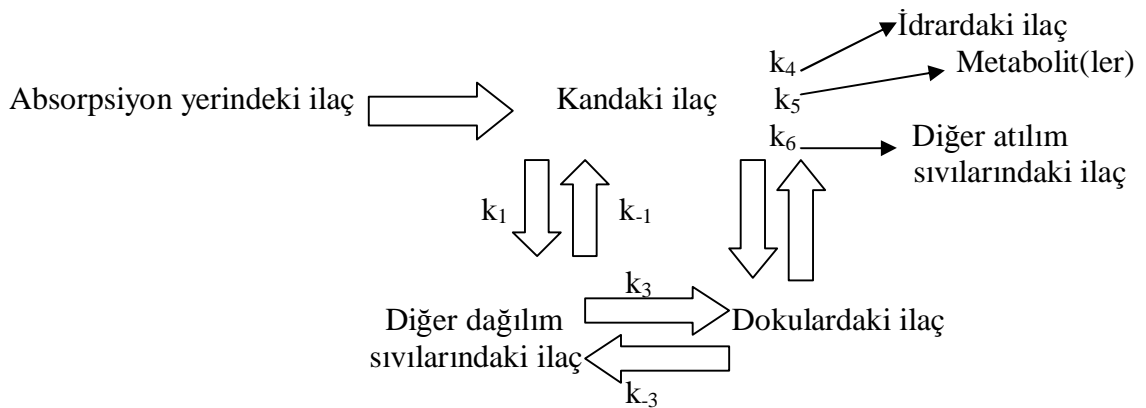
Zehir canlı organizmaya başlıca deri, akciğerler, gastrointestinal sistem ve enjeksiyon yolu ile girer. Bu yollardan giren toksik maddelerin sistemik etkilerini göstermesi için bir çok biyolojik membranları geçerek dolaşım sistemine ve oradan da etki yerlerine taşınmaları gerekmektedir. Bu nedenle giriş yollarına bağlı olarak aynı maddenin toksisitesi de farklılık göstermektedir. Toksik maddelerin, biyolojik

membranları geçerek kan dolaşımına girmesine absorpsiyon denir. Başlıca absorpsiyon yolları; solunum sistemi (akciğerler), deri, gastrointestinal sistemdir. Zehirlerin absorpsiyon hızları, özelliklerine ve giriş yollarına göre farklılık gösterir.

2.2.2. Dağılım

Organizmaya çeşitli yollardan giren kimyasal bir madde kan dolaşımı ile vücutta yayılır ve kan ile doku arasındaki konsantrasyon farkı nedeniyle de dolaşımdan ayrılarak tüm organizmaya dağılır. Bu dağılım, kimyasal maddenin hücre membranlarına geçme yeteneği ve vücutta ilgisi olan bölüme bağlı olarak değişir. Bazı maddeler hücre membranlarını geçemezler ve bu nedenle sınırlı dağılımları vardır. Bunun yanında molekül ağırlıkları küçük suda çözünebilen moleküller ve iyonlar vücut sıvısında dağılabilir ve membran gözeneklerinden geçerler. Lipide çözünen moleküller membranları difüzyon ile geçebilirler. Büyük moleküller ise ancak özel taşıma mekanizmaları (aktif transport) ile geçebilirler. Kimyasal maddelerin dolaşımdan dokulara dağılımları pek çok değişkene bağlıdır. Bunlar maddenin molekül büyüklüğü, plazma ve doku proteinlerine bağlanma oranı, çeşitli organların ve dokuların kan dolaşımı durumu, membranların geçirgenliği, plazma ve doku arasındaki pH değeri farklılığı ve özellikle de maddenin çözünürlüğü gibi parametreler önemli rol oynarlar.

İlacın absorpsiyon yerinden kana geçmesi vücutta dağılımı ve eliminasyonu ile ilgili gerçekleşen aşamalar Şekil 2.1 'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil.2.1. İlacın Absorpsiyon Yerinden Kana Geçişinin Şematik Gösterimi.

Kanda ilaç hızla plazma ve eritrositler arasında dağılıma uğrar. Plazmada ise ilaç plazma proteinleri (genellikle albümin) ve plazma sıvısı arasında dağılır. Vücuda, her biri verilen dozun bir miktarını taşıyan farklı bölmelerin bir toplamı olarak bakılabilir. İlacın bir bölmeden diğerine transferi, o transfer için spesifik bir hız sabitesi (k) ile belirlenir. Hız sabitesinin büyüklüğü transferin ne hızla meydana geleceğini tayin eder. İlaç dağılımı çoğunlukla hızlı bir proses olup nispeten büyük sabitlerle belirlenir.

Dağılımın diğer bir özelliği tersinir olmasıdır. Plazmadaki ilaç eritrositler, diğer vücut sıvıları ve dokulardaki ilaç dağılım dengesi halinde bulunur. Bu dengenin sonucunda plazma ilaç konsantrasyonundaki değişimler genellikle, farmakolojik etki yerlerini de içermek üzere, diğer dokulardaki ilaç seviyelerinin de değiştiğinin göstergesi olarak kabul edilebilir.

İlaçlar, vücut içinde dağılım sırasında özelliklerine göre organizmanın belirli yerlerinde birikirler. Birikim, toksik maddenin vücudun belirli bölgesine spesifik bir şekilde bağlanması ve yağdaki çözünürlüğü sonucu olabilir. Toksik madde bu birikim yerinde inaktif halde bulunuyorsa buradaki miktarı giderek artar⁽¹⁵⁻²⁰⁾.

2.2.2.1 Biyotransformasyon ve Biyoaktivasyon

Yağda çözünebilen (lipofilik) ilaçlar biyolojik membranlardan kolaylıkla geçerek etki yerlerine ulaşırlar. Yağda çözünürlük ilacın vücuttan atılımını (eliminasyon) kısıtlar. İlaçların yapısal değişikliğe uğramadan böbrekler yoluyla atılmaları, toplam ilaç eliminasyonunda büyük rol oynamaz. Çünkü lipofilik maddeler böbreklerde glomerüler filtrasyona uğradıktan sonra büyük oranda renal tübülerden geri emilirler. Bu nedenle, endojen olarak üretilmeyen, vücuda yabancı, farmakolojik, endokrinolojik veya toksikolojik aktivitesi olan maddeler (ksenobiyotikler) biyolojik aktivitelerinin sonlandırılması ve vücuttan atılmaları için suda çözünme özelliği yüksek hidrofilik maddelere dönüştürülür. Bu dönüşüm prosesinin tamamına biyotransformasyon denir.

Biyotransformasyon sırasında, yağda çözünen apolar kimyasal maddeler enzimatik reaksiyonlarla daha polar metabolitlere dönüşür ve atılmaları kolaylaşır. Bu dönüşüm ve atılımın tersi olarak madde organizmada enzimatik reaksiyonlar sonucu "aktif metabolit"e dönüşerek toksik etki de gösterebilir.

Genel olarak bir ksenobiyotik veya metabolitlerinin bu son mekanizma ile biyotransformasyonları sonucu toksisite azalır veya ortadan kalkarsa bu olaya

detoksifikasyon denilmektedir. Bazen de kimyasal maddenin biyotransformasyonu ile çok aktif ara metabolitler oluşabilir. Bu olaya biyoaktivasyon denir.

Yabancı maddelerin biyotransformasyonunu kataliz eden başlıca enzimler karaciğerde yerleşmişlerdir. Bu nedenle karaciğerin, kan dolaşımı ile karaciğere gelen kimyasal maddeleri depolama, dağılım ve safra ile atılımlarından önce, metabolize etme kapasitesi çok yüksektir. Ayrıca biyotransformasyon, karaciğer dışında sınırlı olarak akciğer, böbrek ve barsakta; daha sınırlı olarak deri, testis, plasenta ve adrenal bezde gerçekleşebilir. Karaciğerin metabolik aktivitesi 100 olarak kabul edilirse diğer organların metabolik işlevi Çizelge 1'deki gibi sıralanabilir. Bununla beraber bir kimyasal maddenin ekstrahepatik dokudaki biyotransformasyonu o doku için toksikolojik önem taşıyabilir⁽¹⁵⁻²⁰⁾.

Çizelge.2.1. İlaç Metabolize Edici Aktivitenin Organlara Göre Dağılımı⁽¹⁸⁾.

Organ	% Aktivite
Karaciğer	100
Akciğer	20
Böbrek	8
Bağırsak	6
Plasenta	5
Adrenal	2
Deri	1
Beyin	0.5

Biyotransformasyonla ilgili enzimatik olaylar esas olarak iki fazda gerçekleşir: Faz I reaksiyonları, oksidasyon (yükseltgenme), redüksiyon (indirgenme) ve kopma reaksiyonlarını ile substrata aktif gruplar ekleyerek, faz II konjugasyon reaksiyonlarına substrat hazırlar. Büyük kısmı karaciğer parenkima hücresinin mikrozomal sitokrom P450 (CYP450) enzimleri tarafından yapılır. Bunlar karma fonksiyonlu oksidazlar veya monooksijenazlar adını da alırlar ve ilaç molekülüne oksijen sokarlar. Ayrıca bu sistemle eşgüdümlü çalışan NADPH- sitokrom P450 redüktaz sistemi vardır.

Bu sistemde rol oynayan en önemli enzim sistemleri olan sitokrom P450 enzimleri, "Hem" grubu taşıyan ve çeşitli dokularda düz (pürüzsüz) endoplazmik retikulumda bulunan membran proteinleridir. Sitokrom P450 enzimleri iki majör grupta toplanabilir: a)Adrenal bezlerde, gonadlarda ve plasentada bulunan steroidojenik

enzimler b)ilaçların, pestisitlerin ve çevresel atıkların metabolizmasında görevli enzimler. Bütün ilaç biyotransformasyonlarında rol oynayan enzimlerin çoğunu sitokrom P450 1, 2 ve 3 gen familyaları (CYP1, CYP2 ve CYP3) kodlar. CYP450 proteinleri arasında substrat özgüllüğünün kısmen düşük olması nedeniyle söz konusu bir reaksiyonu iki ya da daha fazla enzim katalize edebilir. Birçok ilacın biyotransformasyonunda rol oynayan CYP3A4 karaciğer dışında da belirgin düzeylerde sentezlenir. İnsanlarda, yüksek konsantrasyonda ksenobiyotik ve zehirlenmelerin biyotransformasyon mekanizmasında CYP3A4, terapötik konsantrasyonların biyotransformasyon mekanizmasında ise CYP2E1 ve CYP1A2 önemli rol oynamaktadır. Fare ve sıçanlarda da CYP2E1 ve CYP1A2 biyotransformasyon mekanizmasında en önemli sitokrom P450'lerdir. Sitokrom P450 enzimlerinin seviyelerini ve aktivitelerini etkileyen nedenler olarak beslenme, sigara içmek, alkol tüketimi, ilaç kullanımı, çevresel ve genetik faktörler bildirilmektedir^(15, 19, 20).

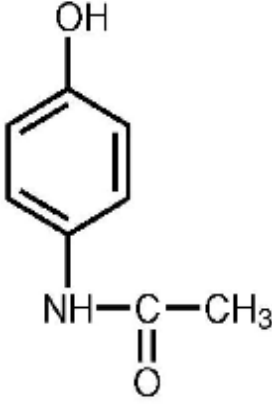
Faz II reaksiyonları, çeşitli konjugasyon veya sentez olaylarını içerir. Birinci fazda lipide çözünen ksenobiyotikler daha polar moleküller haline geçer. İkinci fazda ise endojen maddelerle birleşen bu polar metabolitler inaktif şekilde eliminasyona uğrarlar^(15, 19, 20).

Biyotransformasyon reaksiyonlarının düzenlenmesinde genetik, çevresel ve fizyolojik faktörler rol oynarlar. Genetik olarak belirlenmiş farklılıklar, ilaçların birlikte kullanımı, çevre kirliliği ve endüstriyel kimyasallarla etkileşim, hastalık durumu, yaş ve beslenme durumu ilaçların oksidasyon ve konjugasyonlarını etkileyen önemli faktörlerdir. Bu faktörler ilaçların etkilerinde artış, farmakolojik etkilerde uzama ve toksik reaksiyonlarda artışa neden olabilir^(15, 18-20).

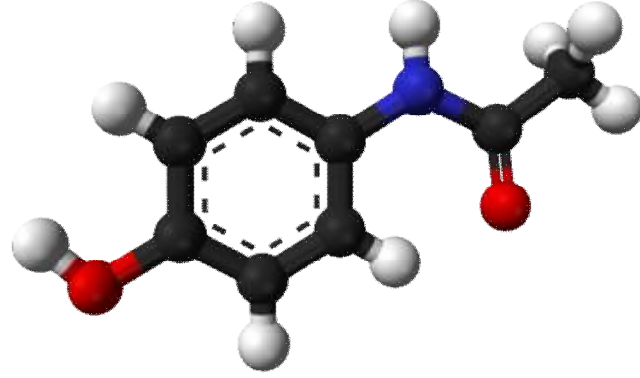
2.2.3. Atılım

Absorbsiyon ve dağılıma uğrayan toksik maddeler, biyotransformasyon sonucu çeşitli yollarla organizmayı terk ederler. Atılım idrar yolu, hepatik yol, pulmoner yol ve çeşitli vücut sıvıları (ter, gözyaşı, tükürük, süt v.b.) ile olmaktadır^(15, 18, 19).

2.3. Parasetamol (Asetaminofen, N-asetil-p-aminofenol, C₈H₉NO₂)



Şekil 2.2. Parasetamol'ün Açık Kimyasal Formülü



Şekil 2.3. Parasetamol Molekülünün Üç Boyutlu Görüntüsü

Parasetamol (asetaminofen) kömür katranı analjeziği diye adlandırılan fenasetinin aktif metabolitidir. Asetaminofen, N-asetil-p-aminofenol, APAP isimleriyle de bilinir. Beyaz kristalize yapıda ve molekül ağırlığı 151.17 gramdır. Bir grup ağrı kesici ve ateş düşürücü etkiye sahip ilacın da etken maddesidir. Analjezik ve antipiretik etken olarak aspirine etkili bir alternatiftir, aspirinden farklı olarak antienflamatuar etkisi zayıftır. Parasetamol iyi tolere edildiği için, aspirinin yan etkilerinden çoğunu taşımaz ve reçetesiz alınabilir. Parasetamol akut doz aşımında, hepatik ve/veya renal hasar sonucu ölüme yol açabilmektedir. Evlerde yaygın kullanımı ve reçetesiz kolaylıkla alınabilmesi gibi sebeplerle, parasetamol içeren ilaçlarla intihar veya kaza sonucu ölümler sıklıkla görülmektedir.⁽²¹⁻²³⁾

Hawton ve ark.'nın 80 olguda yaptığı çalışmada, intihar olgularında sıklıkla neden parasetamolün tercih edildiği konusunda şu sonuçlar elde edilmiştir: Olgulardan %50'si bu ilaca ulaşımın kolay olduğu, %29'u tehlikeli olduğunu, %4'ü ise ucuz olduğunu belirtmişlerdir⁽²⁴⁾.

Parasetamol içeren ilaçların temeli asetanilit'in kullanımı ile atılmıştır. Tıp dünyasına, 1886'da antipiretik etkisini tesadüfen keşfeden Cahn ve Hepp tarafından antifebrin adıyla kazandırılmış ama fazlasıyla toksik olduğu gözlenmiştir. Daha az toksik bileşenler arayışıyla, vücudun bu bileşene, asetanilit oksidize ettiği düşüncesiyle para-aminofenol denenmiştir. Bunun sonucunda toksisitenin azalmadığı gözlenmiştir. Daha sonra para-aminofenol'ün kimyasal türevleri denenmiştir. Bunlardan biri olan

fenasetin (asetofenetidin) uygun görülerek 1887'de terapi alanına sunulmuştur. Fenasetin nefropatiyle ilgili ilişkilendirilene kadar analjezik karışımlarda yoğun biçimde kullanılmıştır. 1893'te Von Mering, parasetamolün fenasetin içinde bulunmaması gerektiğini belirten bir bildiri yayınladı. Bunun üzerine fenasetin parasetamolden ayrıldı. Popülaritesi 1949'da hem Asetanilit'in hem de Fenasetin'in temel aktif metaboliti olduğunun anlaşılması ile artmıştır⁽²⁵⁻²⁷⁾.

2.3.1. Parasetamolün Farmakolojik Özellikleri

Parasetamol, zayıf antiinflamatuvar özelliktedir. Bunun nedeni olarak, vücutta antiinflamatuvar etki gösteren bileşiklere, dönüşümü sağlayan, araziidonik asitin prostaglandin H₂'e (stabil olmayan bir molekül) dönüşümünden sorumlu, siklooksijenaz (COX) enzimlerinin okside formunun parasetamol tarafından inhibe edilmemesi gösterilmiştir. Klasik antiinflamatuvar etkili ilaçlar, örneğin NSAİİ'ler, bu basamağı bloke ederek etkilerini gösterirler.

Ağrı kesici özelliği ile ilgili yapılan çalışmalarda ise parasetamolün endojen kannabinoid sistemini ayarlayarak bu özelliği gösterdiği belirtilmektedir. Parasetamol, endojen kannabinoidlerin/vaniloid anandamidlerin nöronlar tarafından tutulumunu inhibe eden AM404'e metabolize olur. Anandamidin nöronlar tarafından tutulumu, vücudun ana ağrı reseptörünün aktivasyonu sonucu oluşur. Bununla beraber AM404 anestezipler gibi (lidocaine, procaine v.b) sodyum kanallarını inhibe ederek de ağrı kesici özellik gösterdiği belirtilmektedir.

Tek veya tekrarlanan teröpatik dozların kardiyovasküler ve solunum sistemleri üzerinde etkisi yoktur. Asit baz dengesi değişmez, ilaç gastrik rahatsızlık, erozyon veya salisilatların kullanımından sonra oluşan kanamalara da yol açmaz. Asetaminofenin plateletler, kanama zamanı veya ürik asit salgısı üzerinde etkisi yoktur⁽²⁵⁻²⁸⁾.

2.3.2. Parasetamolün Farmakokinetiği, Biyotransformasyon ve Biyoaktivasyon Mekanizması

Parasetamol, oral yolla alındığında gastrointestinal bölgede hızla ve tamamen emilir. Plazmadaki konsantrasyon 30-60 dakikada zirveye ulaşır ve plazmadaki yarılanma ömrü terapötik dozdan sonra 2-4 saat kadardır. Oral yolla alımında biyoyararlılığı %80 olarak bildirilmiştir. Rektal yolla alımında da, oldukça iyi fakat

yavaş absorplandığı ve biyoyararlılığının %30-40 olduğu bildirilmektedir. Parasetamol, çoğu vücut sıvılarına eşit olarak dağıtılır, dağılım hacmi 0.9 L/kg olarak bildirilmiştir. Plazma proteinlerine tutunması uzun süreli değildir⁽²⁹⁾.

Parasetamolün biyotransformasyonu, majör ve minör olmak üzere iki yol izler. Toksik dozda parasetamol alımında toksisiteye sebep olan parasetamolün minör yolağında oluşan aktif metaboliti N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI)'dir. Şekil 2.4'de parasetamolün majör ve minör biyotransformasyon yolları ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.

Glukuronidasyon ve sülfasyon konjugasyonu sonucu oluşan metabolitler ve ilacın konjuge olmayan formları, vücut için toksik olmayıp idrarla dışarı atılmaktadır. Sitokrom P450'ye bağlı oksidasyonda oluşan aktif metabolit N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) reaktif elektrofilik yani serbest radikal oluşumuna neden olma özelliğine sahiptir, toksiktir. Parasetamol terapötik dozda alındığında, NAPQI glutatyon ile bağlanarak detoksifiye edilmekte ve merkapturik asit ve sistein konjugatları olarak idrarla atılmaktadır.

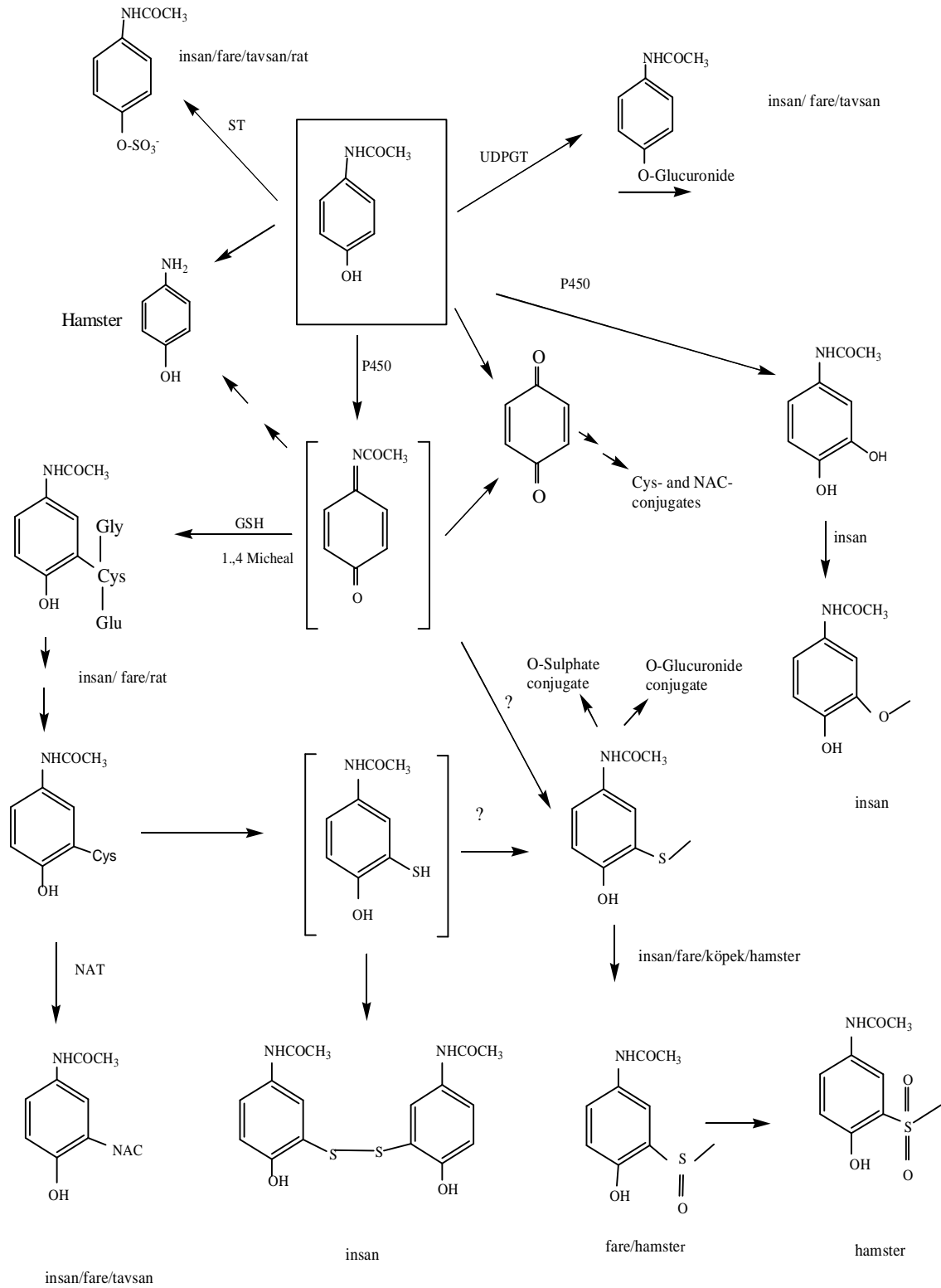
Parasetamolün biyotransformasyonu ve biyoaktivasyonu büyük ölçüde karaciğerde ve bir kısımda böbrekte üç temel mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bunlar glukuronidasyon, sülfasyon ve mikrozomal oksidasyondur (sitokrom P450'ye bağlı oksidasyon). Buna göre karaciğere gelen parasetamolün bir kısmı majör yol ile üridin difosfoglukronil transferaz enzimi kullanılarak parasetamolün glukuronid konjugatına (PAR-GLUC), sülfotransferaz enzimi ile de sülfat konjugatına (PAR-SULP) dönüştürülür. Karaciğerde oluşan bu konjugatların bir kısmı safraya bir kısmı kan dolaşımına geçer. Minör yol ile sitokrom P450 enzimi kullanılarak karaciğerde oluşan NAPQI toksik metabolitin bir kısmı protein arilasyonu oluşturur bir kısmı ise glutatyon konjugatına (PAR-SG) dönüşerek safraya gönderilir. Oluşan glutatyon konjugatının bir kısmı ise parasetamolün sisteinilglisin konjugatına (PAR-CG) ve daha sonrada parasetamol sistein konjugatına (PAR-Cys) dönüşerek kan dolaşımına geçer. Böbreklere ulaşan parasetamol ise prostaglandin endoperoksit sentetaz enzimi (PGES) kullanılarak NAPSQI (N-asetil-p-benzosemiquinone)'e dönüştürülür oluşan bu radikal böbreklerde NAPQI'ya dönüşerek karaciğerde minör yolağa katılır. Parasetamolün insan vücudunda dağılımı ve metabolizması ayrıntılı olarak şekil 2.5'de gösterilmiştir.

Terapötik dozda parasetamol alımından sonra, ilacın %90-%100'ü ilk gün içinde glukoronik asit (glukoronat konjugatı, %47-62), sülfirik asit (sülfat konjugatı, %25-36), sistein konjugatı ve merkaptürik asit konjugatı (%5-8) olarak hepatik konjugasyondan hemen sonra idrarla geri atılır. Parasetamolün %1 kadarı da idrarla değişmeden atılır. Parasetamolün idrarla atılan metaboliti 3-OH-PAR ve 3-OCH₃-PAR'dır.

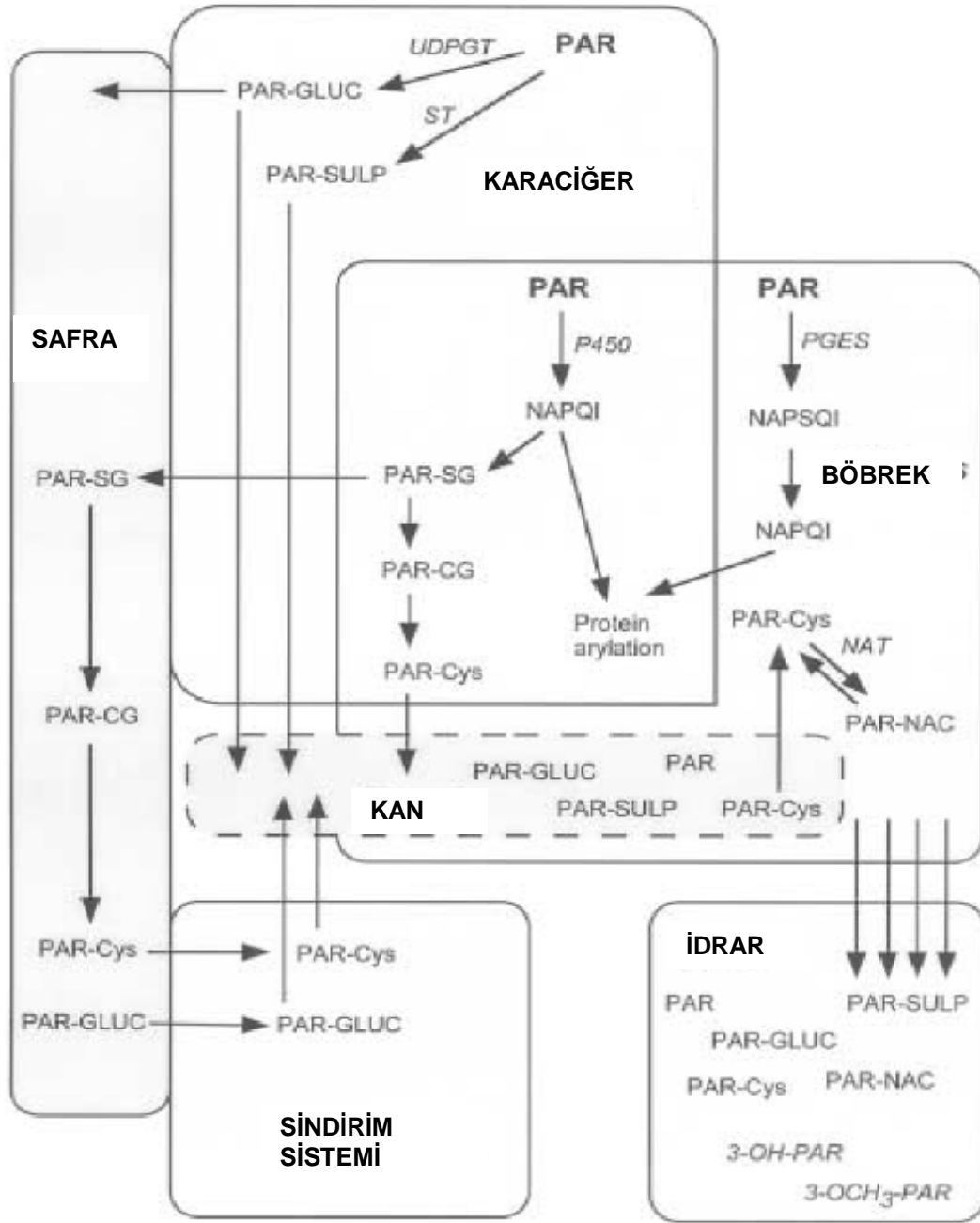
Glutasyon kolaylıkla hidrojen iyonu verebilen bir bileşiktir. Bu özelliği ile dokuları peroksidatif zarardan korur, ayrıca içerdiği sülfür grubu ile detoksifikasyona da katılır. Amino asitlerin grup translokasyonu ve membrandan taşınmalarında da görevlidir. Peroksidatif zararı ortadan kaldırma sırasında glutasyon peroksidaz enzimi görev alır. indirgenmesinde ise NADPH kullanan glutasyon redüktaz enzimi görev yapar.

Toksik dozda parasetamol alımından sonra, parasetamol hepatik glutasyon ve sülfat depolarını tüketecek miktarda, toksik metaboliti olan N-asetil-benzoqinoneimin'e (NAPQI) dönüşür. Detoksifikasyon kapasitesi sınırlı olduğu için sitokrom P450'ye bağlı oksidasyon ve dolayısıyla minör yol ile oluşan NAPQI oluşumu artar. NAPQI, vücuttaki depo glutasyon ile zararsız hale getirilmeye çalışılır. Bu arada glutasyon depoları tükenir. Arta kalan serbest haldeki NAPQI eritrositlerdeki demire ve karaciğer hücrelerindeki makromoleküllere bağlanarak methemoglobinemi, alyuvar patalojisi ve sentrilobuler karaciğer hasarına yol açmaktadır. Hepatik toksikasyon için karaciğer glutasyon depolarının %70'inden fazlasının kaybolması gerektiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, yetişkinlerde parasetamolün birincil metabolize yolu glukoronid konjugasyonu iken bebek ve çocuklarda sülfat konjugasyonu olarak gösterilmiştir. Çocuklarda ilacın glukuronidasyon kapasitesi yetişkinlerden daha düşüktür^(16, 30-33).

Fare ve sıçanlarla yapılan çalışmalarda, parasetamolün oksidasyon metabolizmasında yer alan sitokrom P450 enzimlerinin türü nedeni ile metabolizmada yer alan ve nontoksik olan 3-OH-parasetamolün (3-OH-PAR) önemli ölçülerde oluşması, sıçanın fareye oranla parasetamole bağlı hepatotoksisiteye daha düşük duyarlılık göstermesine neden olabildiği belirtilmektedir⁽³⁰⁾.



Şekil 2.4. Parasetamolün Biotransformasyon ve Biyoaktivasyonu (Goldfrank's Toxicology Emergencies)



Şekil 2.5. Parasetamolün İnsanlarda Dağılımı ve Metabolizması (Bessems ve ark.2001).

2.3.3. Parasetamolün Terapötik Kullanımı

Terapötik dozda, parasetamol genellikle iyi tolere edilir. Analjezik veya antipiretik amaçlı kullanımlarda aspirinin yerine almak için uygundur. Aspirin kullanamayan hastalarda (örneğin peptik ülseri olanlar veya aspirinin kanamayı

artıracağı durumlarda) özellikle değerlidir. Parasetamolün yetişkinlerde, uygun oral dozu 325-1000 mg'dır (rektal alınırsa 650 mg). Günlük toplam doz 4000 miligramı geçmemelidir. Çocuklar için, tek doz 40-480 miligramdır. Yaşa ve kiloya bağlı olarak 24 saatte 5 dozdan fazla verilmemelidir^(16, 25).

2.3.4. Parasetamolün Toksik Etkileri

Akut aşırı dozda, parasetamolün en ciddi yan etkisi, doza bağlı potansiyel olarak ölümcül hepatik nekrozdur. Renal tübüler nekroz ve hipoglisemik koma da oluşabilir. Parasetamolün aşırı dozunun hepatoselüler yaralanmaya ve ölüme yol açtığı durumlarda oluşan mekanizma, onun toksik reaktif metabolitine (NAPQI, N-asetil-benzoquinoneimin) dönüşümünü içerir. Normal koşullarda bu ara ürün glutatyon (GSH) ile konjugasyon yaparak elimine edildikten sonra merkaptürik asite metabolize olarak idrarla atılır. Fakat aşırı dozda, vücudun antioksidan savunmasında önemli bir faktör olan hepatik glutatyonun (GSH) seviyesi %70'den fazla azalır. GSH azalmasında reaktif ara ürün, kovalan bağ ile hücre makromoleküllerine bağlanır. Bunun sonucu olarak enzimatik sistemlerin fonksiyonu engellenir. Aktif metabolit, glutatyona bağlanarak atılamadığından dokulardaki sitozol proteinlerine bağlanarak hücrenel nekroz oluşturur.

Toksik dozda parasetamol alımında, klinik bulgular üç evredir. Birinci evrede oral alımdan bir veya birkaç saat sonra bulantı, kusma, anoreksi ve diaforezi gözlenir. İkinci evrede bu semptomların şiddeti azalır, hepatik enzimler ile bilirübin seviyelerinde aşırı yükselmeler gözlenir. Protrombin zamanında yükselme de bunlara eşlik eder. İdrar, renal hasar, ilacın diüretik etkisi ve dehidratasyondan dolayı azalır. Üçüncü evre 3-5 gün sonra oluşur. Sarılıkla birlikte hepatonekroz, hipoglisemi, ensefalopati ve miyokardiyopati görülür. Hepatik yetmezlik ve nekroz ölüme neden olur.

Cilt tahrişi ve diğer alerjik reaksiyonlar nadiren görülür. Tahriş genellikle eritematöz veya ürtikerdir ama bazen daha ciddi olabilir ve ilacın yol açtığı ateş ve mukozal lezyonlar da eşlik edebilir. Bilinç bozukluğu plazma parasetamol düzeyi 1 mg/ml'nin üzerinde olduğunda gözlenir.

Literatürde toksisiteyi artıran etkenler olarak; glutatyon tüketimi (diyetle ön tedavi, düşük protein diyeti), hepatik sitokrom P450'nin indüklenmesi (alkol tüketimi, fenobarbital kullanımı), oksidatif strese hepatik cevabın azalması (E vitamini azalması)

bildirilmiştir. Toksikiteyi azaltan etkenler ise; antioksidanlar (E vitamini), hepatik enzim inhibitörleri (simetidin), redükleyici ajanlar (askorbik asit) olarak belirtilmektedir^(28, 35).

2.3.4.1. Parasetamol Kaynaklı Hepatotoksisite

Parasetamol başlıca sülfat (%93) ve glukoronid konjugatı şeklinde atılır. Yüksek dozda ise parasetamolün, sülfat havuzunun tükenmesinden dolayı sülfat konjugatının oranı düşerken (%43), glukoronid konjugasyonu oranı daha çok artar. Ancak glukuronidasyon hızı da sınırlı olduğundan, minör biyotransformasyon yolu önem kazanır ve sonuçta sitokrom P450 (CYP2E1, CYP1A2, CYP3A4) sisteminin etkisi ile N-hidroksiasetaminofen ve bunun rezonans şekli olan aktif kinonimin metaboliti (NAPQI) oluşur. Bu aktif ara metabolit glutatyon mevcut olduğu sürece glutatyon konjugatı şeklinde detoksifikasyona uğrar. Ancak glutatyon havuzu sınırlıdır ve tükendiğinde bu elektrofilik ara metabolit hücrenin nükleofilik makromolekülleri ile kovalan bağla bağlanır. Bu bağlanma parasetamolün artan serum konsantrasyonu ile açıklanır. Sonuçta hepatotoksik etki ortaya çıkar. Doz aşımından 4 saat sonra ölçülen 200 µg/ml ve üzerinde serum parasetamol miktarı hepatotoksitenin göstergesi olabilir. Hepatik hasarın klinik belirtileri toksik dozların emiliminin 2.-4. gününde de ortaya çıkabilir. Plazmadaki hepatik enzim (aspartat amino transaminaz, alanin transaminaz, laktat dehidrogenaz v.b) ve bilirubin konsantrasyonu da artabilir. Bu değerlere bakılarak hepatotoksitenin şiddeti gözlenebilir. Tedavi edilmeyen zehirlenmiş hastaların %10'nunda karaciğer hasarı meydana gelir. Bunların %10-%20'si hepatik yetersizlikten ölür.

Yapılan çalışmalarda parasetamol ve kokainin histopatolojik incelemelerinde benzer lezyonlar gözlenmiştir. Bunun sebebi her iki maddenin metabolizmasında yer alan sitokrom P450 enzimlerinin karaciğerin bölge 3 (zone 3) adı verilen kısmında yer almasıdır.

Parasetamol kullanımına bağlı hepatotoksiteyi artırıcı risk faktörleri; alkol kullanımı, açlık ve kullanılan diğer ilaçlarla parasetamolün etkileşimidir.

Parasetamol, alkoliklerde, alkol kullanmayanlara göre daha az tolere edilebilir. Bunun sebebi ise alkolün, parasetamol metabolizmasında önemli rol oynayan hepatik sitokrom P450 enziminin, aktivitesini artırarak, parasetamolün toksik metabolitinin birikimini hızlandırması ve böylece daha çabuk toksisiteye neden olmasıdır.

Price ve ark. ratlarla yaptığı çalışmada ise açlık durumunun, hepatotoksisiteyi artırıcı faktörlerden biri olduğu bildirilmektedir⁽³⁶⁾.

Kullanılan diğer ilaçlarla parasetamolün etkileşimi konusunda yapılan çalışmalarda da uzun vadeli karbamazepin, fenitoin, izoniazid ve troglitazon kullanımında CYP'lerin indüklendiği böylece hepatotoksisitenin arttığı belirtilmektedir^(3, 15, 36-67).

2.3.4.2. Parasetamol Kaynaklı Renal Toksikite (Nefrotoksikite)

Tür ve cinsiyet farklılıklarına bağlı olarak hepatotoksisitenin yanında akut renal toksikite de gözlenebilir. Kronik düşük dozlarda hedef organ böbrektir. Prostaglandin endoperoksit sentaz (PGES), N-deasetilaz ve P450ler, parasetamolün yüksek dozda alımı ya da uygulanmasından sonraki renal toksikite mekanizmasında yer alırlar. Farelerde ve sıçanlarda, renal toksikite parasetamolün sitokrom P450'ye bağlı bioaktivasyonunu içerir. Karaciğerdeki bioaktivasyonun tersine, renal (CYP2E1-bazlı) bioaktivasyon ve toksikitede cinse bağlı önemli farklılıklar gözlenir.

Parasetamolün uzun süreli kullanımlarında analjezik nefropati riski artırmaktadır. Prescott 'un yaptığı çalışmada, sağlıklı kişilerde parasetamolün böbreklerden atılımı, idrar akış hızına bağlı fakat idrar pH'sından bağımsız olarak 20 mg/kg oral olarak alındığında 13 ml/dakika olarak belirtilmektedir⁽⁶⁸⁾.

Yılda 366 tablet (0.5 g'lık) veya daha fazla kullananlarda bu riskin 2.1 kez arttığı gözlenmiş ve bir incelemede son dönem böbrek hastalığı olgularının %8-10'nunun kronik parasetamol ile ilişkili olduğu bildirilmiştir⁽⁶⁹⁻⁷³⁾.

2.2.5. Parasetamol Zehirlenmesinde Tedavi

Parasetamol zehirlenmelerinde, öncelikle parasetamolün absorpsiyonu engellenmeli ve prognozu gösteren değerler takip edilerek değerlendirilmeli ve hastanın destek tedavisi planlanmalıdır. Yüksek dozda parasetamolün alımından sonraki 4 saat içinde absorpsiyonunun engellenmesi için gastirik aspirasyon ve lavaj veya ipeka şurubu kullanılabilir. Aktif kömür uygulaması da absorpsiyonun engellenmesinde basit ve alternatif bir yöntemdir. Aktif kömür barsak lümeni içinde parasetamole bağlanarak absorpsiyonu engeller. Bu yollardan birini kullanarak parasetamolün emilimi büyük oranda engellenir. Tedavi sırasında kan parasetamol düzeyi ve parasetamol zehirlenmelerinde hedef organlar karaciğer ve böbrek

olduğundan hepatic ve renal fonksiyonlar takip edilmelidir. Parasetamol zehirlenmelerinde en önemli ilk gösterge kan parasetamol değeridir. Yüksek dozda alımdan sonraki 4. saate kadar barsaktaki ilaç absorpsiyonu tamamlanmamış olabileceği için elde edilen kan parasetamol düzeyi zehirlenmenin şiddetini güvenilir olarak göstermez.

Parasetamol zehirlenmelerine hepatic glutatyon tüketimi neden olmaktadır. Uygulanacak tedavide, glutatyon hepatositler içine geçmediği için, hepatic glutatyonu yerine koymak yerine hepatic glutatyon tüketiminin veya parasetamolün toksik metabolitine dönüşmesinin engellenmesi sağlanmalıdır. Parasetamol zehirlenmelerinde kullanılan antidotlar; N-asetilsistein, sistamin, dimerkaprol ve metionindir^(3, 29,74,75).

2.4. Akut Toksikite Testleri

Bir kimyasal maddenin toksisite potansiyelini öğrenmek için akut toksisite testleri yapılmalıdır. En yaygın kullanılan akut toksisite testi letalite testidir. Bu testin amacı, bir kimyasal maddeye maruziyetin sonucu ortaya çıkabilecek toksik semptomları, beyin, böbrek, karaciğer gibi belli başlı organların etkileniş derecesi veya öldürücü doz (letalite) değerini saptamaktır. Test genellikle fare veya sıçan gibi temini kolay ve maliyeti düşük deney hayvanları üzerinde yapılır. Testte kullanılacak deney hayvanlarının sağlıklı olmaları, test işlemlerinden önce laboratuvar ortamında belli bir süre gözetim altında tutulması gerekir.

Bir defada verildiğinde test grubundaki hayvanların % 50'sini öldüren doza, o maddenin letal dozu (LD₅₀) denir. Kimyasal maddelerin kısa süreli maruziyetine bağlı akut toksik etkilerini değerlendirmek açısından LD₅₀ değeri önemlidir. LD değeri verilirken kullanılan deney hayvanı ve maruziyet yolunun da belirtilmesi gerekir. Bir maddenin LD₅₀ değeri ne kadar düşükse, insanlar için toksisitesi o denli büyük demektir. Deney hayvanlarındaki tür farkının yanında yaş, cinsiyet, besin, sosyal ortam, sıcaklık ve nem gibi fiziksel ortamlar da LD₅₀ değerini değiştirebilmektedir.

Letal doz değeri, o maddenin ne kadar güvenli kullanılabileceğinin de bir göstergesi olarak kabul edilir^(76, 77).

2.5. Parasetamolün Serum ve Organlarda Tayini İçin Kullanılan Yöntemler

Son yıllarda geliştirilen duyarlı yöntemler, düşük miktarlarda analitlerin tayinlerine imkan vermektedir. Literatürde Parasetamol (asetaminofen) miktar tayini için çeşitli matrisler içinde birçok çalışma mevcuttur. Miktar tayini amacıyla kullanılan yöntemler arasında spektrofotometrik yöntemler, farklı dedektör sistemlerinin kullanıldığı kromatografik yöntemler, elektrokimyasal yöntemler vb. sayılabilir⁽⁷⁸⁻⁸³⁾.

2.5.1. Katı faz Ekstraksiyon Yöntemi ile Örnek Hazırlama

Günümüzde örnek hazırlama bir çok alanda enstrümental analiz öncesi en önemli basamağı oluşturmaktadır. Kullanılan örnek hazırlama yönteminin istenilen saflıkta süzüntüler elde edilebilmesine olanak sağlamasının yanı sıra, mümkün olduğunca hızlı ve ekonomik olması istenir. Katı faz ekstraksiyon (Solid Phase Extraction, SPE) metodu bu yönde sahip olduğu önemli avantajlar sayesinde özellikle farmakoloji ve toksikoloji alanında en çok kullanılan örnek hazırlama yöntemi haline gelmiştir.

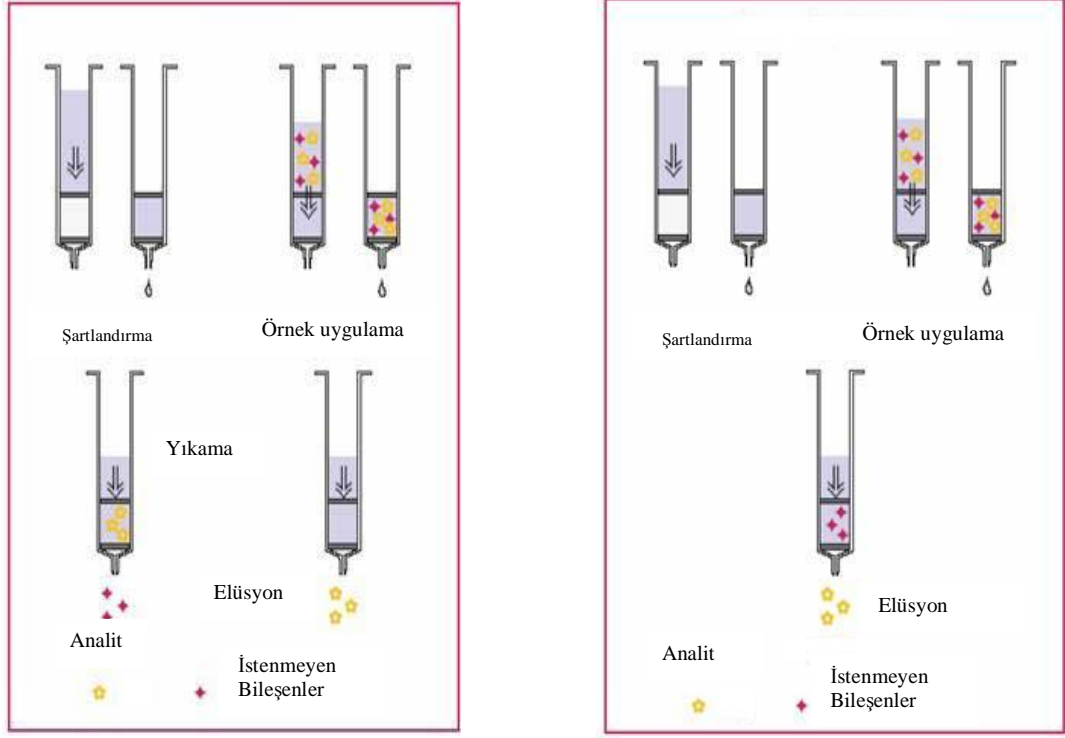
SPE yöntemi, temel olarak küçük, tek kullanımlık ekstraksiyon kolon veya disklerine çeşitli tutucu maddelerin doldurulması ve sıvı örneklerini istenmeyen bileşenlerden ayırma (temizleme), yoğunlaştırma ve ileriki analiz aşamaları için örnek matris yapısının değiştirilmesi amaçlarıyla hazırlanmış olan kolon ve disklerden geçirilmesi esasına dayanmaktadır. Sıvı örneğin kolondan geçirilmesi, yerçekimi vasıtasıyla (manual) gerçekleştirilebildiği gibi, zaman kaybının önüne geçmek amacıyla vakum manifoldları yardımıyla da yapılabilir.

SPE metodunda kolondan geçirilme sırasında örnek molekülleri ile tutucu madde arasında kimyasal bir etkileşim meydana gelir. Bu etkileşimden faydalanarak maddelerin ayrılma işlemi başlıca iki yolla gerçekleştirilir.

Birinci yöntemde ilk aşamada, analiz edilecek bileşik tutucu maddeye bağlanarak kolon içinde tutulurken, çözelti ve istenmeyen bileşenler bu madde ile herhangi bir etkileşime girmezler. Daha sonra istenmeyen bileşenler uygun yıkama çözeltisi ile uzaklaştırılır ve analiz edilecek bileşen tutucu maddeden uygun bir çözelti yardımıyla çözdürülerek alınır (Şekil 2.6.).

Daha az tercih edilen ikinci yöntemde ise, istenmeyen bileşenlerin tutucu madde ile etkileşimi söz konusudur. Özellikle atık yağlar gibi matrisden ayrılması zor olan

maddelerin analizinde kullanılan bu yöntemde, matristeki istenmeyen bileşenler tutucu madde tarafından sıkı şekilde bağlanırlar. Asıl aranan madde ise tutucu madde ile etkileşime girmez ve uygun çözelti yardımıyla çözdürülerek toplanır. Bu yöntemde, kolon içerisindeki tutucu maddenin oluşturduğu katı faz filtre işlevi görmektedir.



Şekil 2.6. SPE Yöntemi ile Maddelerin Ayrılma Şekilleri

Şekilde de görüldüğü gibi, her iki ayırma yönteminde de SPE kolondaki tutucu maddenin önce şartlandırılması gerekmektedir. Şartlandırma işlemi, kolondan uygun çözelti geçirilerek tutucu maddenin aktif hale getirilmesi ve matristeki maddeler ile tekrarlanabilir etkileşim için gerekli ortamın sağlanabilmesi amacıyla yapılmaktadır. Polar olmayan tutucu maddeler, kolon hacminin 2-3 katı miktarda suyla karışabilen metanol, tetrahidrofur, isopropanol gibi polar çözücüler ile; polar tutucu maddeler ise polar olmayan çözücülerle şartlandırılmaktadır. SPE metodunda ayırma işleminin gerçekleşmesi için tutucu madde ve çözücüler büyük önem taşımaktadır.

SPE metodunda maddelerin birbirinden ayrılması, analizi yapılacak maddenin molekülleri ile tutucu maddedeki etkin gruplar arasındaki moleküller arası etkileşimler sayesinde açıklanır. Analizi yapılacak madde molekülleri tutucu maddelerdeki etkin gruplara iyonik, hidrojen, dipol-dipol, dipol-indüklenmiş dipol ve indüklenmiş dipol-

indüklenmiş dipol (van der Waals) bağları ile bağlanır. Bu şekilde aranan madde, matriksteki istenmeyen bileşikler ve çözücüler birbirinden ayrılmış olur.

SPE metodunun diğer örnek hazırlama yöntemlerine, özellikle sıvı-sıvı ekstraksiyona kıyasla daha fazla tercih edilmesinin nedenleri ve önemli avantajlı yönleri şu şekilde özetlenebilir: SPE metodu klasik sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemine göre daha hızlı sonuç verir ve örnek hazırlama süresinin oldukça kısılmasını sağlar, SPE, çok pratik ve bütün laboratuvarlarda kolaylıkla uygulanabilir bir metottur, bu yöntemde daha az çözücü ve ayıraç madde kullanıldığından daha ekonomik bir örnek hazırlama yapılabilir, geri kazanım (recovery) oranı yüksektir ve istenilen yoğunlukta örnekler elde edilebilir, örnek, tutucu madde ve çözücüler arasında çapraz bulaşma riski düşük olduğundan yüksek doğrulukta sonuçlar alınabilir, Düşük miktarda örnek işlendiğinden sıvı-sıvı ekstraksiyondaki gibi emülsiyon oluşma problemi yoktur, SPE metodunda en az düzeyde uçurma işlemine ihtiyaç duyulduğundan kararsız örnek oluşumu nadirdir, Çözücü ve örneklerin az miktarlarda kullanılmasından dolayı zehirli maddelerle temas daha azdır ve ayrıca daha az cam malzeme kullanılması nedeniyle analizi yapanlar için oldukça güvenli bir metottur. Ayrıca çevreyi kirletme riski daha düşüktür, çok sayıda örneğin aynı anda ve tekrarlanabilir şekilde işlenebilmesine olanak sağlayacak şekilde çok kolay otomasyon sağlanabilir.

İdrar, kan, serum, safra, mide içeriği, karaciğer, beyin gibi biyolojik örneklerde ilaç düzeylerinin tespiti günümüzde SPE'nin en önemli kullanım alanlarından birisidir. Bilindiği gibi ilaç geliştirme aşamalarının önemli bir basamağı; ilaç ve metabolitlerinin vücut sıvılarındaki seviyelerinin tespit edilmesidir. Bunun yanında tedavi etkinliğinin takibi amacıyla da biyolojik örneklerde ilaç miktarının analizi önem taşımaktadır. Özellikle yüksek geri kazanımlara sahip olması, daha saf süzüntüler elde edilebilmesi ve çok sayıda örneğin kısa zamanda işlenmesine olanak verecek şekilde otomasyon sağlayabilmesi nedeniyle hemen hemen bütün ilaç ve benzeri maddelerin analizinde SPE yaygın olarak kullanılmaktadır^(80, 84-88).

2.5.2. Kromatografik Yöntemler

Kromatografinin genel tanımı, iyon veya molekül halinde bulunan katı, sıvı ve gaz karışımlardaki bileşenleri, bir faz sisteminde dağılım denge farkına dayanarak kalitataif veya kantitatif ayırmayı sağlayan yöntemdir.

Kromatografik ayırmada maddeler birbiriyle karışmayan iki faz arasında dağılırlar. Fazlardan biri hareketli (mobil) faz, diğeri durucu (stationary) fazdır. Karışımdaki her maddenin hareket hızı dağılıma katsayısı ile belirlenir. Hareketli fazda daha çok dağılıma uğrayan maddeler daha hızlı hareket ederken, sabit fazda dağılımı fazla olan maddeler daha yavaş hareket ederler. Kolon içine doldurulmuş birbirine yakın gözenekli partiküller sabit fazdır. Hareketli faz ise partiküller arası boşlukları doldurur. Hareketli faz kolon boyunca maddeleri sürükler. Kolondan çıkan her maddenin konsantrasyon profiline pik ismi verilir. Kromatografinin en yaygın kullanım alanı kantitatif analizlerdir.

2.5.2.1. Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi (GC/MS)

Kompleks karışımlardaki uçucu bileşikleri tanımlamak için kullanılan yöntemlerden biridir. Cihazın gaz kromatografi bölümü; kimyasal karışımları saf gaz halinde bileşenlerine ayırırken, kütle spektrometresi bileşiklerin yapısını tanımlamaktadır. Kütle spektrometresine gaz fazında verilen bileşikler, bir elektron akışı ile bombardıman edilerek birer elektronlarını kaybeder ve M^+ yüklü moleküler iyonunu oluşturur. Moleküler iyon radikal halinde bir iyondur ve molekül ağırlığı analit molekülü ile aynıdır. Yüksek enerjili elektronlar ile analit molekülleri arasındaki çarpışmalar moleküle, genel olarak onu uyaracak kadar yüksek enerji verir. Uyarılmış molekülün durulması, sık sık parçalanma şeklinde olur ve daha düşük kütleli iyonlar ortaya çıkar. Elektron çarpması sonucu elde edilen pozitif iyonlar, kütle spektrometrenin slit aralığından geçirilir ve kütle/yük oranına ayarlanmış bir ekranda kütle spektromu halini alır. Kütle spektrumlarının grafikteki çizgiler şeklinde sunulmuş tarzında her çizgi, kütle/yük oranına karşı gelen iyonun bağıl şiddetini gösterecek şekilde tasarlanmıştır. Her spektrumda en büyük olan pik temel pik olarak adlandırılır ve bu pik 100 değerine karşılık kabul edilir, geri kalan piklerin yükseklikleri bu temel pike oranlanarak, temel pikin yüzdesi cinsinden uygun yükseklikte verilir.

Bir kütle spektrometresinde analitin gaz halinde iyonlarını elde etmek için en sık kullanılan iyonlaştırma kaynakları; Elektron impact (EI), kimyasal iyonlaştırma(CI) ve alan iyonlaştırmadır (FI). Elektron impakt iyonlaştırıcıda, ısıtılan bir tungsten veya renyum telden yayılan enerjik elektronlar kullanılır. Kimyasal iyonlaştırmada, iyonlaştırılmış başka bir reaktif gazın iyonları ile çarpıştırılması ile elektron

bombardımanı oluşturulur. Alan iyonlaştırmada ise yüksek potansiyelli elektrotların yarattığı yüksek elektrik alanının etkisi kullanılır. Gaz fazındaki moleküller, çok hızlı hareket eden bu üç farklı elektron çarpıştırma tekniği ile çarpıştırılır. Pozitif iyonlar m/e oranlarına göre birbirlerinden çeşitli yöntemlerle ayrılırlar ve dedektörde sayılırlar. En fazla pozitif iyon 70 eV enerjideki elektronlar kullanıldığında oluşur. Elektronlarla çarpışma sonucu başka reaksiyonlarda meydana gelir ve moleküller en zayıf yerlerinden parçalanır. Bu parçalanma, aynı enerjideki elektronlar kullanıldığı sürece aynı kalır ve molekülün bir çeşit parmak izi gibidir. Gaz fazı iyon kaynaklarının kullanımı, kaynama noktaları 500°C'dan küçük termal olarak kararlı maddelerle sınırlıdır ve mol kütleleri 103 daltondan daha küçük bileşikler incelenebilir.

Gaz kromatografi-kütle spektrometresi birleşik sisteminde alınan spektrum bir bilgisayarda depolanarak üzerinde işlemler yapılabilir. Bilinmeyen bileşiğe ait spektrum bilgisayarın kütüphanesinde bulunan diğer bileşiklerin spektrumlarıyla karşılaştırılabilir. Yöntemin hassasiyeti oldukça yüksektir⁽⁸⁹⁾.

Kromatografik yöntemler kullanılarak yapılan biyoanalitik analizlerde kromatografik metod geçerliliği (validasyon) de sağlanmalıdır.

Metod validasyonu bir analitik metodun belirlenen amaçlara uygunluğunun tarafsız olarak test edilmesi ve yazılı delillerle kanıtlanmasıdır. Metod validasyonunda kullanılan performans kriterleri ve bu kriterlerin kabul edilebilir limitlerini içeren bir plan kapsamında gerçekleştirilir. Metod validasyonunda kullanılan performans kriterlerinden bazıları doğruluk (accuracy), kesinlik (precision), doğrusallık (linearity), range (ölçüm aralığı), geri alma (recovery), tayin limiti (limit of detection), ölçüm limiti (limit of quantitation), hassasiyet (sensitivity), özgüllük (specificity) ve sağlamlık (robustness) olarak sayılabilir⁽⁹⁰⁻⁹⁴⁾.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, TF2007-D5 no'lu proje önerisine Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Biriminden sağlanan parasal destek ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmanın, deneysel hayvan çalışması olması nedeni ile Çukurova Üniversitesi Tıbbi ve Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi Etik Kurulundan onay alınmıştır.

Analjezik ve antipiretik amaçlı, yaygın olarak kullanılan ve etken maddesi parasetamol (asetaminofen) (500 mg/tablet) olan parol (Atabay, müstahzar ismi) isimli ilaç, Çukurova Üniversitesi Tıbbi ve Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi tarafından sağlanan 250-300 gr ağırlığındaki 42 adet Wistar Albino cinsi erkek rata 1000 mg parasetamol olacak şekilde (2 tablet) uygulanarak, bu ratlar üzerinde akut parasetamol zehirlenmesi gerçekleştirildi. Deney hayvanları dekapite edildikten hemen sonra kan ve organ örnekleri (karaciğer, böbrek ve beyin) alındı. Alınan örnekler, katı faz ekstraksiyon (SPE) işlemi uygulanarak, Anabilim Dalımız Adli Toksikoloji Laboratuvarında bulunan Gaz kromatografi Kütle Spektrometresi ile toksikolojik analizleri yapıldı.

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

3.1.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Araç ve Gereçler

- § Gaz Kromatografi/Kütle Spektrometre Cihazı (GC/MS).....Agilent (6890 Network GC System/ 5973 Network Mass Selective Detector)
- § Kapiler Kolon.....DB-17 (0.25mm x 30m x 0.25 µm)
- § Derin Dondurucu.....Uğur
- § Elektrikli Hassas Terazî.....Mettler Toledo
- § Santrifüj CihazıHettich Universal 30 F
- § SPE Kartuş.....Oasis- MCX, HLB
- § Şırınga.....SGE
- § Homojenizatör.....Bandelin Sonopuls, hp 2200
- § Vial, vial kapağı.....Agilent
- § Vortex.....Elektro-mag M16
- § pH Metre.....Mettler Toledo MP 220
- § Azot tüpü
- § Helyum tüpü
- § Otomatik Pipet ve Pipet Uçları

§ Cam ve Plastik Deney Tüpleri

3.1.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

- § Metanol (CH₃OH).....Merck
§ Potasyum bifosfat (KH₂PO₄).....Sigma
§ Aseton (CH₃COCH₃).....Merck
§ Amonyum hidroksit(NH₄OH).....Fluka
§ Hidroklorik asit (HCl).....Merck
§ Sodyum Florür (NaF).....Merck
§ Parasetamol..... Sigma
§ Procaine..... Sigma
§ Parol (parasetamol miktarı: 500mg/tablet)..... Atabay
§ Azot Gazı
§ Helyum Gazı
§ Distile Su

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Deney Hayvanlarına Parasetamol Uygulanması, Biyolojik Örneklerin

Alınması ve Saklanması

Çalışmamızda, deney hayvanı olarak kullanılan ratlar için parasetamol oral LD₅₀ değeri literatürden 2404 mg/kg olarak belirlendi. Bu değer göz önünde bulundurularak 250-300 gr ağırlığındaki ratlara akut zehirlenme için verilmesi gereken parasetamolün dozu hesaplandı.

Akut zehirlenmenin gerçekleşmesi için, Wistar Albino cinsi 250-300 gr ratların bir defada midelerine alabilecekleri sıvı miktarı en fazla 5 ml olduğundan, müstahzar ismi Panadol olan ve 500 mg/tablet parasetamol içeren ilacın iki tableti 5 ml deiyonize suda çözülerek gavaj yöntemi ile ratlara verildi. Gavaj yöntemi için standart şırınga uçlarından daha geniş ve uzun olan bir şırınga ratlara zarar vermeyecek şekilde ucu düzeltilerek hazırlandı. Kullanılan şırınga ile 5 ml parasetamol çözeltisi ratların midelerine ulaştırılarak akut zehirlenme sağlandı.

Parasetamol uygulamasından yaklaşık 4 saat sonra dekapitasyon yöntemi ile öldürülen ratlardan hızlıca kardiyak kan alınarak kullanılan sodyum florürlü (antikoagülan) tüplere konuldu. Daha sonra sırasıyla karaciğer, böbrek ve beyin alınarak

düz cam tüplere konuldu. Kan örnekleri santrifüjlenerek serumları ayrıldı. Parasetamol serum stabilitesini değerlendirmek üzere serum örneklerinin başlangıç değerleri için 1'er ml'si bekletilmeden ekstraksiyonları yapıldı. Kalan serum örnekleri 1. , 2. , 3. , 10. , 14. , 21. ve 30. gün değerleri ölçülmek üzere her gün ve saklama koşulu için 3'er adet örnek düz cam tüplere konularak bir grup +4°C'de buzdolabında diğer bir grup ise -20°C'de derin dondurucuda etiketlenerek saklandı. Parasetamol stabilitesinin değerlendirilmesi için kullanılacak olan karaciğer örnekleri, ilk gün değerleri için bekletilmeden analiz edildi. Her ölçüm günü için 3 adet karaciğer örneği, hassas terazide 1'er gram tartıldı. Düz cam tüplerde hazırlanan örnekler, 1. , 3. , 10. , 14. , 21. ve 30. gün değerleri ölçülmek üzere 20°C'de derin dondurucuda etiketlenerek saklandı. Parasetamolün organ dağılımlarını değerlendirmek için kullanılan 16 adet karaciğer, böbrek ve beyin analizleri yapılmaya kadar -20°C'de derin dondurucuda saklandı.

3.2.2. Standartların ve Tampon Çözeltinin Hazırlanması

Analizlerde internal standart olarak procaine kullanıldı. Procainin internal standart olarak seçilme nedeni parasetamole olan yapı benzerliği, stabil bir yapısının olması, GC/MS cihazında verdiği pikin alıkonma zamanını ve ayrılan iyonlarının parasetamol'den farklı olmasıdır. Parasetamol ve procaine (internal standart) standartları metanol içerisinde çözülerek stok çözeltiler hazırlandı ve alıkonma zamanları belirlendi. Organların katı faz ekstraksiyonunda kullanılan tampon çözelti şu şekilde hazırlandı; 13.61 g potasyum fosfat (KH₂PO₄, MW: 136.09) 1000 ml'lik beherde tartıldı, üzerine 900 ml saf su eklenerek tuzun tamamen çözünmesi sağlandı, çözeltinin pH'ı pH metre ile ölçüldü, 1 M KOH veya 0.1 M asetik asit ile pH 4.4'e ayarlandı, daha sonra çözelti 1000 ml'lik balon jöjeye aktararak saf su ile 1L'ye tamamlandı. Tampon çözeltinin en fazla 30 gün içinde tüketilmesine dikkat edildi.

3.2.3. Gaz Kromatografi Kütle Spektrometresi (GC/MS) Çalışma Şartları

Taşıyıcı gaz (Helyum): akış hızı: 1 ml/dak.

Kolon sıcaklığı: 80°C 1 dakika bekleme süresi

10 °C/dak. artışla 280 °C ve 9 dakika bekleme süresi.

Dedektör sıcaklığı: 230 °C

Enjeksiyon sıcaklığı: 250 °C

Enjeksiyon modu: Pulsed Splitless

Enjeksiyon hacmi: 0.2 µl

Kütle aralığı: 40-550 m/z

Elektron enerjisi: 70 eV

Tarama modu: Scan

3.2.3.1. Standart Kalibrasyon Eğrisinin Çizilmesi

Hazırlanan referans 200 mg/ml'lik stok çözeltiden metanol ile tamamlanarak (150, 100, 50, 30,1, 0.5 mg/ml)'lik 6 adet parasetamol standardı için alan ile mg/ml cinsinden konsantrasyon arasındaki doğrusal ilişki grafik olarak çizildi (Şekil 4.2.). Procaine (internal standart) konsantrasyonu 40 mg/ml olarak sabit tutuldu.

3.2.3.2. Geri Kazanım(Recovery) Çalışmaları

Parasetamol verilmeden elde edilen rat serum örnekleri, parasetamol stok referans çözeltileri ve procain (internal standart) kullanılarak yapılan geri kazanım çalışmaları 6 farklı konsantrasyonda 5 defa tekrarlanarak yapılmıştır. Yapılan bu çalışma sonucunda aynı örneğin 5 defa uygulanmasından elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Parasetamol verilmeden elde edilen rat karaciğer, böbrek ve beyin örnekleri, parasetamol stok referans çözeltileri ve procain (internal standart) kullanılarak yapılan geri kazanım çalışmaları 6 farklı konsantrasyonda 5 defa tekrarlanarak yapılmıştır.

3.2.3.3. Kantitatif Alt Limit (LQD) ve Minimum Dedeksiyon (LOD) Limiti

Çalışması

Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan parasetamol standartları, cihaza enjekte edilerek elde edilen pik altında kalan alanlardan S/N oranı 10 olan değer kantitatif alt limiti (LOD) olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan parasetamol standartları, cihaza enjekte edilerek elde edilen pik altında kalan alanlardan S/N oranı 3 olan değer minimum dedeksiyon limiti (LOD) olarak belirlenmiştir.

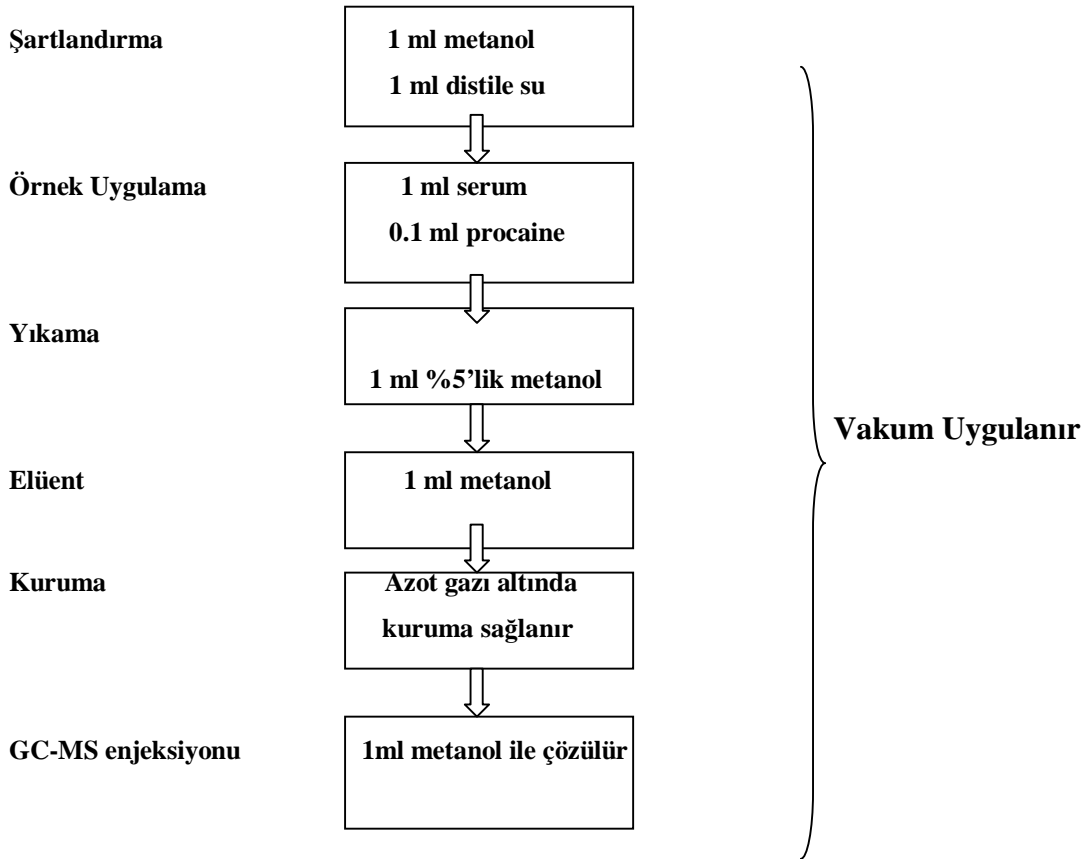
3.2.4. Serum Örneklerinden Parasetamolün SPE (katı faz) Yöntemi ile

Ekstraksiyonu

Katı faz ekstraksiyonu için örneklerin hazırlanmasında, Oasis HLB ve MCX kartuşlar için Waters firması tarafından belirlenen yöntemlerin yer aldığı uygulama kitabındaki yöntemler modifiye edilerek kullanılmıştır.

Oasis HLB katı-sıvı ekstraksiyon kartuşundan sırasıyla 1 ml metanol ve 1 ml su geçirilerek şartlandı. 1 ml serum içerisine 0.1 ml internal standart (procaine) eklenerek kolondan sabit ve yavaş hızda geçirildi. 1 ml %5'lik metanol çözeltisi ile kolon yıkama işlemi yapıldı. 1 ml metanol ile elüent alınarak azot gazı altında kuruluğa kadar uçuruldu.

Oasis HLB katı-sıvı ekstraksiyon kartuşu

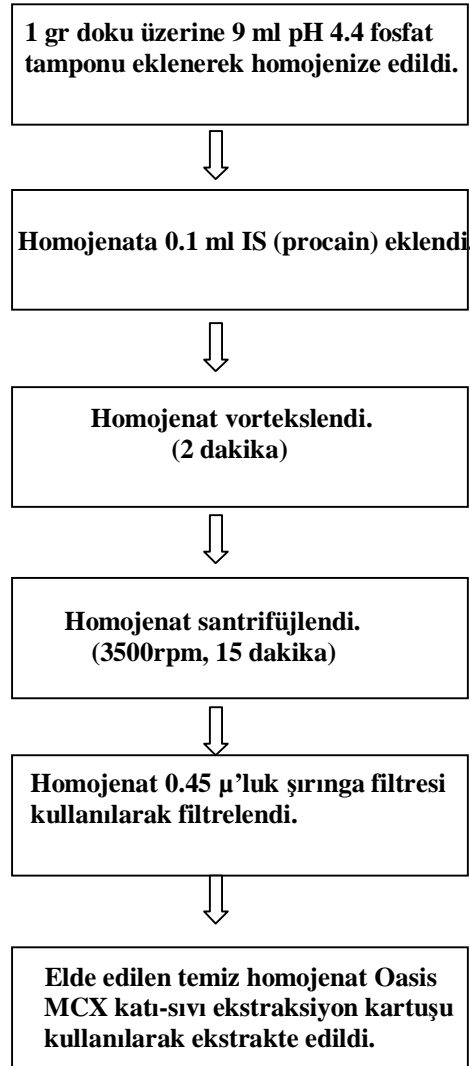


Şekil.3.1. Serum Örneklerinden Parasetamolün SPE (katı faz) Yöntemi ile Ekstraksiyonun Akış Şeması

3.2.5. Karaciğer, Böbrek ve Beyin Dokularından Parasetamolün SPE (katı faz) Yöntemi ile Ekstraksiyonu

3.2.5.1. Dokuların Katı Faz (SPE) Ekstraksiyonuna Hazırlanması

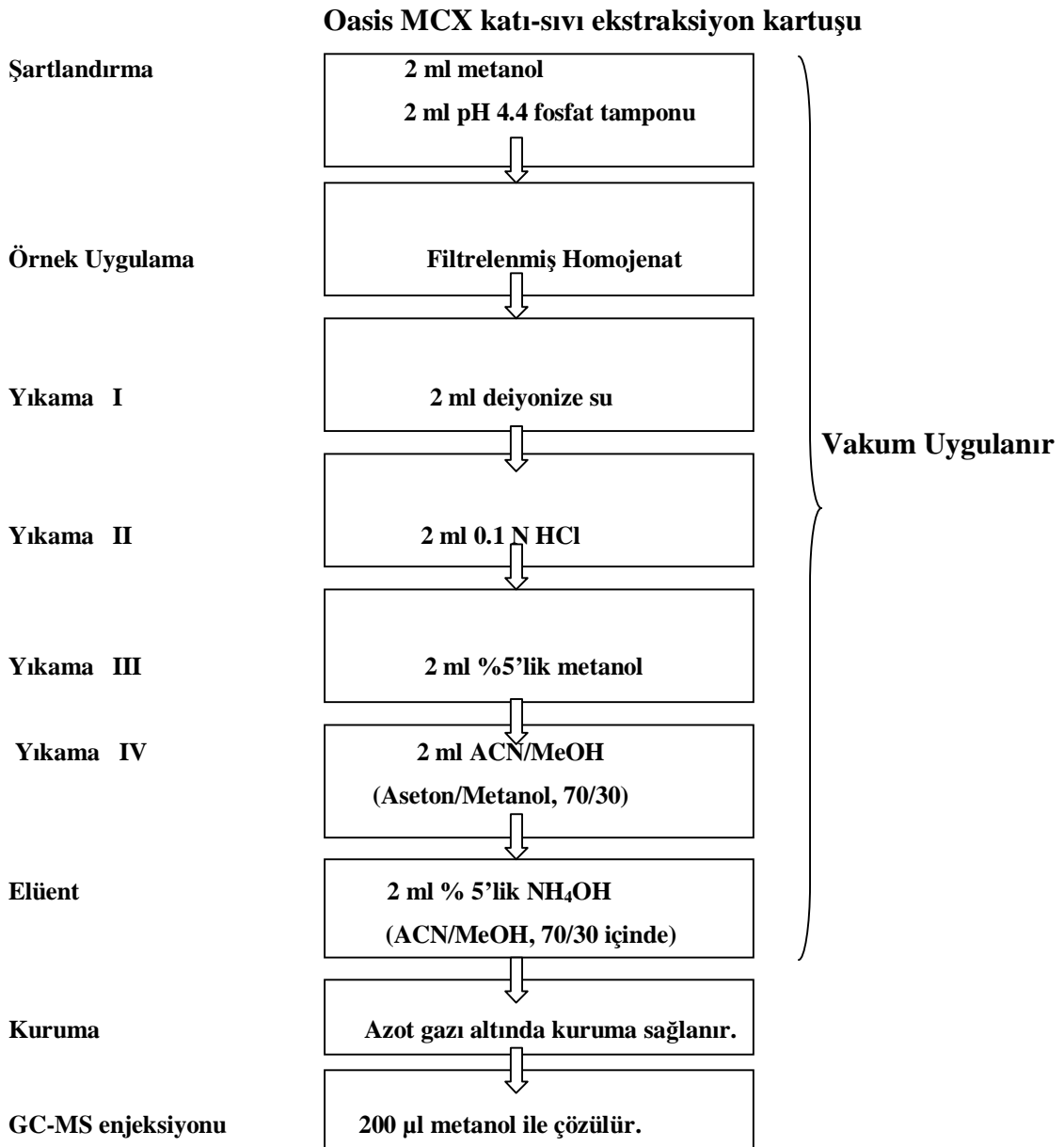
Akut parasetamol zehirlenmesi sonrasında ratlardan karaciğer, böbrek ve beyin örnekleri alındı. Yaklaşık 1 gr doku üzerine 9 ml pH 4.4 fosfat tamponu eklenerek sonikatör yardımı ile homojenize edildi. Homojenat üzerine 0.1 ml (procain) eklenerek 2 dakika vorteks ve 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj uygulandı. Homojenat 0.45 μ 'luk şırınga filtresi ile filtrelendi. Elde edilen temiz homojenat Oasis MCX katı-sıvı ekstraksiyon kartuşu kullanılarak ekstrakte edildi.



Şekil.3.2. Dokuların Katı Faz (SPE) Ekstraksiyonuna Hazırlanması

3.2.5.2. Dokuların Katı Faz Ekstraksiyonu

Oasis MCX katı-sıvı ekstraksiyon kartuşundan sırasıyla 2 ml metanol ve 2 ml pH 4.4 fosfat tamponu geçirilerek şartlandı. Filtrelenmiş homojenat içerisine 0.1 ml internal standart (procaine) eklenerek kolondan sabit ve yavaş hızda geçirildi. 2 ml su ile kolon yıkama I yapıldı. 2 ml 0.1 N HCl çözeltisi ile kolon yıkama II işlemi yapıldı. 2 ml %5'lik metanol ile yıkama III işlemi yapıldı. 2 ml aseton/metanol (70/30) çözeltisi ile yıkama VI işlemi yapıldı. 2 ml %5'lik amonyum hidroksit (aseton/metanol (70/30) çözeltisi içinde) ile elüent alınarak azot gazı altında kuruluğa kadar uçuruldu. Üzerine 200 µl metanol eklenerek cihaza enjekte edildi.



Şekil.3.3. Dokuların Katı Faz Ekstraksiyonu Akış Şeması

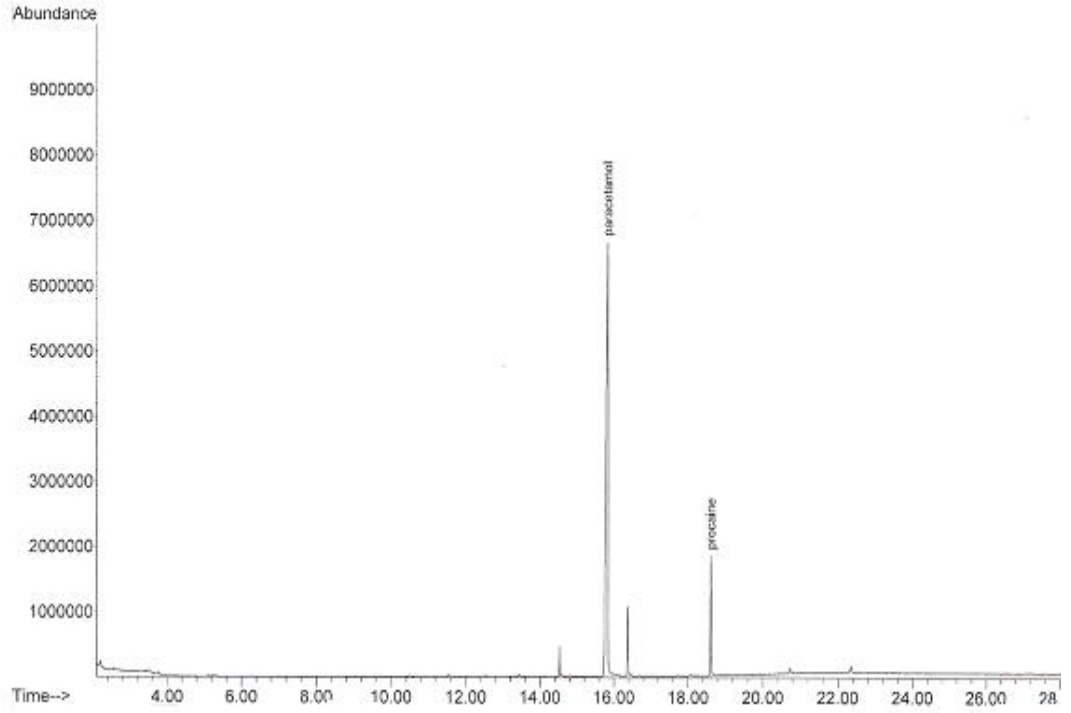
3.3. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 16.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sürekli ölçümlerse ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum - maksimum) olarak özetlendi. Yapılan toksikolojik analizlerde elde edilen sonuçların ikiden fazla duruma göre (farklı günlere ait değerlerin karşılaştırılması v.b.) istatistiksel değerlendirilmesi için Kruskal-Wallis, iki duruma göre (saklama koşullarının karşılaştırılması, organlarda parasetamol dağılımının ikili karşılaştırması, günlere göre değişen parasetamol konsantrasyonlarının ikili karşılaştırması v.b.) karşılaştırılmaları için ise Mann-Whitney testi uygulanmıştır. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Parasetamolün Serum ve Dokularda Tayini

Parasetamol ve Procain (IS) standartlarının GC/MS cihazı kullanılarak elde edilen kromatogramı Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



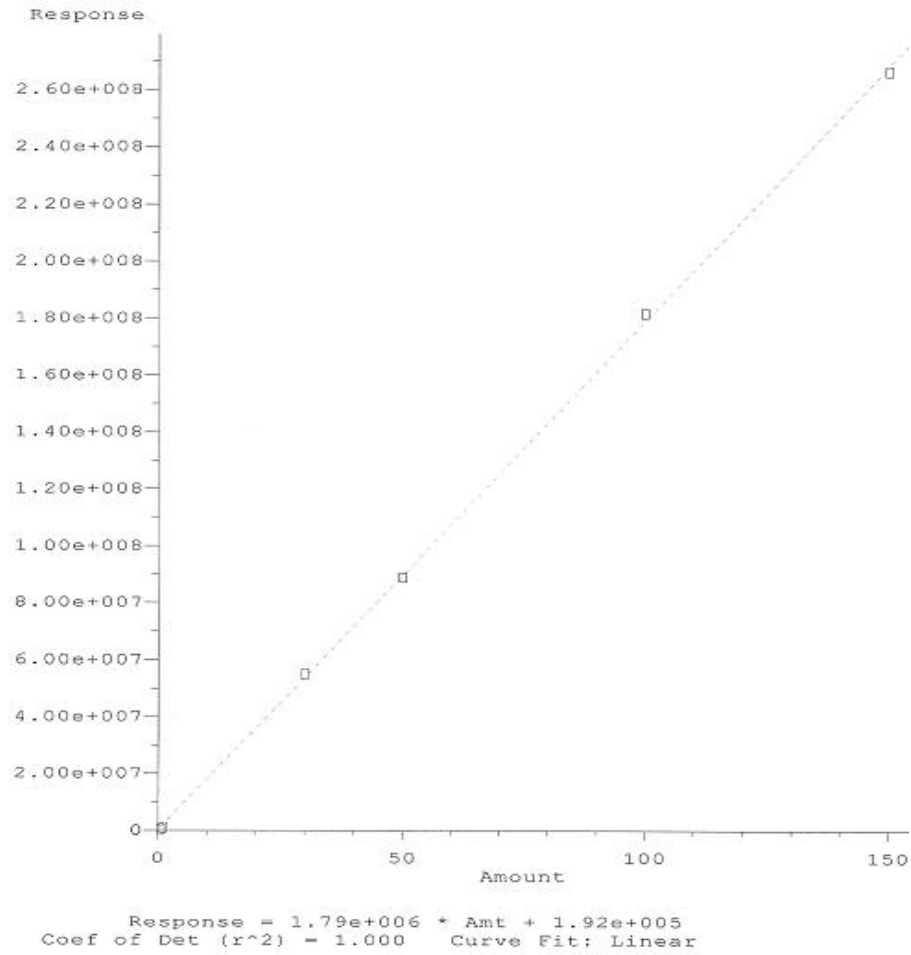
Şekil.4.1. Parasetamol ve Procain Standartlarının GC/MS Kromatogramı

Belirtilen kromatografik koşullarda analizi yapılan Parasetamolün alıkonma zamanı, korelasyon katsayısı(r^2) ve minimum dedeksiyon limiti Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Parasetamol'ün Alıkonma Zamanı, Korelasyon Katsayısı (r^2) ve Dedeksiyon Limiti.

	Alıkonma Zamanı(dakika)	Korelasyon Katsayısı (r^2)	Minimum Dedeksiyon Limiti (LOD,mg/ml)
Parasetamol	15.81	1	0.4

Gaz Kromatografi Kütle Spektrometride analizi yapılan parasetamolün 3.2.1'deki belirtilen koşullar uygulanarak çizilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.2'de gösterilmiştir.

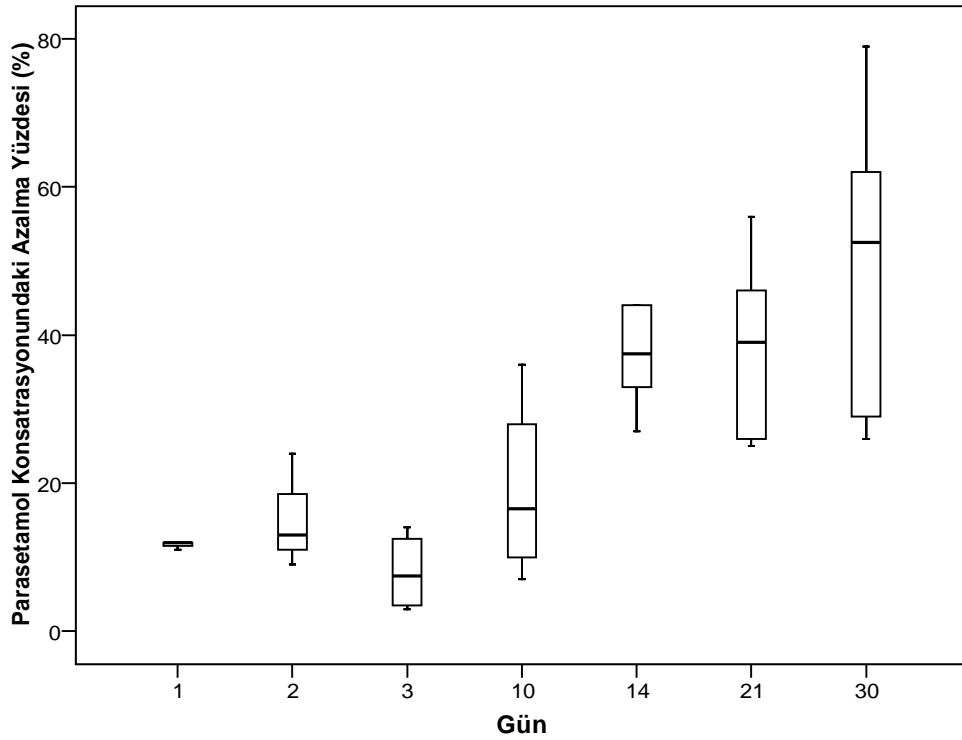


Şekil.4.2. Parasetamolün GC/MS'de Belirlenen Kalibrasyon Eğrisi

4.1.1. Serum Örneklerinin Analiz Sonuçları

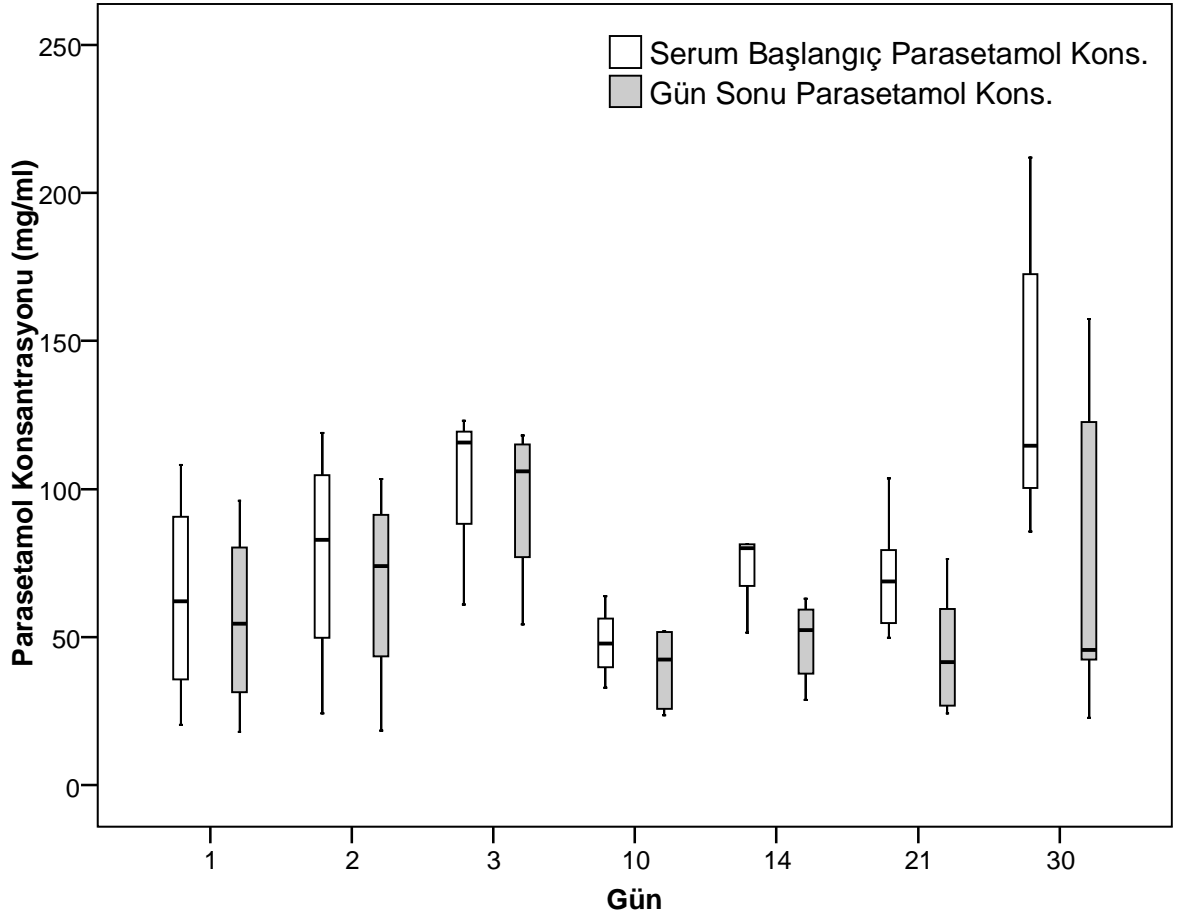
Çizelge.4.2. Serum Parasetamol Konsantrasyonlarının Saklama Koşulları ve Günlere Göre Değerlendirilmesi

Ölçümler	-20°C (Ort ± S.S)			+4°C (Ort ± S.S)		
	Başlangıç Konsantrasyonu (mg/ml)	Gün Sonu Konsantrasyonu (mg/ml)	Yüzde Değişim (%)	Başlangıç Konsantrasyonu (mg/ml)	Gün Sonu Konsantrasyonu (mg/ml)	Yüzde Değişim (%)
1.gün	79.62±40.19	70.52±36.14	11.64±0.78	46.74±37.29	41.18±32.79	11.82±0.19
2.gün	82.93±10.92	73.94±7.61	10.68±2.59	71.62±66.87	60.88±60.13	18.77±8.10
3.gün	119.19±5.38	115.13±4.11	3.39±0.92	88.42±38.81	77.08±32.16	12.37±2.09
10.gün	53.08±12.28	45.98±10.24	13.18±5.97	43.17±12.01	33.32±14.94	24.81±13.16
14.gün	84.13±18.43	51.69±12.88	38.81±5.36	70.55±16.45	46.12±15.58	35.79±8.51
21.gün	80.45±20.74	53.20±20.13	34.96±8.49	61.30±15.80	36.87±19.57	42.23±15.65
30.gün	156.73±64.58	108.58±57.15	33.78±11.27	109.89±10.96	37.00±12.38	66.30±11.06



Şekil.4.3. Serum Parasetamol Konsantrasyonundaki Yüzde Değişim Boxplot Grafiği

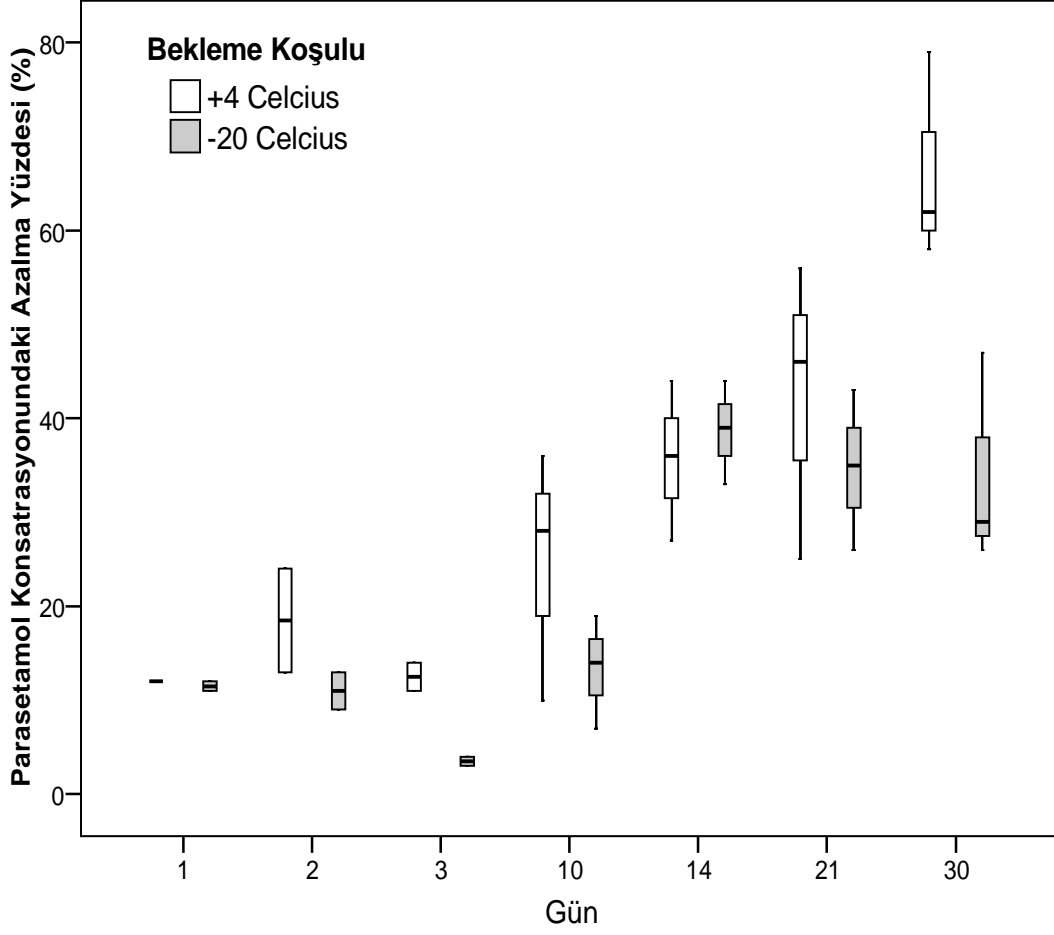
4.1.1.1. Günlere Göre Değerlendirilen Serum Parasetamol Konsantrasyonu Sonuçlar



Şekil.4.4. Serum Parasetamol Konsantrasyonunun Günlere Göre Değişim Boxplot Grafiği

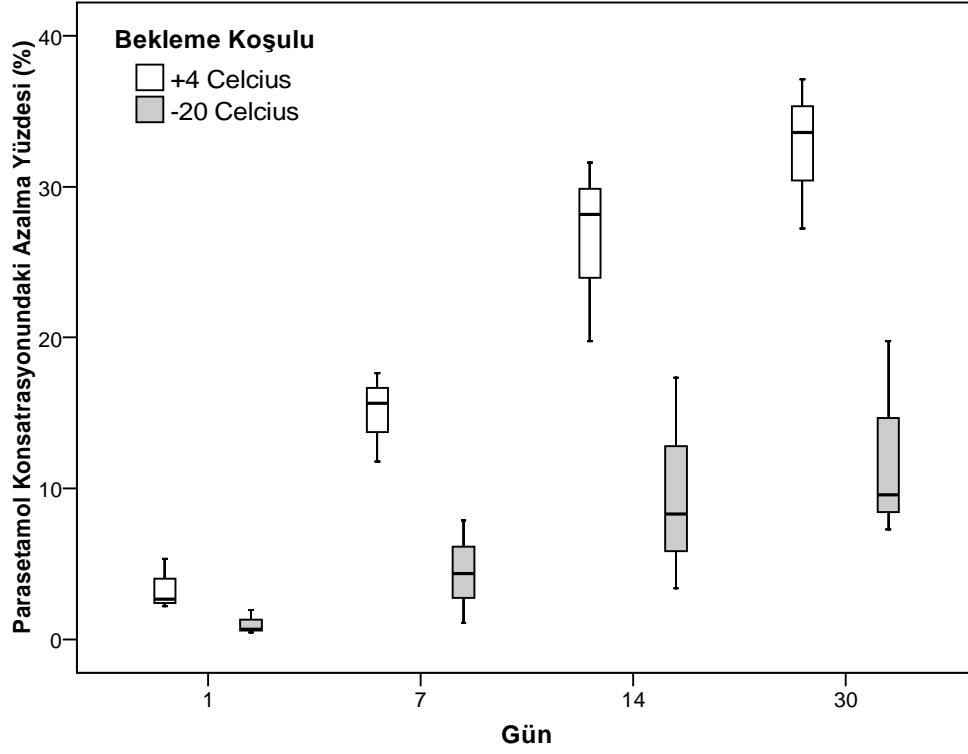
4.1.1.2. Saklama Koşullarına Göre Değerlendirilen Serum Parasetamol

Konsantrasyonu Sonuçları



Şekil.4.5. Serum Parasetamol Konsantrasyonunun Günlere ve Saklama Koşullarına Göre Değişim Boxplot Grafiği

4.1.2. Kontrol Grubu Sonuçları



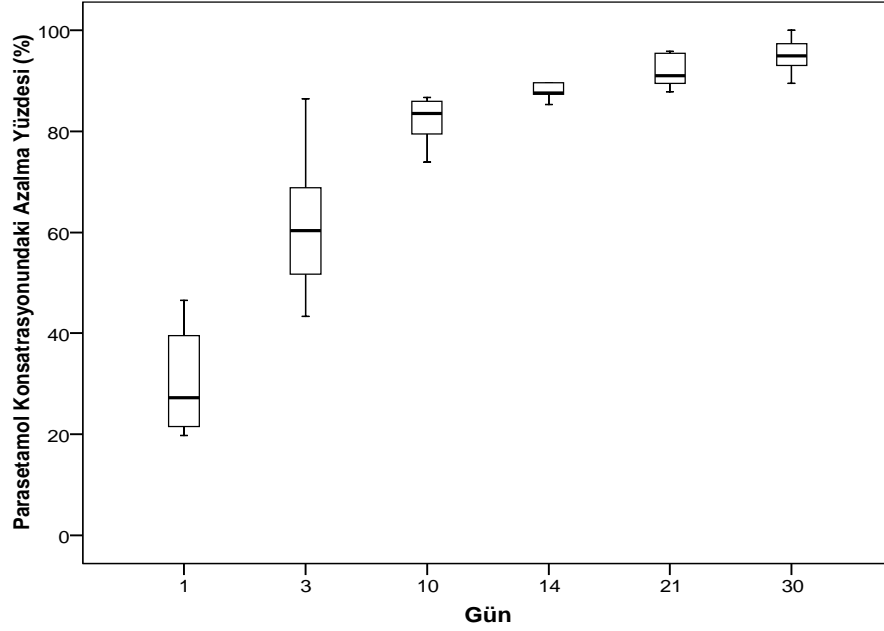
Şekil.4.6. Kontrol Grubu Parasetamol Değişiminin Günlere ve Saklama Koşullarına Göre Boxplot Grafiği

4.1.3. Karaciğer Örneklerinin Analiz Sonuçları

Çizelge.4.3. Karaciğer Parasetamol Konsantrasyonlarının Günlere Göre Değerlendirilmesi

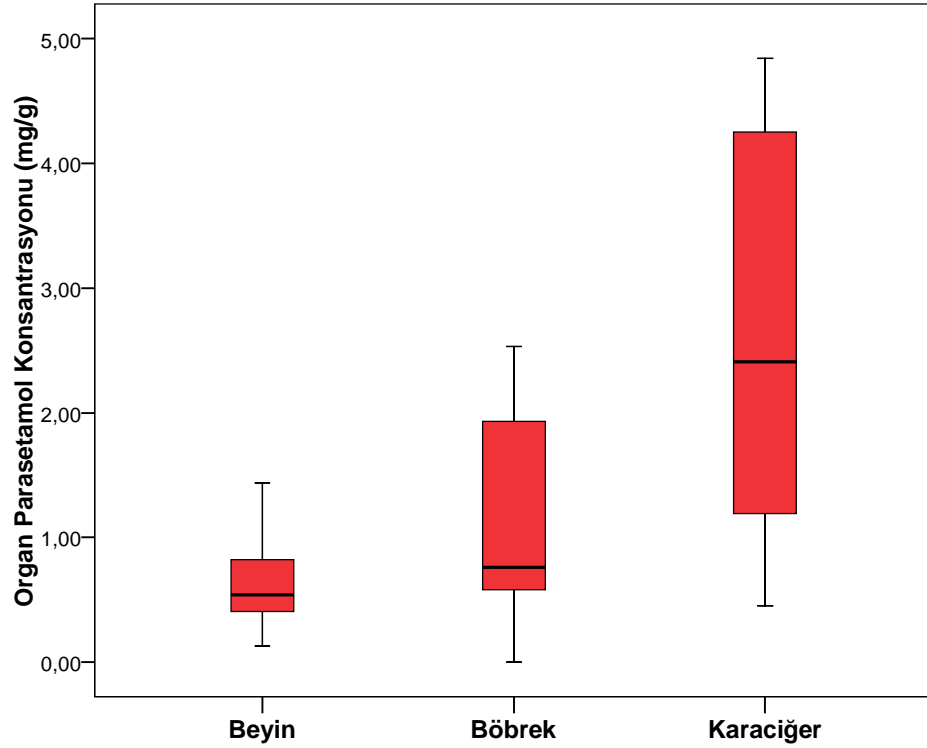
Ölçümler	-20°C (Ort ± SS)		
	Başlangıç Konsantrasyonu (mg/g)	Gün Sonu Konsantrasyonu (mg/g)	Yüzde Değişim (%)
1.gün	2,9±0.9	1.93±0.26	30.26±10.51
3.gün	2,9±0.9	1.04±0.46	61.81±14.97
10.gün	2,9±0.9	0.49±0.08	82.15±4.79
14.gün	2,9±0.9	0.30±0.16	89.55±5.29
21.gün	2,9±0.9	0.24±0.12	91.75±3.27
30.gün	2,9±0.9	0.16±0.12	94.97±3.69

4.1.3.1. Günlere Göre Değerlendirilen Karaciğer Parasetamol Konsantrasyonu Sonuçları



Şekil.4.7. Karaciğer Parasetamol Konsantrasyonunun Günlere Göre Değişim Boxplot Grafiği.

4.1.4. Karaciğer, Beyin ve Böbrek Örneklerinde Parasetamol Dağılımı

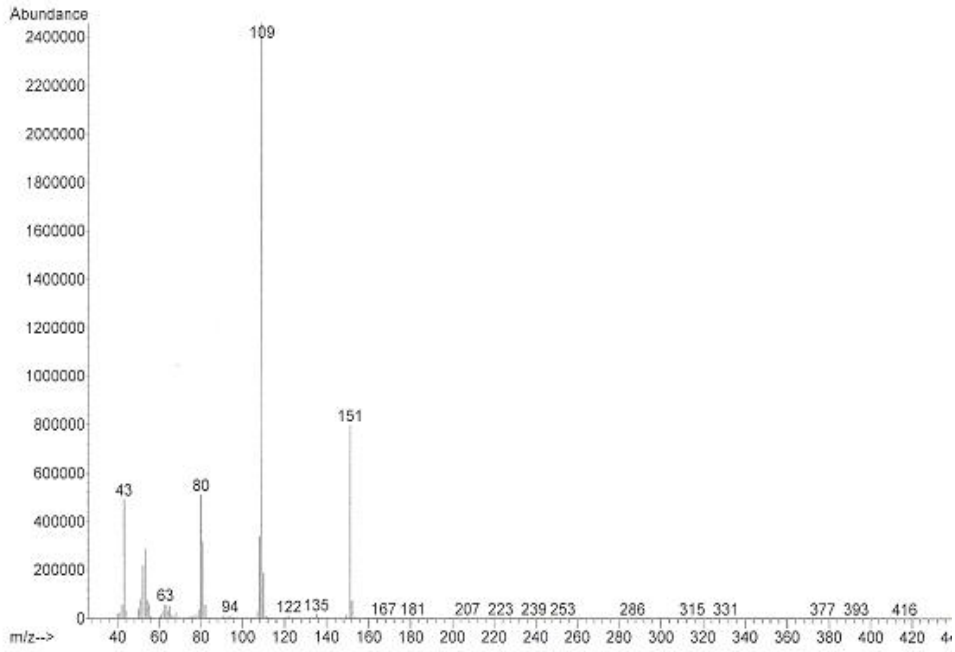


Şekil.4.8. Organlarda Parasetamol Dağılımının Boxplot Grafiği ile Gösterilmesi.

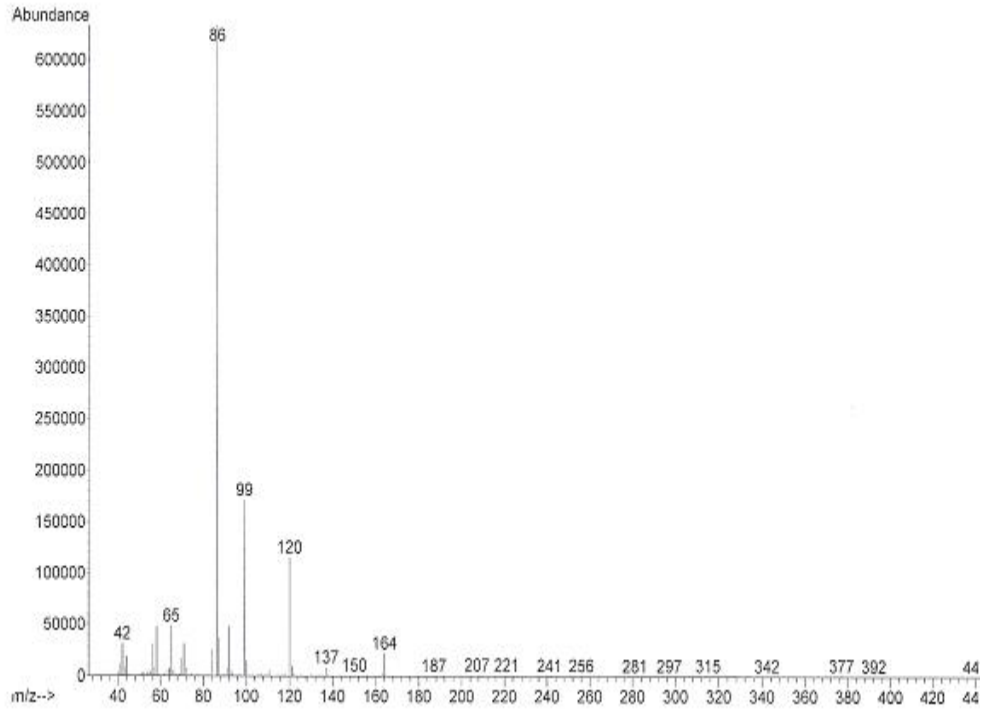
Çizelge.4.4. Akut Parasetamol Zehirlenmesinde Organlarda Parasetamol Dağılımı

Biyolojik Örnek	Parasetamol Düzeyleri		
	$X \pm S.S.^a$	Medyan	Min-Max
Karaciğer(mg/g)	2.68±1.58	2.41	0.45-4.84
Beyin (mg/g)	0.68±0.43	0.54	0.13-1.62
Böbrek (mg/g)	1.11±0.80	0.76	0.0-2.53

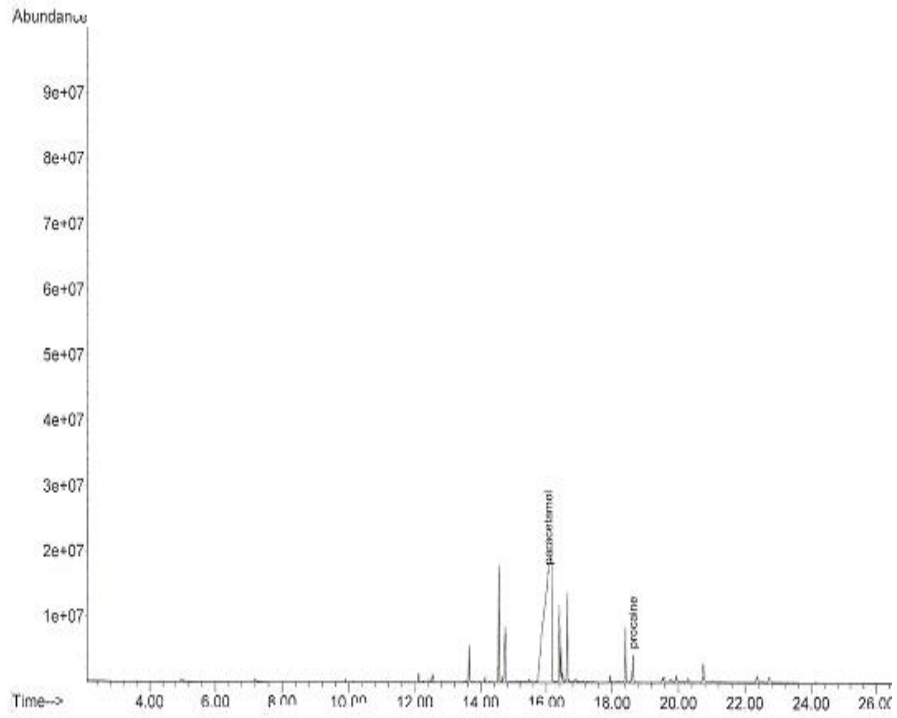
a: Aritmetik ortalama± standart sapma



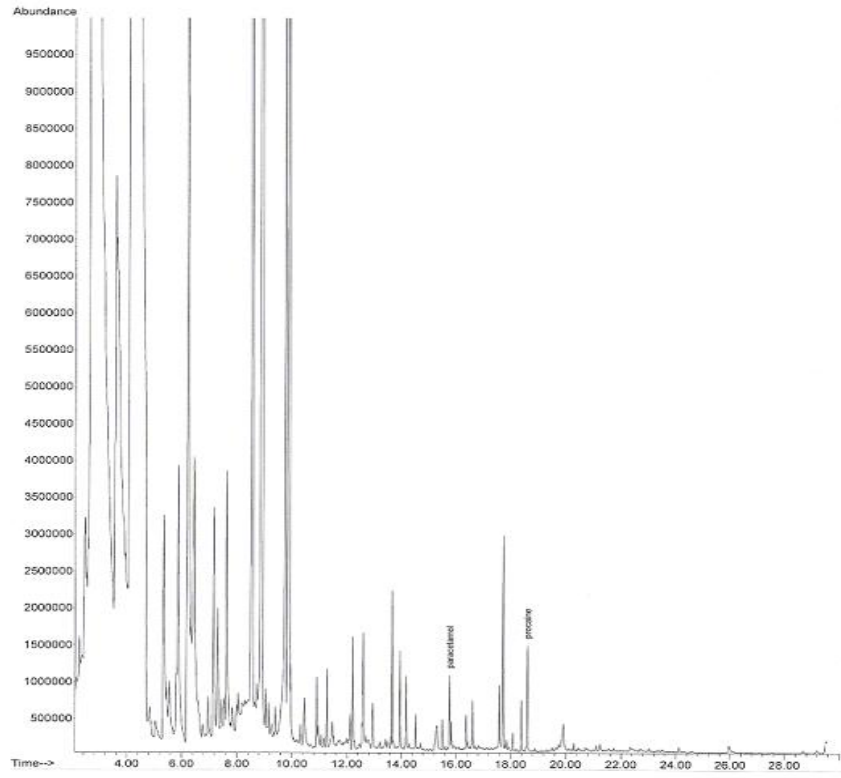
Şekil.4.9. Parasetamol Kütle Spektrometri İyon Penceresi



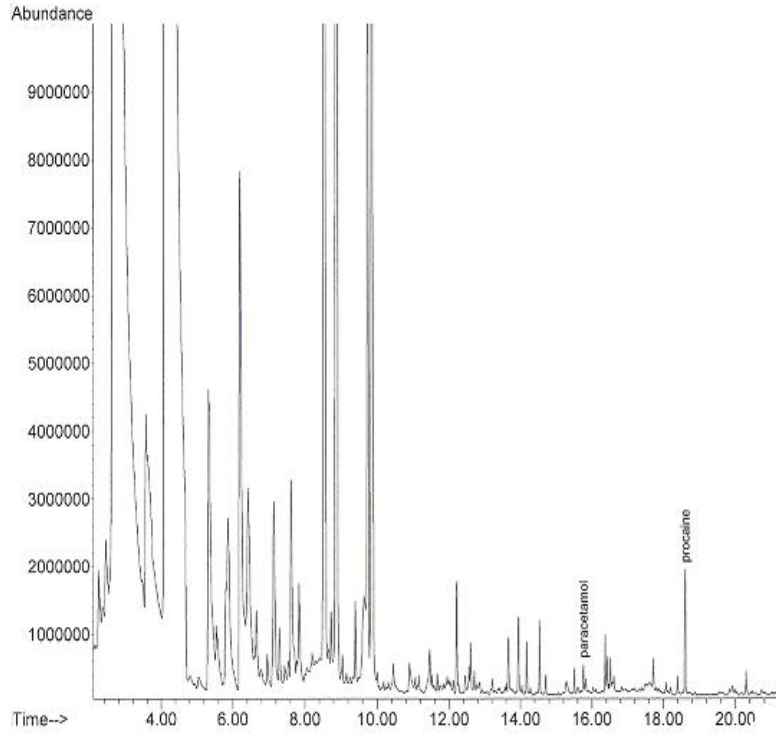
Şekil.4.10.Procaine Hidroklorikası Kütle Spektrometri İyon Penceresi



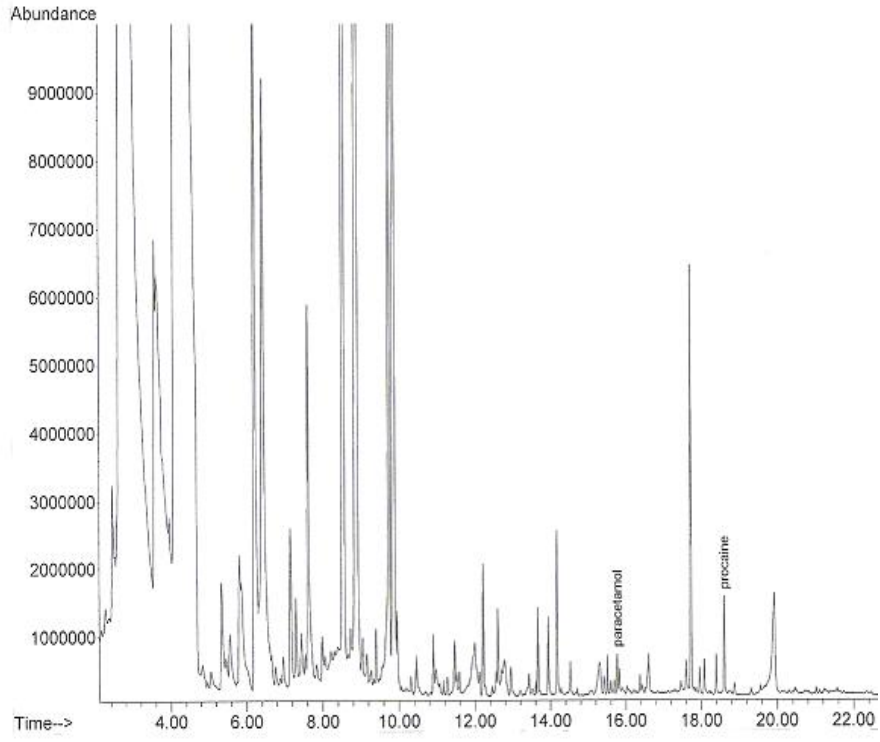
Şekil.4.11.Serum Parasetamol Kromatogramı



Şekil.4.12.Karaciğer Örneği Parasetamol Kromatogramı



Şekil.4.13.Beyin Örneği Parasetamol Kromatogramı



Şekil.4.14.Böbrek Örneği Parasetamol Kromatogramı

5. TARTIŞMA

İlaç zehirlenmeleri, artan kullanım alanları ve çeşitleri ile zehirlenme nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Her ilaç belirli koşullarda ölüme sebep olabilir. Parasetamol, analjezik etkili ilaçlar arasında yaygın kullanımı ve reçetesiz kolaylıkla elde edilebilmesi nedeni ile kaza ve intihar amaçlı ölümlere sıklıkla neden olur.

Parasetamol toksisitesinin hedef organları karaciğer ve böbrektir⁽⁹⁵⁾. Adli toksikolojik analizlerde parasetamol, kan örnekleri ile birlikte karaciğer ve böbrekte de belirlenebilmektedir.

Toksik dozda parasetamol alımında parasetamol serum düzeyi, toksisitenin derecesini takip etmek açısından önemlidir. Bu nedenle parasetamol serum düzeyinin duyarlı, hızlı ve spesifik ölçüm yöntemleri ile belirlenmesi gerekmektedir.

Hawton ve ark.'nın 80 olguda yaptığı çalışmada, intihar olgularında sıklıkla parasetamolün neden tercih edildiği konusunda şu sonuçlar elde edilmiştir: Olgulardan %50'si bu ilaca ulaşımın kolay olduğu, %29'u tehlikeli olduğunu, %4'ü ise ucuz olduğunu belirtmişlerdir⁽²⁴⁾.

Frank Peters tarafından yapılan çalışmada klinik ve adli amaçlı alınan biyolojik örneklerdeki maddelerin stabilitelerinin genellikle, oksidasyon veya redüksiyon, esterleşme gibi nedenlerle bozulduğunu ve bu örneklerde bozulmayı en aza indirmek için buzdolabında veya -20°C'de saklanmaları gerektiği belirtilmektedir. Yine aynı çalışmada, sonuçların yorumlanmasında yapılacak yanlışlardan kaçınmak için uzun süre saklanarak analizi yapılacak örneklerde, uygun koşullarda saklansa bile, bir miktar bozulmanın göz önünde bulundurulması gerekliliği bildirilmektedir⁽⁹⁶⁾.

Adli olgularda ölüme neden olan akut zehirlenmelerin, uygun biyolojik örneklerde gösterilmesi ve postmortem toksikolojik analizi yapılan bu örneklerin yasa ile belirlenen süre saklanması zorunludur. Bu saklama süresi boyunca örnek içindeki madde miktarı çeşitli nedenlerden dolayı (saklama koşulları, koruyucu konulmaması v.b) değişebilir. Bu amaçla literatürde çeşitli maddelerin (etanol, ilaçlar, pestisitler, uyutucu, uyuşturucu maddeler vb.) biyolojik örneklerde, değişik saklama koşullarında stabilitesini belirlemek üzere yapılmış bir çok çalışma yer almaktadır.

Son yıllarda geliştirilen duyarlı yöntemler, düşük miktarlarda analitlerin tayinlerine imkan vermektedir. Literatürde Parasetamol (asetaminofen) miktar tayini

için çeşitli matrisler içinde birçok çalışma mevcuttur. Miktar tayini amacıyla kullanılan yöntemler arasında spektrofotometrik yöntemler, farklı dedektör sistemlerinin kullanıldığı kromatografik yöntemler, elektrokimyasal yöntemler vb. sayılabilir⁽⁸⁻¹²⁾.

Çalışmamızda, 250-300 mg ağırlığında Wistar Albino cinsi ratlar kullanılmıştır. Akut parasetamol zehirlenmesi sonucu ölen ratlarda postmortem serum ve karaciğer örnekleri değişik saklama koşullarında (serum örnekleri, +4°C ve -20°C'de, karaciğer örnekleri -20°C'de) saklanmış ve bu örneklerde parasetamol stabilitesi katı faz ekstraksiyon yöntemi ile GC-MS cihazı kullanılarak kantitatif olarak ölçülmüştür.

SPE metodu, toksikolojik analizlerde örnek hazırlamada en fazla tercih edilen ekstraksiyon yöntemidir. Bunun sebebi, literatürde, SPE yöntemi ile daha az çözücü ve ayıraç madde kullanıldığından daha ekonomik bir örnek hazırlanması, geri kazanım (recovery) oranı yüksekliği ve istenilen yoğunlukta örnekler elde edilebilmesidir. Ayrıca tutucu madde ve çözücüler arasında çapraz bulaşma riski düşük olduğundan yüksek doğrulukta sonuçlar alınabilmekte, düşük miktarda örnek işlendiğinden sıvı-sıvı ekstraksiyondaki gibi emülsiyon oluşma problemi olmamaktadır, SPE metodunda en az düzeyde uçurma işlemi ihtiyaç duyulduğundan kararsız örnek oluşumu da nadirdir. Çözücü ve örneklerin az miktarlarda kullanılmasından dolayı zehirli maddelerle temas daha azdır ve daha az cam malzeme kullanılması nedeniyle analizi yapanlar için oldukça güvenli bir metot olarak bildirilmektedir. Ayrıca bu yöntemle çevreyi kirletme riski daha düşüktür, çok sayıda örneğin aynı anda ve tekrarlanabilir şekilde işlenebilmesine olanak sağlayacak şekilde çok kolay otomasyon sağlanabilmektedir. Yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı çalışmamızda SPE yöntemi kullanılmıştır.

Çalışmamızda, serum parasetamol konsantrasyonu ölçümleri, +4°C ve -20°C'de, saklama koşullarına göre değerlendirildiğinde ilk 10 gün içindeki değişimin günler arasında benzer olduğu görülmüştür. Ancak +4°C'de 14. günden sonra gün ilerledikçe parasetamol miktarındaki azalmanın arttığı ve bunun da sınırda anlamlı ($p=0.061$) olduğu ama aynı dönemde -20°C'de değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ($p=0.733$). Ayrıca ilk 10. gün ölçümleri ile 14. gün sonrası ölçümleri arasında iki saklama koşulunda da istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görülmüştür (her ikisi için de $p<0.001$). Saklama koşullarının, parasetamol konsantrasyonuna etkisine yüzde değişim olarak bakıldığında, -20°C'deki örneklerin yüzde değişiminin +4°C'ye göre daha düşük olduğu gözlenmektedir. 30. gün değerleri

için saklama koşullarına göre yüzde değişimi -20°C 'de %33.78, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de %66.30 olarak belirlenmiştir.

Serum örnekleri için değişik saklama koşullarında, aynı sürede ortalama olarak farklı değerler gözlene de istatistik olarak benzer derecede düşüş gösterdikleri görülmüştür (her ikisi için de $p=0.113$). Günlere göre saklama koşulları arasında sadece 30. gün ölçümünde farklılık saptanmıştır ($p=0.05$). Diğer günlerde saklama koşullarında değişiklik parasetamol değerine etki etmemektedir. Saklanan serum örneklerinde, parasetamol stabiliteelerini değerlendirirken elde ettiğimiz sonuçları desteklemek için pH değeri, serum pH değerine göre ayarlanmış ($\text{pH}=7.4$) deiyonize su örnekleri kullanıldı. Serum örnekleri ile paralel olarak, aynı saklama koşullarında ($+4^{\circ}\text{C}$ ve -20°C) saklandı ve analizleri yapıldı. Kontrol örnekleri için, iki saklama ortamında da günler ilerledikçe parasetamol miktarında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlemlendi ($p \leq 0.001$). Günlere ve iki saklama ortamına göre yapılan istatistiksel değerlendirmede de anlamlı farklılık belirlendi. Örneklerin kaç gün saklanacağı dikkate alınmadan yapılan değerlendirmede ise -20°C 'de parasetamol miktarında daha az değişim gözlemlendi ($p=0.008$). Sonuç olarak kontrol örnekleri, serum örnekleri ile paralellik göstermiştir.

Speed ve ark.'nın çalışmalarında, yöntemin validasyonu için yapılan, günlere göre validasyon (interday validation) değerlendirmesinde parasetamol konsantrasyonunun, koruyucu ve antikoagülan içeren kan örneklerinde sekiz günlük bir süre içinde, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de anlamlı bir değişim göstermediği bildirilmektedir⁽⁷⁹⁾. Çalışmamızın serum örnekleri ile ilgili sonuçları, birebir aynı amaçlı çalışma olmamasına rağmen Speed ve ark.'nın çalışması ile uyum göstermektedir.

Çalışmamızda, günlerdeki ilerleme ile birlikte karaciğerde saptanan parasetamol miktarındaki düşüşün de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir ($p < 0.001$). 1. gün ile 3. gün, 3. gün ile 10. gün ve 10. gün 14. gün ve sonrasındaki günler arasında düşüş miktarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır (sırasıyla $p = 0.004$, $p = 0.041$, $p = 0.009$). Günler arasındaki düşüş miktarı, 14. güne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen, 14. gün ile 30. gün değerleri arasındaki düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı da gözlemlenmiştir. Yüzde değişim olarak değerlendirildiğinde, 1. gün karaciğer örneğinde parasetamol konsantrasyonu değişimi % 30.26, 30. gün karaciğer örneğinde parasetamol konsantrasyonu değişimi %94.97'dir.

Hilberg ve ark.'nın ratlar üzerinde yaptığı postmortem çalışmada, antemortem ve postmortem serum parasetamol konsantrasyonlarının oranı yaklaşık 1 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada postmortem parasetamol konsantrasyonu karaciğer, böbrek ve akciğerde düşük miktarda belirlenmiştir. Çalışmada bunun nedeni olarak parasetamolün düşük dağılım hacmi ve noniyonize yapısına bağlı olarak mideden kısmen absorblanması belirtilmektedir. Çalışmamızda kullanılan serum ve organ örnekleri akut parasetamol zehirlenmesinden sonra değerlendirildiğinde parasetamolün Hilberg ve ark.'nın çalışmasında olduğu gibi en düşük beyinde olduğu gözlenmiştir. Buna göre 16 rat örneğinde ölçülen parasetamol konsantrasyonu ortalama olarak karaciğerde 2.68 mg/g, böbrekte 1.11 mg/g ve beyinde 0.68 mg/g olarak bulunmuştur⁽⁹⁷⁾.

Akut zehirlenmelerde, zehirlenmeye neden olan maddenin konsantrasyonu çok arttığından organlarda biyotransformasyondan sorumlu enzimler inhibe olur. Buna bağlı olarak zehirlenmeye neden olan toksik maddenin büyük bir kısmı metabolitlerine ayrılmadan organlarda kalır. Bu sebeple serum ve karaciğer örneklerine uygulanan stabilite çalışması ile birlikte, çalışmamızda karaciğer, beyin ve böbrekte değişmeden kalan parasetamol miktarlarının dağılımı da kantitatif olarak belirlenmiştir. Yapılan bu değerlendirmede, karaciğer, böbrek ve beyin parasetamol konsantrasyonu ölçümleri arasında fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.003$, $p=0.018$) bulunmuştur. Parasetamol konsantrasyonu en yüksek karaciğerde, en düşük ise beyinde belirlenmiştir. Bunun yanı sıra böbrek ile beyin değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanamamıştır ($p=0.165$).

Detoksifikasyon sürecinde en önemli organ karaciğerdir. Bir çok çalışmada, parasetamol zehirlenmelerinde tedavi edilmeyen hastaların %10'unda karaciğer hasarı meydana geldiği ve bunların %10-%20'sinin hepatik yetersizlikten öldüğü bildirilmektedir. Çalışmamızda, parasetamolün organ dağılımı literatürde yer alan çalışmalarla uyumlu olarak en yüksek karaciğerde belirlenmiştir⁽¹⁵⁾.

Böbrek de parasetamol zehirlenmelerinde hedef organlardan birisidir. Mahadevan ve ark. tarafından 51 olguda yapılan çalışmada olguların % 13.5'inde ($n=7$) hepatotoksisiteyle birlikte nefrotoksisite de gözlenmiştir⁽⁶⁵⁾. Blakely ve ark.'nın Amerikan Renal Hastalıklar Merkezi tarafından yayınlanan çalışmasında toplam akut renal hasarların %2'sinin parasetamol zehirlenmelerinden oluştuğu bildirilmektedir. Aynı çalışmada glutasyon eksikliğinde veya sitokrom P450 mikrozomal enzimlerini

indükleyen bir ilaçla birlikte terapötik dozda dahi olsa parasetamolün böbreklerde hasara neden olacağı belirtilmiştir⁽⁷¹⁾. Çalışmamızda organ dağılımlarına bakıldığında böbreğin karaciğerden sonra en yüksek parasetamol konsantrasyonuna sahip organ olduğu gözlenmiştir. Bu veriler böbreğe olan toksik etkisini açıklar niteliktedir.

Hendrickson ve ark.'nın rat beyni ile yaptığı çalışmada, parasetamolün merkezi sinir sistemi üzerinde, burada bulunan glutasyonu tüketerek etki ettiği bildirilmektedir. Bu yayın, ön çalışma olarak kabul edilmesine rağmen akut parasetamol zehirlenmelerinde merkezi sinir sisteminin ne şekilde etkilendiği belirsizdir. Benzer şekilde aşırı dozda alınan parasetamolün metabolik asidosizi artırdığı ve buna bağlı olarak depresyona neden olduğuna dair ön çalışmalar yapılmıştır⁽⁹⁸⁾. Çalışmamızda akut parasetamol zehirlenmesinde organ dağılım sonuçlarına baktığımızda en düşük parasetamol miktarı beyinde gözlenmiştir.

Schütz ve ark.'nın yaptığı çalışmada, toksikolojik analizlerde yapılan hataların en önemli kaynakları; ön analitik çalışmalarda yapılan hatalar, analitik çalışmalarda yapılan hatalar, farmakokinetik hatalar, farmakodinamik hatalar ve analiz sonuçlarının bunlara bağlı olarak yanlış yorumlanması olarak bildirilmektedir⁽⁹⁹⁾. Aynı çalışmada parasetamol ile oluşan zehirlenmelerin toksikolojik analizlerinde, en önemli hata kaynağı olarak farmakodinamik hatalar bildirilmektedir. Postmortem ilaç zehirlenmelerinin değerlendirilmesinde farmakodinamik hatalardan kaçınmanın bir yolu değişik örneklerde analiz yapılmasıdır. Çalışmamızda, parasetamol zehirlenmelerinde karaciğer ve serum örneklerinin değerlendirilmesi yapılmıştır.

Parasetamolün metabolizmasını moleküler modelleme yöntemi ile açıklamak üzere Fazlul Huq tarafından yapılan bir çalışmada, moleküler modelleme ile parasetamolün toksik metaboliti olan NAPQI'nin yüksek toksisitesinin, bu metabolitin yüksek kinetik enerji seviyesine, sudaki düşük çözünürlüğüne ve düşük termodinamik stabilitesine bağlı olduğu gösterilmiştir⁽¹⁰⁰⁾.

Analizden önce biyolojik örneğin bozulması, plazma proteinlerine bağlı ilaçların koruyucu etki eksikliğine bağlı olarak, kimyasal ve fiziksel bozulması ile oluşur. Örnek saklama sırasında koruyucu konulmaması ve/veya örnekleme sırasındaki bakteriyel kontaminasyona bağlı olarak devam eden enzimatik aktiviteler biyolojik örneklerde maddelerin stabiliteğini koruyamamasına neden olur.

Saklanan biyolojik örneklerde ilaçların stabilitesi adli tıp çalışmalarında tekrar değerlendirmek gerekliliğine bağlı olarak önemlidir. Bu örneklerde ilaçların stabilitesi, saklama sıcaklığına, saklama süresine, koruyucu konulmasına ve başlangıçtaki örnek toplama koşullarına bağlıdır.

Holmgren ve ark.'nın yaptığı çalışmada, postmortem kanda aralarında parasetamolün de yer aldığı benzodiazepinler, antidepresanlar, analjezikler ve hipnotiklerden oluşan 46 ilacın -20°C'de koruyucu kullanılarak, bir yıllık stabilitesi değerlendirilmiştir. Bu çalışmaya göre femoral ven kanındaki parasetamol konsantrasyonunda, -20°C'de koruyucu kullanılarak, 1 yıllık yapılan çalışmada, istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Bununla beraber 7 ilacın (etanol, ketobemidon, desmetilmianserin, 7-amino-nitrazepam, THC, thioridazie, zolpidem) ilk ölçümü ile ikinci ölçümleri arasında anlamlı bir fark gözlenmiştir⁽¹⁰¹⁾.

Yapılan stabilize çalışmalarında iki analitik sonuç arasında bulunan farklılık tek başına ilacın örnekteki stabilitesi ile değil kullanılan analitik yöntemin güvenilirliği ve doğruluğu ile de ilgili olabilir.

Drummer ve ark.'nın yaptığı çalışmada postmortem toksikolojik analizlerde biyoanalitik prosedürlerin standardize edilmesi gerektiği ve bunun da analize uygun biyolojik örnek seçimi ile başlanması gerektiği belirtilmektedir⁽¹⁴⁾. Çalışmamızda biyolojik örnek olarak parasetamol zehirlenmelerinde en önemli biyolojik örnek olan serumla birlikte karaciğer, böbrek ve beyin kullanılmıştır. Bu örneklerin analizi için kullanılan yöntem validasyonu için geri kazanım, tekrarlanabilirlik, minimum dedeksiyon limiti, kantitatif alt limit, doğrusallık çalışmaları yapılmıştır.

Adithan ve Thangam'ın parasetamolün ağız içi sıvısı ve serum konsantrasyonlarını kromatografik yöntemle karşılaştırmak üzere yaptığı çalışmada ağız içi sıvısı ve serum örnekleri arasında önemli bir korelasyon olduğu belirtilmiştir⁽¹⁰²⁾. Aynı çalışmada ağız içi sıvısı ve serum parasetamol konsantrasyonu oranlarının örnekleme zamanına bağlı olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda örnekleme zamanı olarak, ratlara parasetamol gavaj yöntemi ile uygulanıp, akut zehirlenme oluşturularak, parasetamolün yarılanma süresi olan 4 saat titizlikle takip edilerek çalışılmıştır.

Fischer ve ark.'nın fareler üzerinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi cihazı kullanarak yaptıkları çalışmada toksik dozda parasetamolün ve konjuge metabolitinin organlarda, plazmada ve idrarda tayinleri yapılmıştır. Çalışmada gözlenen

parasetamolün yarılanma süresi 4 ile 12 saat arasında değişmektedir. Bu çalışmaya göre toksik dozda parasetamol verilen farelerde, parasetamol glukoronid konjugatı (metabolit) konsantrasyonu sırasıyla en yüksek plazmada, karaciğerde ve böbrekte bulunmuştur. Beyinde, değişmeden bulunan parasetamol miktarı diğer organlarla benzer bulunmasına rağmen parasetamol glukoronid konjugatı eser miktarda belirlenmiştir. Bu durum yazarlar tarafından kan beyin bariyerinin etkisi ve/veya beyinin parasetamolu konjugatına çevirememesi olarak değerlendirilmiştir. Böbrekte de diğer parasetamol konjugatları (glukoronid, sistein, merkaptürik, sülfat, glutatyon) düşük miktarda bulunmuştur⁽¹⁰³⁾. Çalışmamızda, bu çalışmaya paralel olarak parasetamol konsantrasyonu en düşük beyinde ve en yüksek de karaciğerde bulunmuştur.

İlaçların biyolojik örneklerde stabilitesinin bilinmesi klinik ve adli amaçlı çalışmalarda önemlidir. Çalışmamızda literatürde yer alan bilgiler ışığında parasetamolün 30 günlük stabilitesi ve organlarda dağılımı gözlenerek, bu konuda veri tabanı oluşturulmaya çalışılmıştır. Parasetamolün, koruyucu kullanılarak (sodyum florür) örneklemeden sonraki 30. güne kadar serumda stabilitesinin anlamlı olarak değişmediği, -20°C'de saklanan postmortem karaciğer örneklerinin parasetamol konsantrasyonu değerlendirilmesi için uygun örnek olmadığı sonuçları elde edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmamızda akut parasetamol zehirlenmesi sonucu ölen olgularda, postmortem serum ve karaciğer örneklerinin değişik saklama koşullarında (+4°C ve -20°C'de, GC/MS cihazı kullanılarak) 30 günlük parasetamol stabilitesi araştırılması ve parasetamolün postmortem serum, böbrek, beyin ve karaciğer dokularında dağılımının gösterilmesi amacıyla, Çukurova Üniversitesi Tıbbi ve Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından sağlanan 42 deney hayvanı ile çalışılmıştır.
2. Alınan kan ve karaciğer örnekleri değişik saklama koşullarında (+4°C ve -20°C'de) saklanarak, belirlenen günlerde analizleri yapıldı.
3. Beyin ve böbrek örnekleri de bu organlardaki parasetamol dağılımını araştırmak için çalışıldı.
4. Adli Toksikoloji Laboratuvarımızda SPE metodu ile ekstraksiyonu yapılan örnekler, gaz kromatografi-kütle spektrometresi cihazı kullanılarak analiz edildi.
5. Yapılan çalışmada, serum parasetamol konsantrasyonu ölçümleri, +4°C ve -20°C'de, saklama koşullarına göre değerlendirildiğinde ilk 10 gün için değişimin günler arasında benzer olduğu gözlenmiştir.
6. +4°C'de 14. günden sonra gün ilerledikçe, parasetamol miktarındaki azalmanın arttığı ve bunun da sınırdan anlamlı ($p=0.061$) olduğu ama aynı dönemde -20°C'de değişimin istatistiksel olarak önemli olmadığı gözlenmiştir ($p=0.733$).
7. İlk 10. gün ölçümleri ile 14. gün sonrası ölçümleri arasında iki saklama koşulunda da istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görülmüştür (her ikisi için de $p<0.001$).
8. Saklama koşullarının, serum parasetamol konsantrasyonuna etkisine yüzde değişim olarak bakıldığında, -20°C'deki örneklerin yüzde değişiminin +4°C'ye göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. 30. gün değerleri için saklama koşullarına göre yüzde değişimi -20°C'de %33.78, +4°C'de %66.30 olarak belirlenmiştir.
9. Karaciğerde saptanan parasetamol miktarındaki düşüşün de istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir ($p<0.001$). Bu durum yüzde değişim olarak değerlendirildiğinde, 1. gün karaciğer örneğinde parasetamol

konsantrasyonu değişimi % 30.26, 30. gün karaciğer örneğinde parasetamol konsantrasyonu değişimi %94.97 olarak belirlenmiştir.

10. Karaciğer, böbrek ve beyin parasetamol konsantrasyonu ölçümleri arasında fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0.003$, $p=0.018$) bulunmuştur. Parasetamol konsantrasyonu en yüksek karaciğerde, en düşük ise beyinde belirlenmiştir.
11. Yapılan çalışmada kullanılan yöntemin toksikoloji laboratuvarlarında parasetamol miktarını belirlemek için uygun olduğu gözlenmiştir.
12. Adli olgularda ölüme neden olan akut zehirlenmelerin uygun biyolojik örneklere analiz edilmesi ve postmortem toksikolojik analizi yapılan bu örneklere yasa ile belirlenen süre saklanması zorunluluğu vardır. Buna bağlı olarak vcoda çeşitli yollarla toksik veya letal dozda alınan parasetamolün, 30 günden fazla saklanan serum örneklere sağlıklı yorum yapılacak kadar stabil olmadığı gözlenmiştir. 30 günden fazla saklanan örneklere tekrar değerlendirilmesinde bu durum göz önünde bulundurulmalıdır.
13. Adli toksikolojik analiz amaçlı -20°C 'de saklanan karaciğer örneklere de, parasetamol miktarının tekrar belirlenmesi için uygun biyolojik örnek olmadığı gözlenmiştir.
14. Adli amaçlı alınan biyolojik örneklere 180 gün saklanması zorunluluğu vardır. Buna göre, ksenobiyotiklerin stabilitesini belirlemek amaı ile yapılacak daha uzun vadeli benzer çalışmalar yapılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. **Hara K, Kashimura S, Yanai T, Kashiwagi M, Miyoshi A, Kageura M.** Rapid Analysis of Acetaminophen in Serum by Gas Chromatography-Mass Spectrometry with Extractive Derivatization Using a Diatomaceous Earth Tube. *Forensic Toxicol*, **2006**, 24:65-69.
2. **Korduba CA, Petruzzi RF.** High-Performance Liquid Chromatographic Method for The Determination of Trace Amounts of Acetaminophen in Plasma. *J Pharm Sci.* **1984**;73(1):117-9.
3. **Cengiz G.** Parasetamolün Toksikolojik Analizi, Plazma ve Doku Lipid Peroksidasyonuna Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, Ankara, **1997**.
4. **Edinboro L, Jackson GF, Jortani SA, Poklis A.** Determination of serum Acetaminophen in Emergency Toxicology: Evaluation of Newer Methods: Abbott TDx and Second Derivative Ultraviolet Spectrophotometry. *J Toxicol Clin Toxicol.*, **1991**; 29(2):241-255.
5. **Chen X, Huang J, Kong Z, Dafang Z.** Sensitive Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry Method For The Simultaneous Determination of Paracetamol and Guaifenesin in Human Plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, **2005**; 817:263-269.
6. **Türkçapar H, Tütüncü R.** Suicide Attempt by Ingestion High Doses of Risperidone, Citalopram and Paracetamol. *Bull Clin Psychopharmacol.* , **2004**;14:14-17.
7. T.C. Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu Ankara Grup Başkanlığı.
Erişim: http://www.adlitipankara.gov.tr/mevzuat_yonetmelikler.php?yonetmelik=y4. Erişim tarihi: 22.01.2009
8. **Bhargava VO, Emodi S, Hirate J.** Quantitation of Acetaminophen and Its Metabolites in Rat Plasma After a Toxic Dose. *J Chromatogr.*, **1988**; 426:212-215.
9. **Yin OQP, Lam SSL, Chow MSS.** Simultaneous Determination of Paracetamol and Dextropropoxyphene in Human Plasma by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry: Application to Clinical Bioequivalence Studies. *Rapid Commun.Mass Spectrom.* **2005**; 19: 767-774.
10. **Fletcher CG, Grove TH, Hohnadel DC.** Liquid-Chromatographic Determination of Acetaminophen in Serum. *Clinical Chemistry*, **1979**; 25/3:409-412.
11. **Heitmeier S, Blaschke G.** Direct Determination Of Paracetamol and Its Metabolites in Urine and Serum by Capillary electrophoresis with Ultraviolet and Mass Spectrometric Detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.*, **1999**; 721:93-108.
12. **Courade JP, Besse D, Delchambre C, Hanoun N, Hamon M, Eschaliere A, Caussade F, Cloarec A.** Acetaminophen Distribution in The Rat Central Nervous System. *Life Sciences*, **2001**; 69:1455-1464.
13. **Vural N.** *Toksikoloji Laboratuvar Kitabı.* Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, **2000**.
14. **Drummer OH.** Requirements for Bioanalytical Procedures in Postmortem Toxicology. *Anal Bioanal Chem.*, **2007**; 388: 1495-1503.
15. **Kayaalp O.** *Tıbbi Farmakoloji.* Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti. , 11. Baskı, Ankara, 2005: 849-850.
16. **Sirtori C, Kuhlmann J, Tillement JP, Vrhovac B.** *Clinical Pharmacology.* Italy: Companies; **2000**. 383, 862-871.

17. **Şan N.** Bazı İlaç ve Pestisitlerin Enzimatik Yıkılma ile Postmortem Analizleri. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü, Ankara, **1994**.
18. Biyotransformasyon. Erişim: (<http://pharm.ege.edu.tr/pp/metinertosun/biyotransformasyon.pdf>). Erişim tarihi: 22.04.2009.
19. **Markey SP.** Drug Metabolism. Laboratory of Neurotoxicology NIMH, NIH, 2006. Erişim: (http://www.cc.nih.gov/researchers/training/principles/ppt/drug_metabolism_2006-2007.ppt). Erişim tarihi: 22.10.2008.
20. **Vural N.** *Toksikoloji*. Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, **1996**; 73: 73-80.
21. Federal Aviation Administration. Erişim: (<http://jag.cami.jccbi.gov/toxicology/DrugDetail.asp?did=2>). Erişim tarihi: 17.01.2009.
22. Acetaminophen. Erişim: (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=1983&loc=ec_rcs). Erişim tarihi: 29.04.2009.
23. Acetaminophen. Erişim: (<http://chemicalland21.com/lifescience/phar/ACETAMINOPHEN.htm>). Erişim tarihi: 24.12.2008.
24. **Hawton K, Ware C, Mistry H, Hewitt J, Kingsbury S, Roberts D, Weitzel H.** Why patients choose paracetamol for self poisoning and their knowledge of its dangers. *BMJ.(Electronic Journal)*, 1995; 310: 164. Erişim: (<http://www.bmj.com/cgi/content/full/310/6973/164>).
25. Paracetamol (Acetaminophen). Erişim:(<http://www.worldofmolecules.com/drugs/tylenol.htm>). Erişim tarihi: 01.05.2009.
26. Paracetamol. Erişim: (<http://encyclopedia.stateuniversity.com/pages/16710/paracetamol.html>). Erişim tarihi: 11.04.2009.
27. **Bosch ME, Sanchez AJR, Rojas FS, Ojeda CB.** Determination of Paracetamol:Historical Evolution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2006**; 42:291-321.
28. **Hendrickson R, Bizovi KE.** Chapter 34: Acetaminophen. **LR Goldfrank, N Flomenbaum, Howland MA, Hoffman RS, Lewin NA, Nelson LS.** Goldfrank's Toxicology Emergencies. 8th. Ed., New York: McGraw-Hill Professional Publishing, **2006**: 523-543.
29. Paracetamol. Erişim: (http://www.who.int/ipcs/poisons/pim_paracetamol.pdf). Erişim tarihi: 04.04.2009.
30. **Bessem JGM, Vermeulen PE.** Paracetamol (Acetaminophen)-Induced Toxicity: Molecular and Biochemical Mechanisms, Analogues and Protective Approaches. *Critical Reviews in Toxicology*. **2001**; 31: 55-138.
31. **Anantharaman V.** Paracetamol Poisoning. *Singapore Med J* , **1993**; 34: 292-294.
32. **Joseph DP.** The Molecular Toxicology of Acetaminophen. *Drug Metabolism Reviews*, **2005**; 37: 581-594.
33. **Abukhalaf KI, Deutsch DA, Bayorh M, Jones W.** Non Steroidal Antiinflammatory Drugs, Alcohol and Drug Interactions. **Mozayani A, Raymon LP,** *Handbook of Drug Interactions A Clinical and Forensic Guide*, 1st Ed. , New Jersey: Humana Press, **2004**: 358-360, 414-416.

34. **Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG.** *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Chapter 4: Principles of Toxicology and Treatment of Poisoning. 10th Ed. New York: McGraw Hill Companies; **2001**: 63, 69, 78, 434, 692, 703, 704, 1924.
35. **Filandrinos D.** Acetaminophen Poisoning.
Erişim: (<http://www.courses.ahc.umn.edu/pharmacy/6124/handouts/Acetaminophen.pdf>) 2004.
Erişim tarihi: 12.11.2008.
36. **Price VF, Miller MG, Jollow DJ.** Mechanisms of Fasting-Induced Potentiation of Acetaminofen Hepatotoxicity in the Rat. *Biochem. Pharmacol*, **1987**; 36: 427-433.
37. **Bessem JG, Te Koppele JM, Van Dijk PA, Van Stee LL, Commandeur JN, Vermeulen NP.** Rat Liver Microsomal Cytochrome P450-Dependent Oxidation of 3,5-Disubstituted Analouges of Paracetamol. *Xenobiotica.*, **1996**; 26: 647-666.
38. **Eren M, Temizel-Saltık İN, Koçak N.** İlaça Bağlı Hepatotoksisite. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, **2004**; 47: 222-227.
39. **Timbrell JA.** *Introduction to Toxicology*. 2nd Ed. Taylor and Francis, London, **1995**: 62-63.
40. **Sheen CL, Dillon JF, Bateman DN, Simpson KJ, Mcdonald TM.** Paracetamol Toxicity: Epidemiology, Prevention and Costs to the Health-care System. *Q J Med.* , **2002**; 95: 609-619.
41. Narkotik Olmayan Analjezik İlaçlar. Erişim:
(http://www.farma.hacettepe.edu.tr/akademik/meslekbilimleri/farmakimya/dersnotlari/4_NSAILI.pps).
Erişim tarihi: 17. 02. 2009.
42. **Sumioka I, Matsura T, Yamada K.** Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: Still an Important Issue. *Yonaga Acta Medica*, **2004**; 47: 17-28.
43. Acetaminophen. Erişim: (<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/02/briefing/Image1415.gif>). Erişim tarihi: 22.09.2008.
44. **Allaqaband S.** Sinai Samaritan Medical Center. Milwaukee, WI.
Erişim: (220.128.112.10/ftp/medical/Medical%20Slides/Tylenol%20Toxicity.ppt).
Erişim tarihi: 19.09.2009.
45. **Prescott LF.** Paracetamol, Alcohol and the Liver. *Br J pharmacol*. **2000**; 49 (4): 291-301.
46. **Li J, Kaneko T, Wang Y, Qin L, Wang P, Sato A.** Troglitazone Enhances the Heptotoxicity of Acetaminophen by Inducing CYP3A in Rats. *Toxicology*, **2002**; 176: 91-100.
47. **Mitchell JR.** Acetaminophen Toxicity. *The New England Journal of Medicine*. **1988**; 319: 1601-1602.
48. **Karch SB.** *The Pathology of Drug Abuse*. 2nd Ed. Florida: CRC Press LLC, **1996**.
49. **Wanless I, Goponath D, Tan J.** Histopathology of Cocaine Hepatotoxicity: Report of Four Patients. *Gastroenterology*, **1990**; 98(2): 497-501.
50. **Manahan ES.** *Toxicological Chemistry and Biochemisrty*. 3rd Ed. , Florida: CRC Press LLC, **2003**.
51. **James LP, Mayeux PR, Hinson JA.** Acetaminophen Induced Hepatotoxicity. *Drug Metabolism and Disposition*, **2003**; 31: 1499-1506.
52. **Singer PP, Jones GR, Bannach BG, Denmark L.** Acute Fatal Acetaminophen Overdose Without Liver Necrosis. *J Forensic Sci*. **2007**; 52(4): 992-994.

53. **Bromer MQ, Black M.** Acetaminophen Hepatotoxicity. *Clin Liver Dis.* **2003**; 7: 351-367.
54. **Simpson K, Hogaboam CM, Kunkel SL, Harrison DJ, Larson CB, Lukcas NW.** Stem Cell Factor Attenuates Liver Damage in a Murine Model of Acetaminophen Induced Hepatic Injury. *Laboratory Investigation*, **2003**; 83(2): 199-206.
55. **Moffat AC, Osselton MD, Widdop B.** *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons.* 3th ed. London, Chicago: Pharmaceutical Press; **2004**: 8, 17, 104, 105, 182, 183.
56. **PJ David.** The Molecular Toxicology of Acetaminophen. *Drug Metab Rev*, **2005**; 37: 581-594.
57. **Özyazgan S.** *Toksikokinetik.* İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Zehirlenmeler Sempozyum Dizisi, **2002**, 32: 9-19.
58. **Sivilotti MAL, Yarema MC, Juurlink DN, Good MA, Johnson DW.** A Risk Quantification Instrument for Acute Acetaminophen Overdose Patients Treated With N-Acetylcysteine. *Annals of Emergency Medicine*, **2005**; 46: 263-271.
59. **Anand KJS, Stevens BJ, McGrath PJ.** *Pain in Neonates.* 2nd Ed. Volume: 10, Elsevier Health Sciences. 138-140, 174-176.
60. **Swierkosz TA, Jordan L, McBride M, McGough K, Devlin J, Botting RM.** Actions of Paracetamol on Cyclooxygenases in Tissue and Cell Homogenates of Mouse and Rabbit. *Med Sci Monit*, **2002**; 8(12): 496-503.
61. **Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Gillette JR, Brodie BB.** Acetaminophen Induced Hepatic Necrosis IV. Protective Role of Glutathione. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **1973**; 187(1): 211-217.
62. **Thatcher JN, Murray S.** Analysis of the Glutathione Conjugate of Paracetamol in Human Liver Microsomal Fraction by Liquid Chromatography Mass Spectrometry. *Biomedical Chromatography*, **2001**; 15: 374-378.
63. **Dalhoff K, Laursen H, Bangert K, Poulsen HE, Anderson ME, Grunnet N, Tygstrup N.** Autoprotection in Acetaminophen Intoxication in Rats: The Role of Liver Regeneration. *Pharmacology and Toxicology*, **2001**; 88: 135-141.
64. **Song H, Chen TS.** p-Aminophenol-Induced Liver Toxicity: Tentative Evidence of a Role for Acetaminophen. *J Biochem Molecular Toxicology*, **2001**; 15: 34-40.
65. **Gomez HF, McKinney P, Phillips S, Roberts DV, Brent J, Watson WA.** Postmortem Acetaminophen Pharmacokinetics: An Experimental Study of Site and Time-Dependent Concentration Changes. *J Forensic Sci.* , **1995**; 40(6): 980-982.
66. **Dart RC.** Medical Toxicology. Acetaminophen. 3rd Ed. , 2004: Lippincott Williams & Wilkins 723-736.
Erişim:(http://books.google.com/books?id=BfdighlyGiwC&pg=PA734&lpg=PA734&dq=acetaminophen+postmortem&source=bl&ots=Krb8vQo8Yd&sig=BGDENpW9ikmGnmYmjgtiIsY_A90&hl=en&ei=VGnTSZPPJ9aIsAbLvIGhBA&sa=X&oi=book_result&resnum=2&ct=result#PPA725,M1).
Erişim tarihi: 23.02.2009.
67. **Mahadevan SBK, McKernan PJ, Davies P, Kelly DA.** Paracetamol induced hepatotoxicity. *Arch. Dis. Child.* , **2006**; 91: 598- 603.
68. **Prescott LF.** Kinetics and metabolism of Paracetamol and Phenacetin. *Br. J. Clin. Pharmac.* , **1980**; 10: 291-298.
69. Acetaminophen. Erişim:(<http://curriculum.toxicology.wikispaces.net/2.1.1.1+Acetaminophen>)

Erişim tarihi: 18.03.2009.

70. **Guengerich FP.** Cytochrome P-450 3A4: Regulation and Role in Drug Metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* , **1999**; 39: 1-17.
71. **Rose LR, Levi PE, Hodgson E.** *Reactive Metabolites, Nephrotoxicity.* Hodgson E. A Text Book of Modern Toxicology. 3rd Ed. , New Jersey: John Wiley and Sons. Inc. , **2004**: 149-161, 273-278.
72. **Ronco, PM, Flahaut A.** Drug-induced end-stage renal disease. *N. Engl. J. Med.* , **1994**; 331: 711.
73. **Blakely P, McDonald BR.** Acute Renal Failure due to Acetaminophen Ingestion: A Case Report and Review of the Literature. *J American Society of Nephrology*, **1995**; 6: 48-53.
74. **Dökmeci İ.** *Toksikoloji, Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi.* Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, **2001**.
75. Acetaminophen Overview.
Erişim: (http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/02/slides/3882S1_03_Senior.pdf), 2002.
Erişim tarihi: 24.04. 2009.
76. **Saygı Ş.** Deneysel Toksikolojide Toksikite Testleri ve Test Sonuçlarının Önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*, **2003**; 45: 291-298.
77. EvKazalarıveZehirlenmeler.
Erişim:(http://www.gata.edu.tr/dahilibilimler/cocuk/Ders_Konulari/4.SINIF/AYHAN_KILIC/EV_KAZALARI_VE_ZEHIRLENMELER.ppt). Erişim tarihi: 22.04.2009.
78. **Speed DJ, Dickson SJ, Cairns ER, Kim ND.** Analysis of Paracetamol Using Solid-Phase Extraction, Deuterated Internal Standards, and Gas Chromatography- Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol.* **2001**; 25: 198-202.
79. **Colin P, Siros G.** Rapid High-Performance Liquid Chromatographic Assay of Acetaminophen in Serum and Tissue Homogenates. *Journal of Chromatography*, **1987**; 413: 151-160.
80. **Drummer O.H.** Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis. *Journal of Chromatography B*, **1999**; 733: 27-45.
81. **Levine B.** *Principles of Forensic Toxicology.* 2nd Ed. Washington, DC: AACC Press, **2003**; 8, 85.
82. **Campbell RS, Hammond PM, Scawen MD, Price CP.** The Measurement of Serum Paracetamol Using a Discrete Analyser. *Journal of Automatic Chemistry*, **1983**; 5(3): 146-149.
83. **Esteban A, Graells M, Satorre J, Pérez-Mateo M.** Determination of Paracetamol and Its Four Major Metabolites in Mouse Plasma by Reversed-Phase ion-pair High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*, **1992**, 573: 121-126.
84. **Yavuz O, Aksoy A.** Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyonu Metodu. *F.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi*, **2006**; 20(3): 259-269.
85. **Venn RF, Merson J, Cole S, Macrae P.** 96-well solid-phase extraction: A brief history of its development. *Journal of Chromatography B*, **2005**; 817: 77-80.
86. **Snow N.H.** Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. *Journal of Chromatography A*, **2000**; 885: 445-455.
87. **Ulrich S.** Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *Journal of Chromatography A*, **2000**; 902: 167-194.

88. Soriano T, Jurado C, Menéndez M. Improved Solid-Phase Extraction Method for Systematic Toxicological Analysis in Biological Fluids. *Journal of Analytical Toxicology*, **2001**; 25: 137-143.
89. Yinon J. *Advances in Forensic Applications of Mass Spectrometry*. 1st Ed. , Florida: CRC Press, **2004**: 4-12.
90. Skopp G. Preanalytic Aspects in Postmortem Toxicology. *Forensic Science International*, **2004**; 142: 75-100.
91. Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical Method Validation and Its Implications for Forensic and Clinical Toxicology-A Review. *Accred Qual Assur.* , **2002**; 7: 441-449.
92. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation.
Erişim: (<http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/4252fml.pdf>). Erişim tarihi: 30.04.2009.
93. Validation of Analytical Methods and Procedures.
Erişim: (<http://www.labcompliance.com/tutorial/methods/default.aspx>). Erişim tarihi: 01.05.2009.
94. Ertaş SÖ, Kayalı A. Analitik Yöntem Geçerliliğine Genel Bir Bakış. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* , **2005**; 34(1): 41-57.
95. Turton J, Hoosen J. *Target Organ Pathology*. 1st Ed. , Florida: CRC Press, **1997**: 70-71.
96. Peters FT. Stability of Analytes in Biological Samples-An Important Issue in Clinical and Forensic Toxicology. *Anal Bioanal Chem*, **2007**; 388: 1505-1519.
97. Hilberg T, Ripel A, Slordal L, Bjorneboe A, Morland J. The Extend of Postmortem Drug Redistribution in a Rat Model. *J Forensic Sci.*, **1999**; 44: 956-962.
98. Hendrickson RG, Bizovi KE. **Acetaminophen**. Erişim:
http://books.google.com.tr/books?id=cvJuLqBxGUcC&pg=PA523&lpg=PA523&dq=goldfrank's+toxicology+emergencies+hendrickson&source=bl&ots=J5OKrZh9ZA&sig=DnDncBI9j2FDxchSqIbH4xsXoyU&hl=tr&ei=6DVwStPFJJoemwPUiJ2rBw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1
Erişim tarihi: 01. 07. 2009.
99. Schütz H, Erdmann F, Verhoff MA, Weiler G. Pitfalls of Toxicological Analysis. *Legal Medicine*, **2003**; 5: 6-19.
100. Huq F. Molecular Modelling Analysis of the Metabolism of Paracetamol. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, **2007**; 2: 142-150.
101. Holmgren P, Druid H, Holmgren A, Ahlner J. Stability of Drugs in Stored Postmortem Femoral Blood and Vitreous Humor. *J Forensic Sci.*, 2004; 49: 820-825.
102. Adithan C, Thangam J. A Comparative Study of Saliva and Serum Paracetamol Levels Using a Simple Spectrophotometric Method. *Br. J. Clin. Pharmacol.* , **1982**; 14: 107-109.
103. Fischer LJ, Green MD, Harman AW. Levels of Acetaminophen and Its Metabolites in Mouse Tissues After a Toxic Dose. *Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. July 21, **1981**, Vol.219, No.2.

ÖZGEÇMİŞ

Dilek Battal 1970 yılında Adana'da doğdu. İlk, orta ve Lise öğrenimini Adana'da tamamladıktan sonra, 1994 yılında Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümünden mezun oldu. 1996-1997 yılları arasında Koniteks A.Ş'de ve 1997-1999 yılları arasında Berdan Tekstil'de çalıştı.

2001 yılında Ç.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Adli Tıp Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Programına başladı. Aynı yıl Ç.Ü. Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak da çalışmaya başladı. 2004 yılında "Postmortem Kan-Vitröz Sıvı Etanol Düzeylerinin Saptanması ve Adli Tıpta Önemi" başlıklı teziyle Yüksek Lisans eğitimini tamamladı.

Eylül 2004'de Ç.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Adli Tıp Anabilim Dalı'nda Adli Tıp Doktora sınavına girerek Adli Tıp Doktora eğitimine başladı. 2007-2009 tarihleri arasında "Postmortem Rat Serum ve Dokularında Parasetamol Dağılımı ve Stabilitésinin Araştırılması" başlıklı doktora tezini hazırladı.

Halen Ç.Ü. Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı'nda görev yapmaktadır.

İki çocuk annesidir.