



**SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ  
GÜLHANE/ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SÜLFÜR MUSTARD YAKICI AJANININ BİYOBELİRTEÇLERİNİN  
ÖLÇÜM YÖNTEMİNİN  
OPTİMİZE EDİLMESİ**

**Ruşen Koray EYİSON**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof.Dr. Levent KENAR**

**TIBBİ KBRN ANABİLİM DALI  
TIBBİ KBRN DOKTORA PROGRAMI**

**DOKTORA TEZİ  
HAZİRAN 2018**

Dr.Ruşen Koray Eyison tarafından hazırlanan "Sülfür Mustard Yakıcı Ajanının Biyobelirteçlerinin Ölçüm Yönteminin Optimize Edilmesi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi KBRN Ana Bilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

**Danışman:** Prof.Dr. Levent KENAR

Tıbbi KBRN Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

**Başkan:** Prof.Dr. Levent KENAR

Tıbbi KBRN Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

**Üye:** Prof.Dr. Hakan BOYUNAĞA

Biyokimya Anabilim Dalı, Kırıkkale Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

**Üye:** Prof.Dr. Orhan ATAKOL

Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

**Üye:** Dr.Öğ.Üyesi Sermet SEZİGEN

Tıbbi KBRN Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

**Üye:** Dr.Öğ.Üyesi Mesut ORTATATLI

Tıbbi KBRN Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Tez Savunma Tarihi: 26/06/2018

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Prof.Dr. Ömer AZAL  
Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarımı kabullendiğimi beyan ederim.

  
Ruşen Koray EYİSON

26.06.2018

## ÖZET

Sülfür mustard (2,2'-diklorodietil sülfür, bis-2,2'-dikloroetil sulfür, HD), harp halinde silah olarak kullanılan ve kimyasal savaş (KS) maddeleri arasında en yaygınlarıdır. Bu maddeler solunum ve cilde temas sonucu emilimle alınır. Gözleri, solunum sistemini ve deriyi öncelikle tahriş ederek sonrasında da hücresel zararlar etkilerler. Hayatı tehdit edici ciddi ve geniş deri yanıklarına neden olmaları sebebiyle yakıcı ajanlar olarak isimlendirilirler.

Sülfür mustard (SM)'in ilk sentezi 1822 yılında Alman bilim adamı Despretz tarafından yapıldı. İlk kez, 1917 yılında, Ypres'de Alman ordusu tarafından Kanada ve İngiliz ordusuna karşı I. Dünya Savaşında kullanıldı. O zamandan beri hem terör amaçlı hem de savaşlarda (İran-İrak Savaşı-Halepçe,1988) en çok tercih edilen kimyasal savaş ajanı olmuştur. 21 Ağustos 2015 tarihli Marea-Suriye'de sivil halka karşı Sülfür mustard içeren top mermileriyle ve 8 Mart 2016 tarihinde Tazahurmatu-İrak'da sivil halka karşı Sülfür mustard içeren roketlerle saldırı düzenlenmiştir. Özellikle İran-İrak (1980-1988) savaşında yaygın bir şekilde kullanılmış ve 100,000 den fazla yaralıya neden olmuştur. Bununla birlikte uzamış etkileri nedeniyle bu yaralılardan 30,000'den fazlasının ölümüne yol açmıştır. Sülfür mustard maruziyeti sonrası hayatta kalabilen yaklaşık 70,000 den fazla İranlı halen tıbbi tedavi görmeye devam etmektedir.

Birleşmiş Milletler Genel Sekreterliği tarafından 1997 yılında yürürlüğe koyulan ve 150'den fazla ülkenin imzaladığı Kimyasal Silahlar Sözleşmesine göre bu tehlikeli maddelerin üretimi, depolanması ve geliştirilmesi yasaklanmış olmasına rağmen alınan istihbarat raporlarına göre bu kimyasal harp maddesinin günümüzde de tehdit olmaya devam ettiği ve her an kullanılma potansiyelinin bulunduğu değerlendirilmektedir. Kan ve idrar gibi biyomedikal örneklerde biyolojik belirteçlerin analizinin yapılması bu kimyasal savaş ajanının ortamda kullanılıp kullanılmadığına ilişkin kanıtları sağlamak ve tedavi öncesinde tanısını koymak için gereklidir. ABD, İngiltere, Almanya, Rusya, Çin, Finlandiya, İsveç ve Hollanda gibi başlıca ülkelerde bulunan gelişmiş ve KSYÖ tarafından akredite edilmiş laboratuvarlarda, bu maddelere yönelik spesifik çalışmalar günümüzde yapılmaya devam etmektedir.

Bu ajanların gerek çevresel gerekse biyolojik örneklerde saptanması için spesifik olarak Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) ve Likid Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS) kullanılmaktadır. Birleşmiş Milletler bünyesinde yer alan Kimyasal Silahların Yasaklanması Örgütü (Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons, OPCW) tarafından kimyasal savaş ajanlarının tanısına yönelik araştırmalar büyük bir ciddiyetle ve tüm dünyada üye laboratuvarların katılımıyla sürdürülmektedir. Bu kapsamda, bu tez ile mevcut tehdidi değerlendirerek oluşabilecek kaza veya kötü niyetli kullanımlarda Sülfür mustard maruziyetinin kesin tanısını koyabilmek ve yukarıda belirtilen deneyimli laboratuvarlar arasında ülke olarak yerimizi alabilmeyi öngörmekteyiz.

Bu çalışmada, sülfür mustard (SM) maruziyetini kesin olarak gösteren bir biyobelirteç olarak ajanın glutatyon (GSH, vücudun başlıca antioksidanı olarak bilinmekte olup sistein, glisin ve glutamat amino asitlerinden oluşur ve insan vücudunun hemen her hücresinde bulunabilir) ile reaksiyonu sonucu oluşan metabolitleri (SBMTE, MSMTESE ve SBMSE) GCMSMS ile analiz edilmiştir. Bu kapsamda Beta Liyaz metabolitleri idrar numunesinde çalışılmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan GCMSMS (gaz kromatografisi ardışık kütle spektrometresi) cihazı, ileri düzey kromatografik bir cihazdır. Deteksiyon limitlerinin düşük olması ve ölçüm kesinliğinin fazla olması gibi nedenlerle günümüzde kimyasal savaş ajanlarının ve bunların parçalanma ürünlerinin analizinde sıklıkla tercih edilen bir cihazdır. Yöntemde, çeşitli ön işleme tabi tutulmuş numune enjeksiyonu yapılan GC ile ayrımı yapılan analit molekülleri MS kısmına gönderilerek moleküllerin o maddeye spesifik iyonlarına parçalanması sağlanır. Literatür çalışması yapılarak çalışmada kullanılan kimyasallar, GCMSMS çalışma şartları ve uygulanan ön işlemler belirlenmiş olup, GC ve MS şartları, enjeksiyon sonrası alınan sonuçlara göre modifiye edilerek optimizasyon sağlanmaya çalışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: **1)** Sülfür mustard, **2)** Gaz kromatografisi ardışık kütle spektrometresi (GCMSMS), **3)** 1,1'-sülfonylbis[2-(methylthio)ethane] (SBMTE) **4)** Kimyasal silah

## ABSTRACT

Sulfur mustard (2,2'-dichlorodiethyl sulfide,HD) is one of the mostly used chemical warfare agents. These toxic agents are absorbed through inhalation and via skin after the exposure. In addition to the toxic effect on eyes, respiratory system and skin, it furtherly affects the cellular membrane. It's also named as vesicating agent due to its life threatening effect causing serious and severe skin burns.

Sulfur mustard which was firstly synthesized in 1822 by German scientist Despretz was commonly by German Forces against Canada and British Armies in 1917 of First World War. Since this time, it has been the choice of chemical weapon used in both terror incidents and battlefield conflicts (mainly at Halabja in war between Iran and Iraq). At recent times, attacks by Syria including sulfur mustard in Marea on 21 August 2015 and rocket missiles with mustard agent against civilian people in Tazahurmatu-Iraq on 08 March 2016 were recorded in history of chemical warfare. It was particularly used in Iran-Iraq war(1980-1988) and caused victims more than 100.000. Prolonged effects of SM exposure complicated death of 30.000 of those victims and the other 70.000 Iranian people who survived are still undergo medical treatment and care.

Chemical weapons convention which was signed by more than 150 States throughout the World and put into force by United Nations General Secretary in 1997 has addressed that the production, storage and development of these chemical toxic materials is thoroughly prohibited. However, intelligency reports state that this chemical warfare agent has been possessed by some of our neighbouring countries and some terrorist groups supported by some states. Therefore, in any incident by chemical warfare agent, performing the analysis of biological indicators in biomedical samples like blood and urine is so important in terms of the proper identification of the agent and providing the evidences leading the accurate first-aid and treatment. In accredited and developed laboratories in countries including USA, UK, Germany, Russia, China, Republic of Czech, Finland, Sweden and the Netherlands, specific research and studies on Chemical Warfare Agents are still continuing to be performed.

Instruments like gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) and liquid chromatography tandem mass spectrometry (LCMS) have been used as the essential

instruments for the detection and identification of these agents. Research and development has been generally conducted by specific laboratories of member states via Proficiency Tests seriously organized by OPCW. The origin of the present project is to be able to put a definite diagnosis of Sulfur Mustard in incidents or bad intentions that may arise from evaluating the next danger and to become more steps furthers as the reference CBRN laboratory for chemical weapon identification in our country in behalf of proper detection and diagnosis of sulfur mustard exposures and application of this is expected as another profit from this Project.

In this Project, the analyses of metabolites of glutathione derivatives (SBMTE, MSMTESE ve SBMSE) were carried out via GCMSMS as the certain bioindicators of sulfur mustard exposure. Glutathione (GSH) is often referred to as the body's master antioxidant. Composed of three amino acids - cysteine, glycine, and glutamate - glutathione can be found in virtually every cell of the human body. The mentioned metabolites like  $\beta$ -lyase products are aimed to study from the urine samples.

GCMSMS (Gas chromatography tandem mass spectrometry) is a high tech instrument which uses an analytical technique to quantify the bioactive compounds present in any sample. It is also a cost effective method which has very-low detection limits with high precision values and high accuracy and is commonly used in the laboratory detection of chemical warfare agents. In this technique, analyte molecules seperated on GC via sample injection are delivered to MS section of the instrument where these molecules are decayed to specific ions. GCMSMS conditions, preconditioning and sampling procedures are entirely specified and GCMS runing conditions have been modified and optimized following the results obtained after injections.

Keywords: **1)** Sulfur Mustard, **2)** Gas Chromatography tandem mass spectrometry (GCMSMS), **3)** 1,1'-sulfonylbis[2-(methylthio)ethane] (SBMTE) **4)** Chemical Weapon

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması 12 Nisan 2016 tarihli, YÜK.LİS.DOK.MRK.: 50687469-3730-48-16/1593-48 sayılı ve “Doktora Öğrencisinin Tez İzleme Çalışmaları” konulu kararı gereği Tıbbi KBRN Ana Bilim Dalı Başkanlığında yapılmıştır.

Bu çalışmada sülfür mustard yakıcı ajanının biyobelirteçlerinin ölçüm yönteminin optimize edilmesi hedeflenmiştir.

Doktora eğitimim süresince hiçbir konuda benden yardımını esirgemeyen, desteğini her zaman hissettiğim, tez danışmanım ve değerli hocam, Tıbbi KBRN AD Başkanı Sayın Prof.Dr.Levent KENAR 'a şükran ve saygılarımı sunarım.

Doktora eğitimimde ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, kendisinden çok şey öğrendiğim değerli hocam Sayın Dr.Öğr.Üyesi Sermet SEZİGEN'e şükran ve saygılarımı sunarım. Yine eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım Sayın Yrd.Doç.Dr. Mesut ORTATATLI'ya teşekkürü borç bilir ve şükranlarımı sunarım.

Tezin istatistiksel analizinin yapılmasındaki katkılarından dolayı Doç.Dr.Erdim SERTOĞLU ve aplikasyon uzmanı Hacer ÖZKAN' a teşekkür ederim.

Çalışmalarında desteklerini eksik etmeyen Prof.Dr. Hakan BOYUNAĞA ve Prof.Dr. Orhan ATAKOL'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca sevgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili ailem; annem, babam, kardeşim ve tez çalışmam boyunca bana vermiş olduğu manevi destek, gösterdiği özveri ve anlayışı için değerli eşime şükranlarımı sunarım.



## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	x
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ .....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
GİRİŞ .....	1
GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. KİMYASAL SİLAH NEDİR?.....	3
2.2. KİMYASAL SİLAHLARIN TARİHÇESİ.....	4
2.3. KİMYASAL SİLAHLARIN SINIFLANDIRILMASI.....	9
2.4. YAKICI AJANLAR .....	11
2.5. KROMATOĞRAFİ .....	30
2.6. SÜLFÜR MUSTARD BİYOBELİRTEÇLERİ .....	36
GEREÇ VE YÖNTEM .....	42
3.1. KORUYUCU TEDBİRLER .....	42
3.2. KULLANILAN CİHAZLAR VE EKİPMAN .....	43
3.3. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE REAKTİFLER.....	45
3.4. DENEKLERDEN ÖRNEKLERİN TOPLANMASI .....	50
3.5. ANALİZ METOTLARI.....	50
BULGULAR.....	56
4.1. SBMTE KROMATOGRAMI, KÜTLE SPEKTRUMU VE KÜTÜPHANE SPEKTRUMU .....	56
4.2. YÖNTEM DEĞERLENDİRME VE VALİDASYONU .....	58
TARTIŞMA .....	61
SONUÇLAR .....	73
KAYNAKLAR .....	75
EKLER.....	81
ÖZGEÇMİŞ .....	85

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekiller	Sayfa
Şekil 2.1. Sülfür mustard'ın kimyasal yapısı 2,2'-diklorodietil sülfür (bis-2-kloroetil sülfür) şeklindedir.....	13
Şekil 2.2. Sülfür Mustard'ın oksidasyon reaksiyonları, sülfon ve sülfoksit türevlerinin oluşumu.....	16
Şekil 2.3. Çok yüksek derecede reaktif bir ara ürün olan siklik sulfonyum katyonu oluşumu. ....	17
Şekil 2.4. Sülfür Mustard'ın hidroliz reaksiyonları ve tiyodiglikol oluşumu (34). ...	18
Şekil 2.5. Sülfür mustard'ın doku hasarına sebep olduğu varsayılan biyolojik etkileri .....	22
Şekil 2.6. Gaz Kromatografisi Cihazının Kısımları.....	32
Şekil 2.7. Mustard gazının elektron iyonizasyon kütle spektrumu.....	35
Şekil 2.8. Sülfür Mustard'ın Biyolojik Belirteçleri .....	37
Şekil 2.9. SBMSE VE MSMTESE'nin $TiCl_3$ ile SBMTE'ye reaksiyonu.....	38
Şekil 2.10. TDGO'nun, $TiCl_3$ ile TDG'ye reaksiyonu .....	39
Şekil 2.11. TDG ve TDGO'nun, HFBA ve HFBI ile reaksiyonu sonucu oluşan heptafluorobutiril ester türevi ürünleri .....	40
Şekil 2.12. TDG'nin, N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) ile reaksiyonu sonucu oluşan türevi. ....	40
Şekil 3.1. SBMTE analitinin MRM metoduyla aranan iyon çifti için yapılan optimizasyon .....	53
Şekil 3.2. SBMTE analitinin MRM metoduyla aranan iyon çiftinin en uygun voltaj ve en yüksek yoğunluklarının grafiği .....	53
Şekil 4.1. a) 100 ng/mL konsantrasyonunda SBMTE kromatogramı. ....	56
b) 100 ng/mL konsantrasyonunda SBMTE'ye ait kütle spektrumu. ....	56
Şekil 4.2. SBMTE'ye ait referans kütüphane spektrumu .....	57
Şekil 4.3. SBMTE maddesine ait yapılan çalışmalarda kör örnek kromatogramı.....	57
Şekil 4.4. SBMTE için çizilen kalibrasyon doğrusu.....	60
Şekil 5.1. SBMTE'nin kimyasal yapısı .....	65

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelgeler	Sayfa
Çizelge 2.1. Kalıcılık özelliklerine göre kimyasal silahların sınıflandırılması, çevrede kalıcıları ve öldürücülüğü.....	10
Çizelge 2.2. Fizyolojik etki mekanizmalarına göre kimyasal silahların sınıflandırılması.....	10
Çizelge 2.3. Sülfür Mustard'ın fizikokimyasal özellikleri. ....	14
Çizelge 2.4. SM'ye bağlı akciğer hasarı .....	26
Çizelge 2.5. SM'ye bağlı göz hasarı. ....	27
Çizelge 2.6. SM'ye bağlı cilt hasarı.....	28
Çizelge 2.7. Gaz kromatografisinde en çok kullanılan sabit fazlar (47).....	33
Çizelge 3.1. Ölçümü yapılan kimyasal analitler (1.SBMTE, 2.SBMSE, 3.MSMTESE).....	46
Çizelge 3.2. Kullanılan örneklere ait konsantrasyonlar .....	51
Çizelge 4.1. Gün içi CV değerleri.....	58
Çizelge 4.2. Günler arası CV değerleri .....	59
Çizelge 4.3. SBMTE için belirlenmiş 6 farklı konsantrasyonda doğruluk ve bias değerlendirmesi .....	59

## RESİMLERİN LİSTESİ

Resimler	Sayfa
<b>Resim 2.1.</b> 26 Kasım 2016 tarihinde El Bab/Suriye bölgesinde gerçekleşen saldırı sonrası hayatını kaybeden Mustard yaralı.. .....	9
<b>Resim 3.1.</b> Koruyucu tedbirler .....	42
<b>Resim 3.2.</b> Çalışmanın yapıldığı GC/MS-MS Sistemi (Shimadzu) .....	44
<b>Resim 3.3.</b> SBMTE'nin $^1\text{H}$ NMR ve $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu .....	47
<b>Resim 3.4.</b> SBMSE'nin $^1\text{H}$ NMR ve $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu .....	48
<b>Resim 3.5.</b> MSMTESE'nin $^1\text{H}$ NMR ve $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu .....	49

## SİMGELER VE KISALTMALAR

- %R : Geri Kazanım Yüzdesi (Recovery)
- AC : Hidrojen siyanidin askeri sembolü
- Aerosol : Çapları 1 mikrometreden küçük olan ve havada veya başlıca bir gaz içinde asılı halde bulunan sıvı ve katı taneciklerdir.
- AFAD : Afet ve Acil Durum Yönetimi Başkanlığı
- Antidot : Bir toksik maddenin zararlı etkilerini nötralize eden ilaç.
- ARDS : Akut respiratuar distres sendromu
- ATP : Adenozin trifosfat.
- BAL : British anti-lewisit. Lewisite maruz kalan yaralılarda bül oluşumunu engellemek için cilde sürülen ve dimerkaprol içeren merhem.
- BSTFA : N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide
- BZ : 3-Kuinüklinidinil benzilat
- CAS : Kimyasal Kuramlar Servisi (Chemical Abstracts Service)
- CE : Çarpışma Enerjisi (Collision Energy)
- CG : Fosgen
- CK : Siyanojen klorid
- CLSI : Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü  
(Clinical and Laboratory Standards Institute)
- CN : 2-Kloroasetofenon
- CO<sub>2</sub> : Karbondioksit
- CS : 2-Klorobenzalmalonitrit; kargaşa kontrolü için en yaygın olarak kullanılan duyuşal irritan
- CR : Dibenz (b,f)-1,4-oksazepin
- CV : Varyasyon Katsayısı
- CX : Fosgen oksim
- DA : Difenilkloroarsin
- Dekontaminasyon : Ortamdan uzaklaştırarak, imha ederek veya örterek tehlikeli bir maddenin (örneğin kimyasal harp maddeleri) zararsız hale getirilmesi.
- 4-DMAP : 4-Dimetilaminofenol
- DMPS : Dimerkaptopropansulfonik asit
- DMSA : Dimerkaptosüksinik asit

DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DP	: Difosgen
GA	: Tabunun askeri kodu
GB	: Sarinin askeri kodu
GC	: Gaz Kromatografisi
GCMS	: Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi
GCMSMS	: Gaz Kromatografisi Ardışık Kütle Spektrometresi
GD	: Somanın askeri kodu
GF	: Sikloheksil sarinin askeri kodu
HAZMAT	: Tehlikeli madde
HCN	: Hidrojen siyanür
HFBA	: Heptafluorobutyric anhydride
HFBI	: Heptafluorobutyryl imidazole
H	: Sülfür mustardın askeri kodu
HD	: Damıtılmış sülfür mustardın askeri kodu
HN	: Nitrojen mustardın askeri kodu
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Hidrojen Peroksit
IS	: İnternal Standart
ISO	: Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (International Organization for Standardization)
IUPAC	: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry)
İKK	: İç Kalite Kontrol
KBRN	: Kimyasal, Biyolojik, Radyolojik ve Nükleer.
Kimyasal harp maddesi/ajanı (KHM)	: Kimyasal silah olarak geliştirilen, üretilen ve depolanan, Kimyasal Silahlar Sözleşmesinin amacı için risk teşkil eden, kullanımı Kimyasal Silahlar Sözleşmesi ile yasaklanan, ölümler ile yaralanmalara yol açabilen toksik kimyasal madde.
Kimyasal olay	: İnsan ve çevre sağlığına zarar verebilecek bir veya daha fazla tehlikeli kimyasalın kasıtlı veya kasıtsız olarak salınımı / kullanımı.
Kimyasal savaş	: Bir savaş yöntemi olan ve ölümler ile yaralanmalara yol açabilen toksik kimyasalların kullanımınıdır.

- KS : Kimyasal silah, Kimyasal Silahlar Sözleşmesi kimyasal silahların öncül maddeleri ile atım vasıtalarını da kimyasal silah olarak tanımlar.
- KKD : Kişisel koruyucu donanım. Kimyasal ajan ile kontamine bir ortamda giyilen solunum cihazı ile birlikte kimyasal maddelere dayanıklı sızdırmaz elbise, kimyasallara dayanıklı iç ve dış eldivenler ile kimyasal koruyucu botlar donanıma dahildir.
- KSYÖ (OPCW) : Kimyasal Silahların Yasaklanması Örgütü.
- KSS : Kimyasal Silahlar Sözleşmesi. Tam adı “Kimyasal Silahların Geliştirilmesinin, Üretiminin, Stoklanmasının ve Kullanımının Yasaklanması ve Bunların İmhası ile İlgili Sözleşme”. KSS 13 Ocak 1993 tarihinde imzaya açıldı ve 29 Nisan 1997 tarihinde yürürlüğe girdi.
- L : Lewisitinin askeri kodu
- LC<sub>t50</sub> : Üzerinde deney yapılan canlıların yarısının ölmesi için yeterli olan derişim ve gerekli maruz kalma süresi (konsantrasyon ve süre)
- LD<sub>50</sub> : Üzerinde deney yapılan canlıların yarısının ölmesi için yeterli olan madde miktarı (ağırlık)
- LC : Sıvı Kromatografisi
- LC-MS/MS : Sıvı Kromatografisi Ardışık Kütle Spektrometresi
- LC-MS : Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi
- LOD : Tespit Limiti (Limit of Detection)
- LOQ : Tayin Limiti (Limit of Quantitation)
- LPG : Sıvılaştırılmış petrol gazı (Liquified Petroleum Gas) anlamına gelen LPG, bütan ve propan gazlarının karışımıdır.
- m/z : kütle/yük
- M : Molar
- MRM Modu : Çoklu Reaksiyon İzleme Modu (Multiple Reaction Monitoring Mode)
- MS : Kütle Spektrometresi
- Maruziyet : Potansiyel zararlı etkileri ile birlikte radyasyona veya kimyasala maruz kalmak.
- MTBSTFA : N-(t-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide
- NIST : Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü

(National Institute of Standards and Technology)

$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{m}$	: Mikrometre
ng	: Nanogram
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit
OC	: Oleoresin kapsikum
pH	: Hidrojen konsantrasyonunun logaritması (Power of Hydrogen)
ppb	: Parts per billion
ppm	: Parts per million
Prekürsör	: Kimyasal ajan üretiminde gerekli olan malzemedir.
PTSD	: Travma sonrası stres bozukluğu.
QQQ	: Üçlü Kuadropol
RE	: Rölatif Hata (Relative Error)
rRNA	: Ribozomal Ribo Nükleik Asit
RSDL	: Reaktif cilt dekontaminasyon losyon kiti.
RT	: Alıkonma Zamanı (Retention Time)
SBMTE	: 1,1'-sülfonylbis[2-(methylthio)ethane]
SBMSE	: 1,1'-sülfonylbis[2-(methylsulfinyl)ethane]
MSMTESE	: 1-methylsulfinyl-2-[2-(methylthio)ethylsulfonyl]ethane]
SCBA	: Pozitif basınçlı solunum cihazı (tüp).
SD	: Standart Sapma
Sitotoksik	: Hücre ölümü ile sonuçlanabilecek hücre zehirlenmesi.
SM	: Sülfür Mustard
SPE	: Katı faz ekstraksiyonu
SRM Modu	: Seçilmiş Reaksiyon İzleme Modu (Selected Reaction Monitoring Mode)
SRM	: Standart Referans Materyal
S/N	: Sinyal/gürültü
TDG	: Tiyodiglikol
TDGO	: Tiyodiglikol sülfoksid
Tespit (deteksiyon)	: Belirli bir kimyasal harp maddesinin varlığının gösterilmesi veya konsantrasyonunun ölçülmesi.



- TIC : Toksik endüstriyel kimyasal.
- TiCl<sub>3</sub> : Titanyum triklorid
- TNT : Trinitrotoluen, formülü C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> olan bir kimyasal bileşik. Sarı renkli bir katı olan TNT, güçlü bir patlayıcıdır.
- Triyaj : Hastanın eşlik eden yaralanmasına bağlı olarak tedavi önceliğinin belirlenmesi işlemidir.
- Vezikan : Yakıcı.
- VX : O-etil-S-2(diizopropilamino)etilmetilfosfonotioatın askeri kodu
- Yakıcı ajanlar : Sülfür mustard, Lewisit, nitrojen mustard gibi ciddi cilt ve göz hasarı ile mukoza ağrısına ve ciltte büllere yol açan toksik kimyasallar.



## GİRİŞ

Hayatı tehdit edici, ciddi ve geniş deri yanıklarına neden olabilen Sülfür mustard (SM) ilk kez 1822 yılında Alman bilim adamı Despretz tarafından sentezlenmiştir (1). Kimyasal yapı itibariyle 2,2'-kloroetil sülfür (bis-(2-chloroethyl)sulphide) şeklindedir.

Saf SM şeffaf, kokusuz ve yağlı bir sıvıdır. 14,4 °C' de donma ve 215-217 °C arası kaynama noktasına sahiptir. Özellikle silah olarak kullanabilmek için yüksek molekül ağırlıklı kimyasallarla karıştırıldığında partikül çapı artar, buharlaşma oranı azalır ve sarımsak kokulu koyu renkli bir hale dönüşür (2). Kullanılan bu kimyasallar persistansı arttırmakta ve dekontaminasyonu zorlaştırmaktadır. Bu nedenle SM kullanıldığı bölgede günlerce tehdit oluşturmakta ve bu da gecikmiş yaralanma ve belirtilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. SM'nin persistansı nem ve sıcaklıkla değişiklik göstermekte, sıcaklık arttıkça uçuculuğu da artmaktadır. 40 °C' deki uçuculuğu 0 °C' ye göre 40 kat daha fazladır. Bu yüzden daha yüksek sıcaklıklarda kalıcılığı azalmasına rağmen özellikle solunumsal etkilenim artmaktadır (3).

Solunum ve ciltten emilimle vücuda giren bu yağlı madde, gözleri, solunum sistemini ve deriyi önce tahriş eder, sonrasında da hücresel düzeyde etki gösterir (3). Bifonksiyonel alkilasyon ajanı olan SM, fizyolojik koşullarda episulfonyum iyonu aracılığı ile dokuda çok sayıda nükleofilik moleküller, su, glutasyon, DNA ve proteinlerle hızla reaksiyona girer (1). Bu reaksiyonların geri dönüşümsüz olması SM'a yönelik bir antidot bulunamamasında önemli bir faktördür. Siyanür ve sarin gibi kimyasal savaş ajanları özellikle solunum sisteminde çok hızlı etki gösterirken; SM maruziyetinde 2 - 6 saatlik asemptomatik latent periyodun ardından ciltte eritem ve blisterler, solunum yolunda irritasyon, konjunktivit, göz kapaklarında ödem meydana gelmekte ve gecikmiş etki olarak kemik iliği depresyonu gibi klinik bulgular gözlenmektedir (4).

SM, ilk kez 1917 yılında Belçika'nın Ypres yakınlarında, Alman ordusu tarafından Kanadalılara ve İngilizlere karşı I. Dünya Savaşında kullanılmıştır. Özellikle İran-Irak (1980-1988) savaşında yaygın bir şekilde kullanılmış ve 100.000 den fazla kişinin yaralanmasına neden olmuştur. Bununla birlikte uzamış etkileri nedeniyle bu yaralılardan 30.000'den fazlasının ölümüne yol açmıştır. Sülfür

mustard maruziyeti sonrası hayatta kalabilen yaklaşık 70.000 İranlı halen tıbbi tedavi görmeye devam etmektedir (5).

Anamnez, fizik muayene ve klinik bulgularının yanısıra kan ve idrar gibi biyomedikal örneklerde biyobelirteçlerin laboratuvar analizi ile gösterilmesi bu kimyasal ajanın kullanıldığını teyit etmek açısından önem arz etmektedir. Mustard gazı maruziyetinde idrar ve kanda tespit edilebilen metabolitleri ve DNA katım ürünlerini içeren bir takım biyobelirteçler tanımlanmıştır. SM'in major idrar metabolitleri oksidasyon/hidroliz ürünleri olan tiyodiglikol (2,2-thiodiethanol) (TDG), tiyodiglikol sülfoksid (TDGO) ve glutatyon türevi metabolitleri olan beta liyaz metabolitleridir (1). Bu maddelerin analizinde Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) ve Likid Kromatografisi-Kütle Spektrometresi(LC-MS) kullanılmaktadır.

Çalışmamızda hızlı ve güvenli bir ön işlem prosedürünü müteakip uygun deteksiyon limitlerinde sülfür mustard biyobelirteçlerini ölçebilmeyi ve ülkemizin çeşitli laboratuvarlarında kolaylıkla uygulanabilecek uygun bir yöntem geliştirmeyi hedefledik. Ayrıca bu çalışma, ülkemize analiz yeteneği kazandırmakla birlikte kimyasal bir savaş ajanının laboratuvar analizinde ulusal anlamda bir metot oluşturulmasına da ön ayak olabilecektir.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. KİMYASAL SİLAH NEDİR?

Kimyasal silah, Birleşmiş Milletler'in 1969 yılında yayınlamış olduğu bir raporda "insanlar, hayvanlar ve bitkiler üzerine doğrudan toksik etkiler gösteren her türlü katı, sıvı, gaz halindeki kimyasal maddeler" şeklinde tanımlanmıştır. Daha ayrıntılı bir tanımlama yapılacak olursa, kullanıldıkları bölgede kaos ve paniğe yol açmak amacıyla, canlı organizmaları öldürmek veya yaralamak suretiyle saf dışı bırakmak veya fonksiyonlarını bozarak etkisiz hale getirmek, besin kaynakları gibi ekonomik önemi olan hedefleri kullanılmaz hale sokmak, askeri personeli koruyucu donanım kullanmak zorunda bırakarak manevra kabiliyetlerini yok etmek gibi temel özelliklere sahip, toksisitesi yüksek, çevresel etkenlere dayanıklı ve üretimi ekonomik olan kimyasal maddeler, kimyasal silah veya kimyasal savaş ajanı olarak tanımlanırlar. Bu ajanlar, ortamda katı, sıvı veya gaz halinde bulunabilmekte ve canlı organizmalara solunum yolu, sindirim kanalı veya cilt ve mukozalardan absorbe olmak suretiyle girerek etkilerini gösterirler. Bu maddelerin sentezi kolay ve ekonomik olmakla beraber dış faktörlere oldukça dayanıklıdır (6).

KBRN konsepti içerisinde yer alan her ajan, konvansiyonel silahlardan büyük çapta kitlesel ölümlere ve yaralanmalara neden olabilme özellikleriyle ayrılmaktadır. Konvansiyonel patlayıcılarla birleştikleri husus ise gaz, katı veya sıvı özellikte olabilmeleridir. Nitrogliserin gibi sıvı, TNT gibi katı veya LPG gibi gaz özellikte bir patlayıcı, yakıcı etkisi ve basınç etkisiyle yalnız buldukları çevrede tahribat yaratırken KBRN ajanlarının çok uzak mesafelere kadar yayılabilmeye özelliği dikkat çekicidir.

Kimyasal silahlar sıklıkla fakirin atom bombası olarak tanımlanır. Kimyasal silah prekürsörü olan kimyasalların çoğu normalde endüstriyel olarak da kullanılabilir. Örneğin, sülfür mustardın sentezinde etil alkol, sodyum sülfid ve ağartıcı gerekir. Yine mustard sentezinde kullanılabilen tiyodiglikol eser miktarlarda dolma kalem mürekkebinde de mevcuttur.

Birinci Dünya Savaşı sırasında kimyasal savaş ajanlarının kullanımı günümüzde kargaşa kontrol ajanları olarak bilinen iritan maddelerle başlar. Daha

sonra başlıca klorin ve fosgen kullanımıyla büyük zayıflara neden olunduysa da çok daha fazla sayıda yaralıya bir yakıcı ajan olan sülfür mustard sebebiyet vermiştir (7).

Kimyasal savaş ajanlarının en önemli temel özellikleri şunlardır (6):

- Karakteristik bir kokuya sahip olabildikleri gibi kokusuz da olabilirler.
- Suda ve organik çözücülerde az veya çok çözünebilirler.
- Toksik etkinin başlaması temas yoluna, absorpsiyon hızına, çevresel koşullara, cildin kuru veya nemli oluşuna; bireyin ırk, cinsiyet ve yaşına bağlı olarak değişkenlik gösterir.

- Çok toksikdirler ve akut etkiye sahiptirler.

- Sekonder kontaminasyon olasılığı vardır.

- Üretimi ve deteksiyonu biyolojik silaha göre kolaydır, fakat dekontaminasyonu şarttır.

- Bu ajanların vücuda giriş yolları ise; inhalasyon sonrası burun ve ağız yolu, gözlerden veya ciltten absorpsiyonu ve gastrointestinal kanaldan kontamine gıdalarla olabilmektedir.

Bir kimyasal silahta olması istenilen özellikler genel olarak şunlardır:

a) Yüksek toksisiteli, renksiz, kokusuz ve havadan ağır olmalıdır.

b) Su, hava ve diğer çevresel faktörlere karşı dayanıklı olmalıdır.

c) Üretimi ve depolanması kolay ve ucuz olmalıdır (6).

## 2.2. KİMYASAL SİLAHLARIN TARİHÇESİ

Kimyasalların ve zehirlerin silah olarak kullanımı milattan önce 429'a (Peloponezlielerin Spartalılara karşı zehirli gaz kullanımı) dayanır (8). Yine o dönemlerde Afrika yerlileri, aralarındaki büyücüleri cezalandırmak amacıyla günümüzde Kalabar fasülyesi ya da Kalabar tohumu adıyla anılan bitkiyi kullanmışlardır (9). Belki de tarihteki ilk kimyasal silah olarak tanımlayabileceğimiz bu bitkinin etken maddesi fizostigmin olup geri dönüşümlü kolinesteraz inhibitörü alkaloiddir ve bir sinir ajanı gibi etki etmektedir. Tabi ki Afrika'nın tropik ikliminde yetişebilen bu bitki hakkında hiçbir bilgisi olmayan yerliler gelecekte bir kimyasal silahın temellerini attıklarını da öngöremezlerdi. Anlaşılacağı üzere o çağlarda daha çok zehirler tercih edilirken, on dokuzuncu yüzyıldan itibaren bilim dünyasındaki

yeniliklerin paralelinde geliştirilen kimyasal savaş ajanları konvansiyonel silahlara oranla daha fazla öldürücü etkiye sahip oldukları için “Kitle İmha Silahları” olarak adlandırılmışlar ve savaşlarda sık olarak kullanılmışlardır (10).

Kimyasal silahların tarihine bakıldığında bilinen en eski kayıtlardan birisi Milattan Önce (M.Ö.) 600 yılında Solon adındaki Atinalı bir diktatörün Yunanistan’da yer alan Kirra şehrini kuşatması ve halkın direncini kırmak için şehrin su kaynaklarını *hellebore* bitkisinin kökleri ile zehirlemesi (7) ve yine M.Ö. 200 yıllarında Kartacalıların düşmanlarını etkisiz hale getirmek için adamotu bitkisinin özünü kullanmaları sayılabilir. Savaşta kullanılmak üzere bilinen diğer bir toksik kimyasal ise Bizans donanmasının yedinci yüzyılda kullandığı kükürt ve petrol karışımı olan, yanınca toksik ve aşındırıcı etkileri görülen “Rum Ateşi” isimli maddedir (5).

İsveçli bilim adamı Scheele tarafından 1782 yılında sentezlenen hidrojen siyanür 1916 yılında Fransa, İngiltere ve 1918’de ABD ve İtalya tarafından Birinci Dünya Savaşı sırasında kullanılmış olup havadan hafif olması ve hızla dağılıp kaybolması sebebiyle etkisiz kalmıştır (11).

Birinci Dünya Savaşı sırasında savaş halinde olan hükümetler bu silahların geliştirilmesi, üretimi ve stoklanmasına yoğun çaba harcamışlardır. Patlayıcı maddelerin temini ve üretilebilmesi yüksek maliyet gerektirdiği için Birinci Dünya Savaşı’nda özellikle Almanya olmak üzere savaşa katılan devletler kimyasal maddeleri bir kitle imha silahı olarak askeri birliklere karşı kullanma yoluna gitmişlerdir. Sonuçta çok toksik olan bu kimyasal maddeler savaş alanlarında çeşitli atım vasıtaları aracılığıyla kullanılarak çok sayıda insanın ya ölümüne ya da yaralanarak saf dışı kalmasına neden olmuştur (12).

Kimyasal savaş ajanlarının savaş alanında ilk kullanımı 22 Nisan 1915 tarihinde Belçika’nın Ypres şehri yakınlarında yer alan 5 kilometrelik bir cephe hattında Almanlar tarafından klor içeren varillerin kapaklarının açılması ve rüzgara bırakılarak gazın dağılması yoluyla 498 ton klor gazının kullanımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca klor gazını düşman ordusunun hareketini yavaşlatmak için İtalya 1930’da Etiyopya’da kullanmıştır. Yine 1915 yılında bu kez Fosgen gazı Fransa’nın, Almanya’ya karşı kullandığı bir kimyasal savaş ajanı olmuştur (12).

Almanya, 13 Haziran 1917'de Ypres şehri yakınlarında ilk kez kusturucu bir gaz olan difenilkloroarsin (DA) ve sülfür mustard karışımını kullanmıştır. Difenilkloroarsinin, hardal gazı ile birlikte kullanılmasının sebebi düşmanı gaz maskelerini çıkarmaya zorlayarak Hardal gazının daha etkili olmasını sağlamaktır. Sülfür mustardın diğer bir ismi olan "iperit" kelimesi de ilk kez kullanıldığı Belçika şehrinin isminden gelmektedir. Mustardın solunum sistemi yanında cildi de etkilemesi nedeniyle gaz maskesi yanında kimyasallardan koruyucu elbiselerin kullanımını da zorunlu hale gelmiştir. Birinci Dünya Savaşı, kimyasal silahların keşfinin yanı sıra kimyasal ajan tespit cihazları, kimyasal ajanlara karşı koruma sağlayacak gaz maskesi, maske filtresi ve kişisel koruyucu donanımlar ile bu sinsi silahlara karşı tedavi amaçlı panzehirlerin de geliştirilmesine yol açmıştır (13).

Alman kimyacı Gerhard Schrader pestisitler üzerinde çalışmalar yaparken 1936 yılında tabun (GA) gazını ve 1937 yılında sarin (GB) gazını sentezlemiştir. 1939 yılında Alman Savunma Bakanlığı bu iki ajanın seri olarak üretimi için bir proje başlatmıştır. Bununla beraber ancak 1943 yılında sentez işlemi başlamış ve savaş sonuna kadar 10.000-12.000 ton tabun ve 600 ton sarin üretilebilmiştir (13).

İkinci Dünya Savaşı boyunca, Uzakdoğu'da Japonya'nın yerel faaliyetleri dışında (Japonların Çin'e karşı klor gazını kullanmaları), dünyada kimyasal silahlar kullanılmamıştır. Bunun en önemli nedeni bu öldürücü maddelerin savaşan tüm ülkelerde aşırı miktarlarda bulunması ve kullanıldığı takdirde toksik etkilerinin yalnız savaş alanlarında kalmayıp, tıpkı bir nükleer etkisi gibi geniş bir alanda görülebileceği ve olası bir saldırının çok fazla sayıda insanın ölümüyle sonuçlanması ihtimalidir (13).

1940-1945 yılları arasında Almanya'da kurulan toplama kamplarında pek çok farklı etnik kökene mensup insan topluca öldürülmüştür. Bu kıyımlarda kullanılan yöntemlerden bir tanesi de gaz odası adı verilen kapalı alanlara doldurulan insanlara Zyklon-B isimli siyanür türevinin uygulanması olmuştur. (13)

1944 yılında Avusturyalı biyokimyacı Dr. Richard Kuhn tarafından soman (GD) ve 1952 yılında Ranajit Ghosh ve J.F.Newman isimli iki bilim adamı tarafından Vx gazı sentezlenmiştir (14). Vx gazının öldürücülüğünün çok büyük boyutlarda olduğu farkedilince ticari üretimine son verilmiştir.

1945 – 1947 yılları arasında Panama'nın San Jose adasında A.B.D. tarafından başlıca Fosgen, Siyanojen Klorür ve Mustard olmak üzere çeşitli kimyasal savaş ajanlarının testleri yapılmıştır. Adada büyük miktarda patlamamış mühimmat bulunması nedeniyle günümüzde tamamıyla boşaltılmış ve halen girişe yasak bir bölgedir. İkinci dünya savaşı sonrasında Kanada, Amerika ve İngiltere'nin tonlarca kimyasal savaş ajanını San Jose adasına ve çevresindeki okyanus sularına bıraktığı bilinmektedir.

1980-1988 yılları arasında yaşanan İran-İrak Savaşı sırasında Irak ordusu İran birliklerine karşı sinir ajanları ve mustard kullanmıştır. 16 Mart 1988 tarihinde dönemin Irak devlet başkanı Saddam Hüseyin tarafından uçaklarla Halepçe'ye Mustard gazı atılmış ve bu saldırı yaklaşık 6500 kişinin ölümüne, 15 bin civarında yaralıya neden olmuştur (13).

Bir Amerikan şirketi olan Union Carbide firmasının Hindistan Bhopal'de kurduğu böcek ilacı üreten fabrikadan 3 Aralık 1984 günü 40 tondan fazla Metil İzosiyanat gaz sızıntısı olması sonucu, 3800 insanın ölümü ve binlerce kişinin yaralanmasıyla sonuçlanan olay "Bhopal Felaketi", zehirli endüstriyel madde kazalarına bir örnek olarak tarihe geçmiştir (15).

27 Haziran 1994 tarihinde Japonya'nın Matsumoto şehrinde "Yüce Gerçek (Aum Şinrikyo)" tarikatı üyeleri tarafından gerçekleştirilen ve seyreltilmiş sarinin kullanıldığı terörist saldırı 600 civarında insanı etkilemiş, ardında 58 yaralı ve 7 ölü bırakmıştır (16). Yine aynı tarikat tarafından 20 Mart 1995 tarihinde Tokyo şehrinin metro sisteminde gerçekleştirilen ve % 35 saflıkta sarin kullanılan terörist saldırıda 12 kişi hayatını kaybetmiş ve 5500 kişi yaralanmıştır (17).

23 Ekim 2002 tarihinde Moskova'da bir tiyatro binasını basan eylemcilere müdahale eden Rus antiterör timleri binaya baskın düzenlemeden önce fentanil türevi olduğu sanılan bir kimyasal ajanı havalandırma sisteminden tiyatro binasına püskürtmüşlerdir. Binada bulunanlardan 129 kişi salınan gazdan etkilenerek hayatını kaybetmiştir (13).

Bir sonraki başkanlık seçimlerine hazırlanan Ukrayna Devlet Başkanı Victor Yushchenko kısa süre içerisinde gelişen şiddetli bir hastalık tablosu ile 2004 yılı Ekim ayında Viyana'da tedavi altına alınmış ve yapılan detaylı analizlerde dioksin ile zehirlendiği ortaya konulmuştur (18). Özetle, dioksin hemen her yerde



bulunabilen insan ve hayvan sağlığını tehdit eden toksik bir kimyasaldır. En çok bilinen dioksinler poliklorlu- $\rho$ -dioksinler (PCDD), poliklorludibenzofuranlar (PCDF) ve poliklorlubifeniller (PCB)'dir. Bunlar, suda az çözünmeleri ve yüksek lipofilitelele sebebiyle gıdalarda birikebilme özelliğine sahiptirler. Bitkisel gıdalarda oldukça düşük miktarlarda bulunan dioksinler daha çok et, süt ve bunların ürünlele ile deniz ürünlele gibi hayvansal gıdalarda bulunurlar (19).

Son yıllarda kimyasal silah kullanımı ve tehdidi özellikle ülkemizin de içinde bulunduğu Orta Doğu coğrafyasında oldukça artmıştır. 21 Ağustos 2013 tarihinde Şam'ın Ghouta bölgesinde terleme, salivasyon, kas tremorları, konvülziyonlar ve solunum güçlüğu bulgularıyla aralarında çocukların da bulunduğu yüzlerce insan hastanelere kaldırıldı. Birleşmiş Milletler inceleme ekibi kullanılan kimyasal ajanın Sarin gazı olduğunu açıkladı. Bu trajik olayda saatler içerisinde 430 ölü ve 3600 yaralı rapor edilmiştir (20).

26 Kasım 2016 tarihinde Suriye/El Bab bölgesinde meydana gelen saldırıda sarımsak kokusunun yayıldığı belirtilen koyu renkli yoğun gazdan Özgür Suriye Ordusu mensubu 13 asker etkilenmiş, yapılan inceleme ve analiz sonucunda kullanılan ajanın SM olduğu değerlendirilmiştir. Bu saldırıda etkilenenlerden biri tedavinin 18'inci gününde hayatını kaybetmiştir (Resim 2.1) (21).

Kimyasal silahların kullanımının sınırlandırılması ile ilgili bilinen ilk uluslararası antlaşma Fransızlar ve Almanlar arasında 1675 yılında Strasbourg'da imzalanan zehirli mermilerin kullanılmamasına ilişkin anlaşmadır (22).

Kimyasal silahların kullanımı, depolanması ve geliştirilmesi 1993 tarihinde kimyasal silahlar konvansiyonuyla yasaklanmıştır. Bu kapsamda 13 Ocak 1993 tarihinde imzalanarak 29 Nisan 1997 tarihinde 162 ülkenin katılımıyla yürürlüğe giren Kimyasal Silahların Geliştirilmesinin, Üretiminin, Stoklanmasının ve Kullanımının Yasaklanması ve Bunların İmhası ile İlgili Sözleşme (Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on their Destruction) ülkemizce 14 Ocak 1993'te imzalanmış ve 3 Mayıs 1997'de yürürlüğe girmiştir.



**Resim 2.1.** 26 Kasım 2016 tarihinde El Bab/Suriye bölgesinde gerçekleşen saldırı sonrası hayatını kaybeden Mustard yaralı. Vücudunda yaygın yüzeysel eritemler ile özellikle kafa, boyun, kollar ve ellerinde içi sıvı dolu blisterler gözlenmiştir (21).

### 2.3. KİMYASAL SİLAHLARIN SINIFLANDIRILMASI

Kimyasal silahlar, fizyokimyasal özelliklerine göre pek çok alt gruba ayrılmakla beraber çizelge 2.1’de yansıtıldığı gibi yüksek kalıcılık ve düşük kalıcılık özelliklerine göre de sınıflandırılabilir. Günümüzde en sık kullanılan sınıflama fizyolojik etki mekanizmalarına göre yapılan sınıflandırma olup çizelge 2.2’de yer almaktadır (7, 23).

Bu silahlar arasında yakıcı ajanlar, yarattıkları fiziksel ve psikolojik etkiler ve elde edilmelerinin kolay olması sebebiyle terörist saldırılar düzenlemek amacıyla tercih edilen silah grubudur. Bu fiziksel etkiyi toksik moleküler mekanizmalar üzerinden gerçekleştirirken, psikolojik etkiyi toplumda panik ve kargaşaya neden olarak meydana getirirler. Yakıcı ajan kullanılan bir saldırıdan sonra yaralılar ile birlikte psikolojik olarak etkilenmiş kişiler en yakın sağlık kuruluşunun acil servisine başvurarak yığılmalara yol açacaklar, bu yığılmalara bağlı olarak acil sağlık hizmet desteğinde ciddi kesintiler söz konusu olacaktır (24, 25).

**Çizelge 2.1.** Kalıcılık özelliklerine göre kimyasal silahların sınıflandırılması, çevrede kalıcıkları ve öldürücülüğü (26).

Potens	Yüksek kalıcılık	Düşük kalıcılık
<b>Zayıf öldürücülük</b>	Sülfür mustard (HD), Levisit (L), Mustard-levisit (HL) Nitrojen mustard (HN1-2-3) Siyanojen klorür (CK) Difenilkloroarsin (DA) Arsin (AsH <sub>3</sub> ) Klor (Cl <sub>2</sub> )	o-Klorobenzilmalonitril (CS) Dibenz(b,f)-1,4-oksazepin (CR) Kloroasetofenon (CN) Kloropikrin (PS)
<b>Güçlü öldürücülük</b>	Soman (GB) Siklosarin (GF) VX	Fosgen (CG) Sarin (GB) Tabun (GA) Hidrojen Siyanür (AC)

**Çizelge 2.2.** Fizyolojik etki mekanizmalarına göre kimyasal silahların sınıflandırılması (7).

Grup/kimyasal isim	Yaygın isim	Sembol
<b>SİNİR AJANLARI</b>		
Ethyl-N,N-dimethyl fosporamidocyanidate	Tabun	GA
Isopropyl methyl fosponofluoridate	Sarin	GB
Pinacolyl methyl fosponofluoridate	Soman	GD
Cyclohexyl methyl fosponofluoridate	Sikloheksil sarin	GF
o-Ethyl-S-(2-diisopropylamino-ethyl)-methyl fosponofluoridate	Vx	Vx
N,N-diethyl-2-(methyl-(2-methylpropoxy)phosphoryl)sulfanyethanamine	Rus Vx	RVx
<b>YAKICI AJANLAR</b>		
Bis(2-chloroethyl)sulfide	Sülfür mustard,	H, HD,
Tris(2-chloroethyl)amine	Nitrojen mustard	HN-3
2-Chlorovinyl dichloroarsine	Levisit	L
<b>AKCIĞER İRRİTANLARI</b>		
Carbonyl chloride	Fosgen	CG
Trichloromethyl chloroformate	Difosgen	DP
Chlorine	Klor	CL
Chloropicrin	Klorpikrin	PS

<b>SİSTEMİK ZEHİRLER</b>		
Hidrojen siyanür	Hidrosiyanik asit (prussik asit)	AC
Siyanojen klorür		CK
<b>KAPASİTE BOZUCU AJANLAR</b>		
3-Quinuclidinyl benzilate	QNB	BZ
Liserjik asit dietilamid	LSD	LSD
<b>KARGAŞA KONTROL AJANLARI</b>		
2-Chloro-1-phenylethanone		CN
2-Chlorobenzalmalononitrile		CS
Dibenz (b,f)-1,4-oksazepin		CR
10-Chloro-5,10-dihydrophenarsazine		DM

#### **2.4. YAKICI AJANLAR**

Vezikanlar olarak da bilinen yakıcı ajanlar kimyasal savaş ajanları arasında günümüzde en yaygınlarıdır. Bu lipofilik maddeler solunum ve cilde doğrudan temasla organizma içerisine girerler. Gözleri, solunum sistemini ve cildi öncelikle tahriş ederek sonrasında da hücresel hasarla etkilerler. Bu kimyasal savaş ajanlarının yakıcı ajan ismini almalarındaki başlıca neden ve karakteristik özellikleri, vücut yüzeyinde ciddi yanıklar tarzında hayatı tehdit edici ve geniş deri yanıklarına neden olmaları ve ciltte bül formasyonu oluşturmalarıdır. Etkilerini gözlerde, mukoz membranlarda, akciğerlerde, ciltte ve kemik iliğinde gösterirler. İnhalasyonla alınmaları halinde trakeadan alveollere kadar tüm solunum yollarına hasar verirlerken, yutuldukları takdirde kusma, ishal gibi gastrointestinal semptomlara neden olurlar. Yakıcı ajanların dış ortam şartlarına dayanıklı olabilmesi için içeriklerine eklenen kimyasal maddeler, bu ajanların çevreyi, taşıtları ve etraftaki diğer tüm malzemeleri kontamine edebilmesini kolaylaştırır (5).

Yakıcı ajanlar veya bül yapıcı ajanlar kategorisinin en önemli olanı mustard olmasının yanında bu kategori içerisinde Lewisit (L) ve Fosgen Oksim (CX)' de yer almaktadır. Lewisit, bir kısmı sülfür mustard ile karıştırılmış halde olmak üzere, çok miktarda silah haline getirilmiş ve 2. Dünya Savaşında Japonlar tarafından kullanılmıştır. Sülfür mustard ve Lewisit sıvı veya aerosol şeklinde ortama yayılan

ve günlerce bulunduğu ortamda kalabilen, persistan ajanlar olarak kabul edilen tehlikeli vezikanlardır (27, 28).

Genel olarak mustardın iki tipi mevcuttur: “Sülfür mustard” (H) ve “Nitrojen mustard” (HN). HD simgesiyle gösterilen, “distile edilmiş mustard” dır. HD, yaklaşık % 96 saflıkta sülfür içerirken; H, % 70-80 saflıktadır (29). Sülfür Mustard, çok reaktif olan ve temas ettiği ciltte bül oluşturmanın yanı sıra solunum sistemi ve gözlerde komplikasyonlara neden olan yakıcı bir ajandır. Nitrojen mustard ise, merkezi atomu nitrojen olan ve kanser tedavisinde kullanılan bir mustard bileşiğidir. Nitrojen mustardın HN1, HN2 ve HN3 olmak üzere 3 farklı formu bulunmaktadır. HN1, HN2 ve HN3 nitrojen mustardın askeri kodlarıdır. HN3 İkinci Dünya Savaşı sırasında silah haline getirilmiştir. Hayvan deneylerinde intravenöz uygulama sonrası santral sinir sistemini etkileyerek konvülziyonlara neden olduğu izlenmiştir (3, 30).

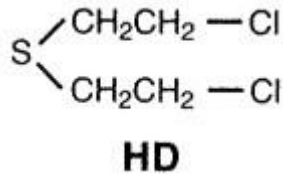
Nitrojen mustard ilk kez 1930 larda sentezlenmiş olup 2. Dünya Savaşı sırasında silah haline getirilmiş fakat harp alanında kullanılmamıştır. Özellikleri sülfür mustard ile benzer olsa bile depolamaya uygun olmadığından silah olarak kullanılmaya elverişli değildir (31). Savaş ajanı olarak Fosgen oksim kullanımı da görülmemiştir. Aslında fosgen oksim gerçek bir vezikan değildir. Çünkü mustard ve lewisitin aksine oluşturduğu deri lezyonları blister tarzında değil, ürtiker benzeri solid lezyonlardır (3).

Yakıcı ajanlar özellikle düşmanın savaşma kabiliyetini azaltmak amacıyla kullanılır. Çünkü bu ajanlar savaş alanında düşmanı yaralar, onları koruyucu kıyafet giyinmeye zorlayarak manevra kabiliyetlerini düşürürler. Bununla beraber vezikanlara ciddi derecede maruz kalınması kurbanlar için ölümcül de olabilmektedir. Ayrıca, bu kimyasal ajanlara maruz kalan çok sayıda yaralı, sağlık teşkillerine başvurduğunda, tedavide kullanılacak mevcut kaynakların hızla tüketilmesi ve sağlık teşkillerinde belli bir limitte bulunan imkânların aşılması sağlık sisteminde kilitlenmeye neden olabilecektir (5, 32).

#### **2.4.1. Sülfür Mustard**

Bir kimyasal silahın fiziksel özellikleri ve formülasyonu tehdidin belirlenmesinde önemlidir. Bu kapsamda sülfür mustard (SM, U.S. kodu HD, kimyasal adıyla 2,2'-dichlorodiethyl sulfide) kimyasal silah olarak kullanılan en güçlü yakıcı ajanlardan birisidir. Ani ölümlere sebep olabilen sinir ajanlarından farklı

olarak, mustard gazı uzun süreli etkiler gösterir ve öldürmekten çok insanlar üzerinde kapasite bozucu ve kronik yaralanmalar oluşturuca etkiye sahiptir. Sentezinin kolay olması nedeniyle büyük miktarlarda mustard gazı savaşta kullanılabilir hale çok kısa sürede getirilebilir (6).



**Şekil 2.1.** Sülfür mustard'ın kimyasal yapısı 2,2'-diklorodietil sülfür (bis-2-kloroetil sülfür) şeklindedir.

SM, ciltte blister oluşumuna neden olan bir madde olup, kimyasal yapı itibariyle 2,2'-diklorodietil sülfür (bis-(2-kloroetil) sülfür) şeklindedir (Şekil 2.1) ve bu yapıda birçok biyolojik molekülle reaksiyona girerek doku hasarına neden olmaktadır (6). SM'in perkutan emilimi sonrası relatif olarak daha az ölüme sebep olmasının yanı sıra mustard yaralıları, sağlık merkezlerinde daha çok aşırı yüklemeye sebep olurlar.

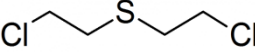
#### 2.4.1.1.Fizikokimyasal Özellikleri

SM'nin silah olarak kullanılmasındaki en önemli etkenlerin başında persistanlık özelliği gelir. Persistanlık (kalıcılık), havada veya yerde ajanın toksisitesini devam ettirdiği zaman periyodu olup ajanın 24 saatten daha fazla zayıf verebilmesi persistan; 10-15 dk sonra etkinliğini kaybetmesi non-persistan olduğunu göstermektedir. SM'nin sıvı formu oldukça toksik ve persistan olup 4 yıla kadar bulunduğu yerde kalabilmektedir. SM'nin, özellikle kuru ve soğuk havalarda kalıcılığı artmaktadır. Havaya karışan aerosol form inhalasyon ve cilt maruziyeti ile etkili olabilir. Zamanla buharlaşma ile çevreye ve insan sağlığına zarar verebilir (33).

Saf SM şeffaf, kokusuz ve yağlı bir sıvıdır. Kalıcılığını arttırmak ve silah olarak kullanabilmek için yapılan kimyasal karışımlar sonrası sarımsak kokulu ve koyu renkli bir hal alır. SM, yüksek molekül ağırlıklı kimyasallarla karıştırıldığında partikül çapı artarak buharlaşma oranı azalır. Bu kimyasallar persistansını arttırmakta ve dekontaminasyonu zorlaştırmaktadır. Bu nedenle SM kullanıldığı bölgede günlerce tehdit oluşturmakta ve bu da gecikmiş yaralıların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (27, 28).

SM'nin 40 °C'deki uçuculuğu, 0 °C'ye göre yaklaşık 40 kat daha fazladır. Bu yüzden daha yüksek ısılarda kalıcılığı azalmasına rağmen özellikle solunumsal etkilenim daha fazla artar. Siyanür ve sarin gibi kimyasal savaş ajanları özellikle solunum sisteminde çok hızlı etki gösterirken; SM, bir latent dönemden sonra etkisini gösterir. Bu nedenle SM'nin cilt maruziyetinde blister ve ödematöz etkisi temastan saatler sonra oluşur (3). SM'nin fizikokimyasal özellikleri çizelge 2.3'de yer almaktadır.

**Çizelge 2.3.** Sülfür Mustard'ın fizikokimyasal özellikleri (5, 6, 34).

Özellik	Sülfür Mustard
Görünüm	Renksizden açık sarıya kadar olup, renksiz bir buharı vardır.
Kimyasal formül	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> S
Kimyasal yapısı	
Moleküler ağırlığı	159.08
Özgül ağırlığı (g/cm <sup>3</sup> )	1.27 (20 °C, sıvı); 1.34 (13 °C, katı)
Buhar yoğunluğu (kg/m <sup>3</sup> )	5.5 (atmosfer= 1.275)
Erime noktası	14.5 °C
Kaynama noktası	215 - 217 °C
Buhar basıncı (25 °C)	0.11 mm Hg
Uçuculuk (mg/m <sup>3</sup> )	92 (0°C) 610 (20°C) 910 (25°C) 2860 (40°C)

#### 2.4.1.2. Kimyasal Özellikleri

SM'nin kimyasal özelliklerini molekül yapısının ortasında yer alan sülfür atomu belirler. Bu sülfür atomu serbest elektron çiftine sahiptir ve nükleofilik yapıdadır. Genel olarak negatif yüklü veya negatif yük yoğunluğu bulunduran iyon veya moleküllere nükleofil adı verilir. Nükleofilik moleküller pozitif yük kazanma eğilimindedirler. SM'nin sulfon ve sülfoksit formlarının (sulfonyum tuzlarının)

oluşumunda merkez atomun nükleofilik saldırıya uğraması “Oksidasyon” olarak bilinen bir reaksiyondur (34).

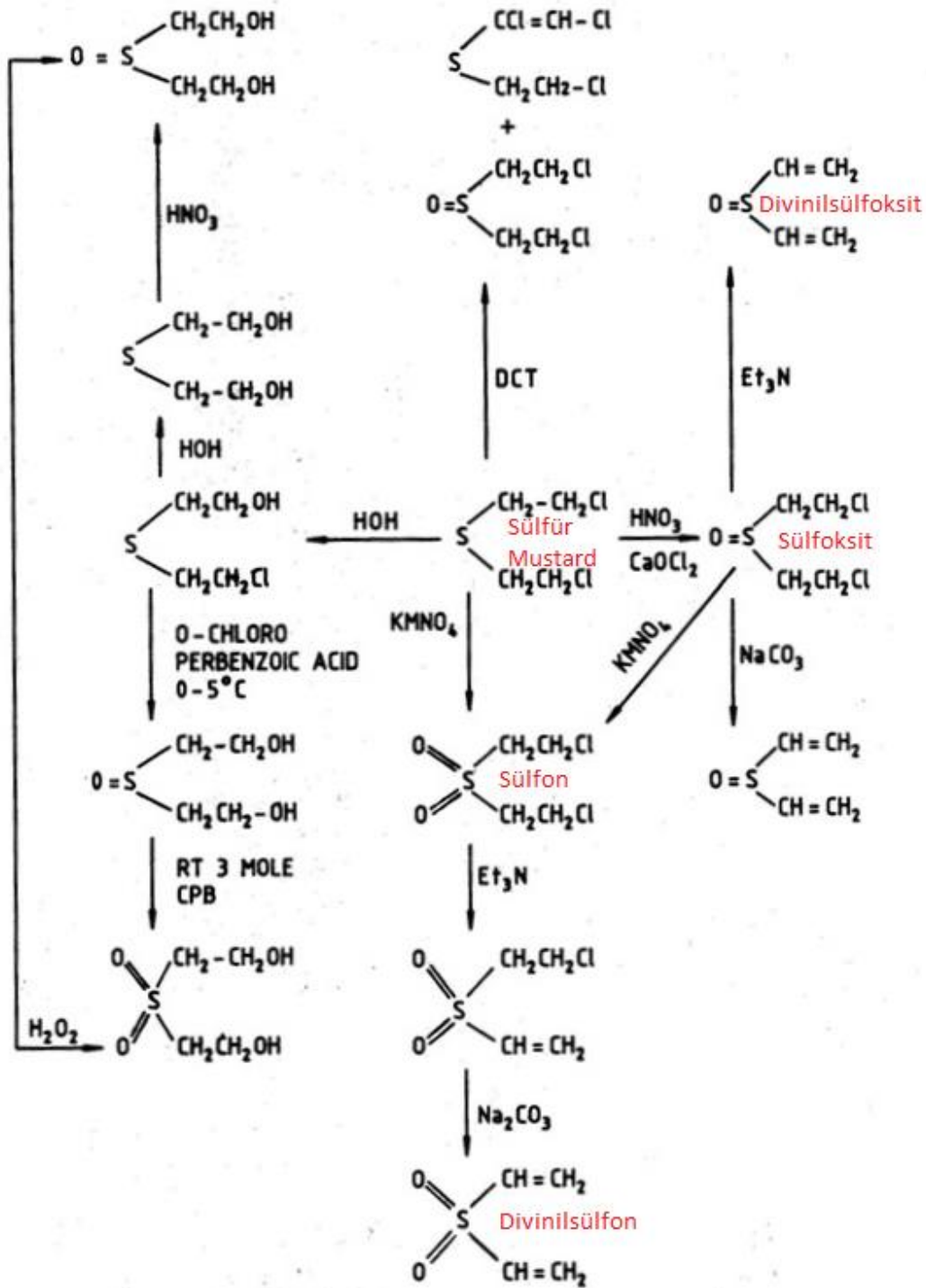
### **Oksidasyon:**

Oksitleyici moleküller genelde oksijence zengindirler ve karşı molekülden elektron çararlar. Ayrıca bunlar radikalit (eşleşmemiş elektronu bulunan) veya iyonik olabilirler. Potasyum permanganat ( $KMNO_4$ ), nitrik asit ( $HNO_3$ ), kalsiyum hipoklorit ( $CaOCl_2$ ) ve sodyum karbonat ( $Na_2CO_3$ ) gibi oksijenden zengin oksitleyiciler olmasının yanında seryum ( $Ce^{+4}$ ) veya kobalt ( $Co^{+3}$ ) gibi oksijen atomu içermeyen güçlü oksitleyici ajanlar da vardır. Bu reaktif moleküller oksijence zengin radikal (OH gibi) veya yüklü iyonlar verirler. Bununla birlikte havadaki oksidasyon “·OH” radikalleri ile olur. Sülfür mustard molekülünün  $[(ClCH_2CH_2)_2S]$  ise elektronca en zengin yeri ortada yer alan sülfür atomu ve ikinci elektronca zengin bölgesi yan zincirindeki Cl atomlarıdır. Bu kapsamda SM, havadaki ·OH radikalleri veya diğer oksitleyici ajanlar tarafından ortak elektron kullanımı yoluyla reaksiyona girerek oksitlenir ve bazı ara basamakları takiben sulfonyum tuzlarını oluşturur (Şekil 2.2).

Tiyoeterler gibi SM, okside edici ajanlar tarafından bir oksijen atomu alıp sulfoksit veya iki oksijen atomu alıp sulfon benzeri kimyasallara dönüşmeye eğilimlidir (34). SM'nin sulfoksit formu  $[OS(CH_2CH_2Cl)_2]$ , sulfon formundan  $[O_2S(CH_2CH_2Cl)_2]$  çok daha yavaş reaksiyonlara girer. Bu nedenle SM'nin, oksidasyon sonucu oluşan sulfoksit formu toksik değildir. Aksine sulfon formu nükleofilik saldırıdan sorumlu tutulan bir moleküldür ve tıpkı SM'nin kendisi gibi yakıcı olma özelliğini sürdüren toksik bir yapıdadır (35).

N,N-Dichloro-4-methylbenzenesulphonamide (Dichloramine-T), sıfırın altındaki derecelerde bile SM ile hızla reaksiyona girer. Sonuçta p-toluene sulphonamide, 2-haloethyl 1-chloro-2-halovinyl sulphide ve hydrogen chloride oluşur (34).





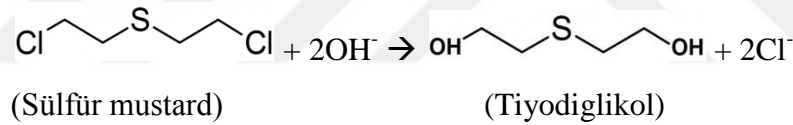
Şekil 2.2. Sülfür Mustard'ın oksidasyon reaksiyonları, sülfon ve sülfoksit türevlerinin oluşumu (34).

**Hidroliz:**

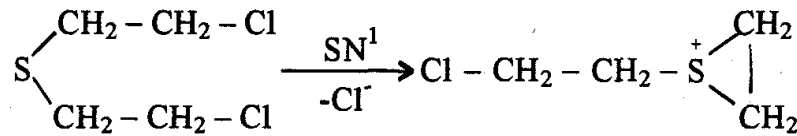
SM kimyasının önemi, hidroliz reaksiyonuyla kendisini göstermektedir. Bir maddenin hidrolizi denince o maddenin H-O-H ile tepkimesi anlamına gelir. Bu tepkime genel olarak,



Daha önce de bahsedildiği gibi negatif yüklü veya negatif yük yoğunluğu bulunduran iyon veya moleküllere nükleofil adı verilmektedir. Nükleofilik moleküller pozitif yük kazanma eğilimindedirler. H-O-H nükleofilik özellikle olmakla beraber OH<sup>-</sup> çok daha güçlü nükleofildir ve SM (Cl-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Cl) yapısından klor (Cl) atomlarını kopartarak yerine kendisi geçer. Bu klor atomlarının OH<sup>-</sup> iyonlarıyla yer değiştirmesi kimya alanında, SN<sup>1</sup> veya SN<sup>2</sup> mekanizması adı verilen nükleofilik yer değiştirme tepkimesidir. Bu tepkime sonucunda SM'in önemli bir metaboliti olan tiyodiglikol oluşur:



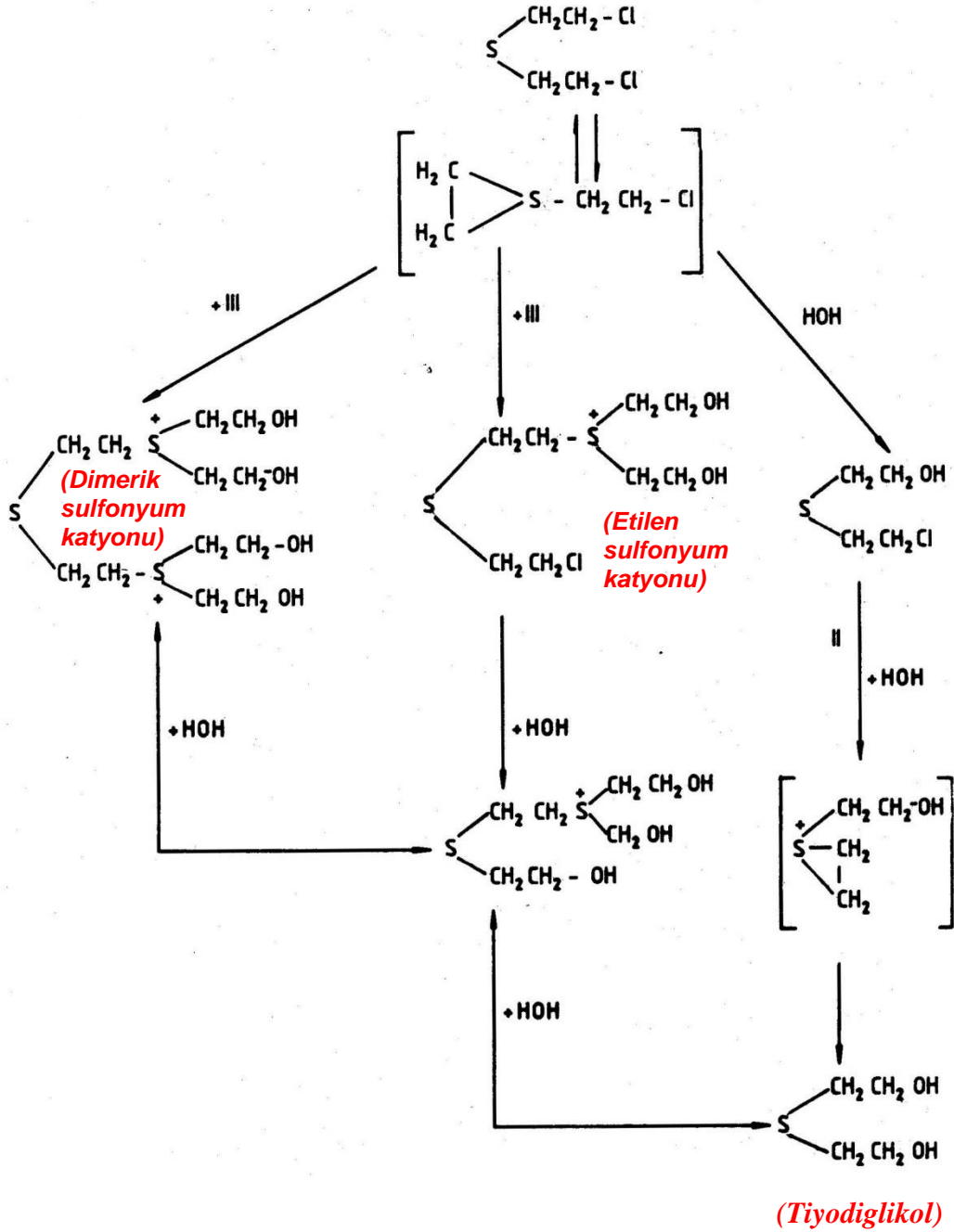
Tiyodiglikol oluşumunda; SM'in hidroliz reaksiyonundaki ilk basamakta transiyent siklik sulfonyum katyonu meydana gelir (Şekil 2.3). Sulfonyum iyonu oldukça kararsızdır ve SM'nin son derece reaktif bir ara ürünüdür ve daha sonra çevresel koşullara bağlı reaksiyonlara katılmaya devam eder.



**Şekil 2.3.** Çok yüksek derecede reaktif bir ara ürün olan siklik sulfonyum katyonu oluşumu.

Ortamda herhangi bir organik çözücünün bulunmadığı, yüksek konsantrasyonlarda substrat varlığında, ilk ürünler olan bir dimerik sulfonyum

katyonu ve etilen sulfonyum katyonu sulu ortamda tepkimeye girer ve R-S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH formu, son ürün olarak da tiyodiglikol meydana gelir (Şekil 2.4) (34).



Şekil 2.4. Sülfür Mustard'ın hidroliz reaksiyonları ve tiyodiglikol oluşumu (34).

### 2.4.1.3 Sülfür Mustard'ın Önemli Fonksiyonel Moleküllerle Biyokimyasal Reaksiyonları

**2.4.1.3.1. Sülfidril grubuyla (-SH):** Sülfür mustard, sistein gibi -SH grubu içeren faktörlerle çok yüksek bir afinite ile reaksiyona girer. Uygun koşullar altında bir molekül sülfür mustard, -SH (sülfidril) grubu içeren iki molekülü alkile eder ve birbirine bağlayabilir (Örneğin SM türevi olan Bis-S-sisteinil gibi). Sülfidril grubu içeren bu reaksiyon ürünleri fizyolojik pH ve ısılarda oldukça stabildir (34).

**2.4.1.3.2. Karboksil grubuyla:** Sülfür mustard, karboksil gruplarını, sabunlaştırılabilir tiyodiglikol esteri formuna alkile eder. Sabunlaşma temelde bir çeşit hidroliz reaksiyonudur ve esterlerin hidrolizi akla gelmektedir. Esterlerin su olarak alkol ve asitlere ayrışması reaksiyonudur. Bu tepkimenin gerçekleşmesi için sodyum hidroksit gibi esterleri parçalayabilen özel enzimler gerekmektedir. Karboksil gruplarının ara enerji metabolizmasındaki metabolitler ve aminoasitler içerisinde yer alması nedeniyle bu reaksiyon biyokimyasal açıdan da çok önemlidir (34).

**2.4.1.3.3. Organik ve İnorganik fosfatlarla:** SM'nin fosfatlarla olan reaksiyonları ve buradaki biyolojik rolü konusunda günümüzde yeterli çalışma gerçekleştirilmemiştir. Ditiyofosfat iyonu hem inorganik fosfatlar hem de diğer tüm bileşikler arasında en yüksek oranda yarışmalı faktördür. Fosfoinozitol metabolizmasının ürünleri, deoksinükleozid difosfat ve trifosfatlar, nükleozid, nükleik asit prekürsörleri ve enerji taşıyıcı substratlar gibi biyokimyasal önemi olan fosfor içeren bileşiklerle ilgili yeterli bilgi mevcut değildir (34).

**2.4.1.3.4. Pürin ve pirimidin bazları ile reaksiyonu:** SM, nötral pH'da nükleik asit, nükleotit ve nükleozidler içerisinde yer alan özellikle adenin N-1 ile guanin N-7 olmak üzere pürin ve pirimidin bazlarını alkiler (35). Alkilasyon, bir hidrokarbon grubunun bir kimyasal bileşiğe girmesi reaksiyonudur. Hidrokarbonlar, bir veya daha fazla hidrojen atomuna bağlı bir karbon atomuna sahip moleküllerdir. Alkil grupları, yaygın organik moleküllerdendir. Bunlar, metil grupları gibi tek karbonlu

bileşiklerden uzun hidrokarbon zincirlerine kadar gidebilir. Dolayısıyla sadece bir karbon ile alkilasyon, metilasyon olarak da bilinir. Fizyolojik pH ve sıcaklıkta, SM ile DNA'nın etkileşimi N<sup>9</sup>-glikozidik bağdan kopmasıyla kararsız yapıdaki 7-alkil-G ve 3-alkil-A alkilenmiş pürinleri spontan oluşurlar ve bu, apürinik bölge oluşumuna neden olur (34). SM'nin DNA ile etkileşiminden Guanin N-2 ve O-6 ve adenin N-6 ile reaksiyonları da raporlanmıştır (35).

**2.4.1.3.5. RNA ile reaksiyonu:** SM'nin RNA ile reaksiyonunda alkilenmiş RNA'nın spektral ve fizikokimyasal özelliklerini gösteren kromatografik profillerinin karşılaştırılması yoluyla başlıca alkilasyon ürünü olarak 7-alkil-guanin tanımlanmıştır (34). Bazı çalışmalarda, poli A, poli G ve poli C gibi alkilenmiş homoribonükleotidlerinin asit hidroliziyle elde edilen ürünleri karşılaştırılmıştır (36). SM ile alkilenmiş RNA'nın oldukça stabil olduğu ve tüm guanin alkilasyonunun yüzde 25'inden düşük kaldığı gözlenmiştir (34). SM'nin poli U içerisinde terminal fosfomonoesterin alkilasyonu ile polipeptit sentezinin inaktivasyonuna neden olduğu ve bakterideki transkripsiyonda  $\beta$ -galaktozidaz'ın, translasyona yaklaşık 5 kat daha duyarlı hale geldiği raporlanmıştır. Bununla birlikte, RNA'daki oluşan çapraz bağlanmanın daha az biyolojik etkiye sahip olduğu varsayılabilir (34).

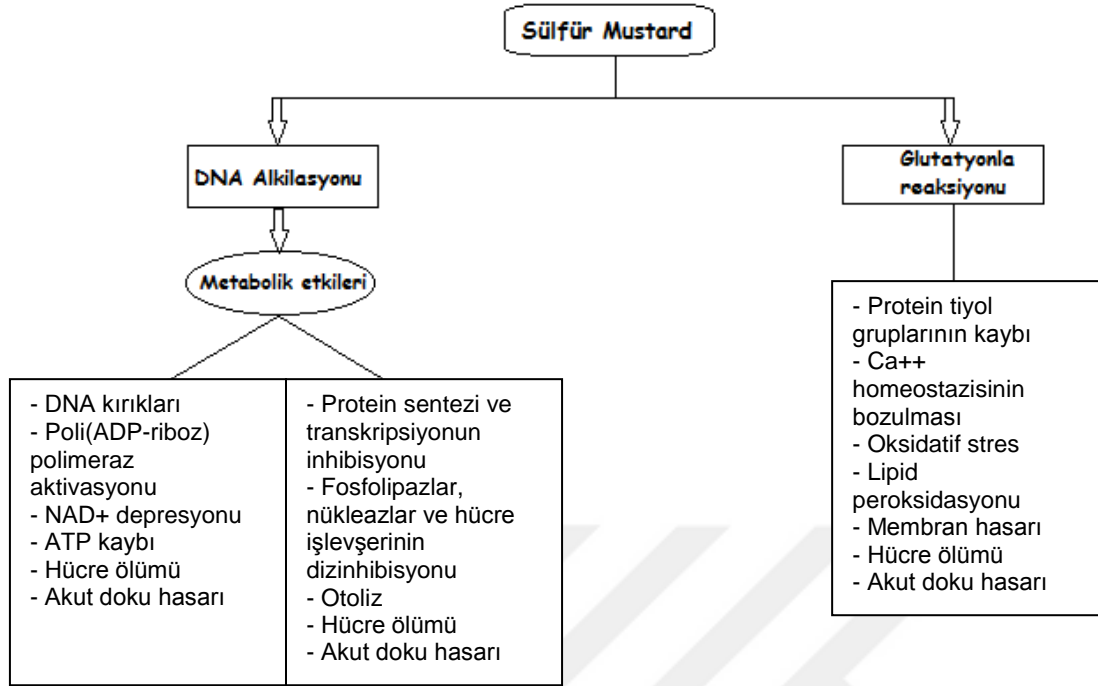
**2.4.1.3.6. Proteinlerle reaksiyonu:** Proteinlerin karboksil, imidazol, tiyometil ve sülfidril grupları pH 6-8 arasında negatif yüklü olup SM ile reaksiyona girme eğilimindedir. SM ile esterleştirilmiş karboksil gruplarının sayısı pH 6'da proteine bağlanan toplam SM kalıntılarının sayısına eşit olduğu için SM'nin, özellikle proteinlerin karboksil gruplarıyla etkileştiği düşünülmektedir. Başka bir çalışmada ise pH 7,5'da serum albuminin ve oksihemoglobinin karboksil gruplarının SM tarafından büyük oranda esterleştirildiği izlenmiştir. Bu nedenle, proteinlerdeki -SH gruplarının, sistein veya glutatyon gibi serbest amino asitlere kıyasla önemli ölçüde daha az reaktif olduğu sonucuna varılmış, SM sülfonunun -SH grupları ile daha reaktif olduğu bildirilmiştir (34).

Fizyolojik koşullarda SM kalıntıları proteinlerden kolayca ayrılamazlar. SM ile etkilenmiş proteinler alkalın hidroliz ile iyileşmekte fakat hücreler bu tür hasarları

tolere edememektedir. Bir çalışmada korneada SM ile etkilenmiş kollajenin alkalın hidroliz ile kısmen doğal özelliklerine geri döndüğü görülmüştür (34).

#### **2.4.1.4. Biyolojik Etkileri**

Solunum yoluna olan zararlı etkileri ve yakıcı etkisi dışında, SM bir mutajen ve potansiyel bir kanserojendir. SM, kimyasal özellikleri nedeniyle proteinler, RNA ve fosfolipitler ile reaksiyona girer fakat en önemli sitotoksik etkisi DNA alkilasyonu ve DNA sarmalı içinde çapraz bağların oluşumudur. Düşük doz maruziyette bile, muhtemelen DNA sarmalı içinde çapraz bağlar meydana getirerek, özellikle geç G1 veya S fazı sırasında bölünen hücreleri öldürür. Yüksek dozlarda ise farklı mekanizmalar yoluyla kornea, mukoz membranlar ve ciltte akut hasara neden olan ani hücre ölümü meydana getirir. Bu mekanizmalardan biri NAD depresyonudur. Sülfür veya nitrojen mustard etkisiyle DNA zincir kırıklarının oluşması sonucu Poli (ADP-riboz) polimeraz enzimi aktive olur ve bu enzim, hücrel NAD havuzlarını hızla tüketir. Sonuçta, hücre içi ATP seviyelerinin düşmesi, akut hücre ölümüne neden olabilir. Diğer bir mekanizma ise, glutatyon (GSH) gibi sülfhidril içeren protein ve peptitlerin inaktivasyonudur. Bu hücrel hasara neden olan mekanizma, hücre içinde redoks oluşumuna, lipit peroksidasyonuna, membran hasarına, kalsiyum dengesizliğine ve sonuçta hücre ölümüne yol açar (Şekil 2.5) (3, 35).



**Şekil 2.5.** Sülfür mustard'ın doku hasarına sebep olduğu varsayılan biyolojik etkileri

#### 2.4.1.5. Klinik Etkileri

Sülfür mustard maruziyeti sonrası klinik belirti ve bulgular içerisinde, 2-6 saatlik asemptomatik latent periyod sonrasında ciltte eritem ve blisterler, solunum yolunda hasar ve göz lezyonları gözlenir (4). SM maruziyetinin akut semptomları en sık gözlerde, ciltte ve bronşiyal traktusta izlenir. Bu dönemde hastalarda göz, boğaz, akciğer ve gastrointestinal bulgular ortaya çıkmaktadır. Ciltte bül formasyonunun görülmeye başlaması ise 4 saat sonrasına kadar uzamaktadır (37). Cilt bulguları ve yanık lezyonları diğer kimyasalların maruziyetiyle benzer olduğu için tanı aşamasında bazı özel tetkiklere ihtiyaç duyulur. Özellikle latent periyotta olmak üzere biyolojik matrikslerde SM maruziyetini gösterebilecek en duyarlı yöntem biyobelirteçlerinin analizidir. Kan ve idrar gibi biyomedikal örneklerde biyolojik belirteçlerin analizinin yapılması bu kimyasal savaş ajanının kullanılıp kullanılmadığına ilişkin kanıtların sağlanabilmesi ve tedavi öncesinde tanısını koyabilmek açısından çok değerlidir.

**Göz bulguları:** Hemen hemen tüm hastalar gözlerde ağrı, yanma, hiperlakrimasyon ve fotofobi tanımlarlar. Başlangıç semptomları çok şiddetli olmaktadır. Göz kapakları öylesine ödemlidir ki, blefarospazm ve temporal körlüğe

neden olur. Pürülan konjunktivitli yaralılarda kornea opasitesi tek başına veya erozyonla beraber ortaya çıkabilmektedir. Ancak bu çoğunlukla görme bozukluğuyla sonuçlanmaz. Hastaların büyük çoğunluğunda opasiteler kalıcı olmaktadır (37).

SM yaralılarında sık görülen kronik bir göz bulgusu 15-20 yıl sonra ortaya çıkan geç başlangıçlı ülseratif keratopatidir (38). Ülseratif keratopati gibi latent başlangıçlı göz hastalığı ilk olarak Birinci Dünya Savaşı yaralılarında izlendi. Bu hastalığın belirtileri hızlı başlangıçlı fotofobi, gözlerde yaşarma ve değişik derecelerde görme kaybı olup patolojisi henüz netlik kazanmamıştır, ancak temelinde SM'nin korneal proteinlerde değişikliğe yol açtığı otoimmün bir olay olduğu varsayılmaktadır. İskemi alanındaki kornea ve konjunktiva incelendiğinde limbus bölgesinde vaskülarizasyon ve skar oluşumu izlenmektedir. Limbal kök hücrelerin kaybı sonucu kornea için yeterli miktarda epitel hücrelerinin üretilme kabiliyeti azalır. Oluşan korneal hasar enfeksiyon, skar oluşumu ve perforasyonla giden ilerleyici yıkıcı bir keratit olarak devam eder. Ayrıca konjunktival hücreler yoğun şekilde korneal defektin içerisine doğru çoğalarak skarlaşmaya neden olurlar. Kornea bölgesinin neovaskülarizasyonu konjunktival hücrelerin o bölgede yayılımı ile karakterizedir. Sonuçta, gözdeki defekt limbal kök hücre hasarının bir sonucudur (39).

Cilt bulguları: Cilt bulguları tipik olarak tüm yaralılarda görülür. Ciltteki eritemler çoğunlukla 4. saatte belirgin hale gelmektedir (40). Sülfür mustard temasında blister oluşumu en karakteristik cilt bulgusu olmakla beraber kronik süreçte de nekroz ve blister oluşumunun altı çizilerek belirtilmelidir. Ayrıca kaşıntılı kuru cilt lezyonları, deskuamasyonlar ve yanık lezyonları sık görülür (41). Lezyonlar mekanik travmayla agreve olacak hassasiyettedirler ve bu lezyonların fizyopatolojisi henüz netlik kazanmamıştır. Bu lezyonlar aynı zamanda ürtiker, cilt atrofisi ve saç dökülmesi gibi değişikliklerle karakterize kronik egzema ve seboreik dermatit gelişimine de açıktırlar (39). Kontrol edilemeyen fibroblastik aktivite nedeniyle skarlaşma ve bu skar dokusunun sebep olduğu kontraktür ve deformiteler bazı vakalarda gözlenmiştir. Kapiller hemanjiyom ve telenjektaziler izlenen vasküler değişikliklerdir. Hiperpigmentasyon ve daha az oranda hipopigmentasyonun birbirine yakın alanlarda gelişmesi karakteristik tablodur. Bu pigmentasyon değişiklikleri o bölgedeki melanosit hasarının derecesine bağlı olarak değişiklik



göstermektedir (42). Çok yüksek doz SM maruziyetinde hipopigmentasyon görülmesi daha olasıdır. Uzayan sürede diğer deri bulguları yerleşirken ciltteki kuruluk ve kaşıntı daha da kötüye gider. Özellikle yanık lezyonlarına yakın bölgelerde deri kanseri gelişiminin artmış olduğu yayınlarda ifade edilmekle beraber kanser gelişiminin çok uzun yıllarda gerçekleşmesi nedeniyle bu konuda daha uzun süreli araştırmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır (39).

Boğaz: Ses kısıklığı, boğaz ağrısı ve yutma güçlüğü akut dönemin sık görülen bulgularındandır. Bunun yanısıra boğazda inflamasyon, obliteratif nekroz daha az olarak görülebilir.

Solunum sistemi: Öksürük, balgam ve kanlı balgam gibi bulgular görülebilir. Yaralıların küçük bir kısmında kan gazlarında değişiklik olmadığı izlenmiştir. Genellikle yaralılarda alkalozis, hipoksi ve nadiren asidozis görülmüştür. Çoğu yaralının oskültasyonu normal olarak değerlendirilmiştir. Bronşiyal traktusun iyileşmesi boğaz lezyonlarının iyileşmesinden daha hızlı olmaktadır (37).

SM, solunum sisteminde kalıcı akciğer hasarı oluşturabilir. SM yaralılarında geç ortaya çıkan akciğer fonksiyonlarının bozulması, ölümün başlıca nedenidir. Khateri ve ark.nın 2003 yılında yayınladıkları bir kohort çalışmasında 34000 hastanın % 42.5'inde akciğer hasarı saptanmıştır. Bu hastaların başlıca semptomları kronik öksürük, dispne ve yoğun balgamdır. Ayrıca, göğüs ağrısı, gastroözefageal reflü ve hemoptizi izlenmiştir. Emad ve Rezaian'ın 1997 yılında yaptıkları çalışmada 197 hastanın % 59'unda kronik persistan bronşit saptanmıştır (39).

SM maruziyetiyle ilişkili astım, amfizem, kronik bronşit, pulmoner fibrozis ve bronşiyolit gibi çok sayıda solunum sistemi patolojisi sayılır. Günümüzde, açık akciğer biyopsileri, bronkoalveoler lavaj ve yüksek rezolüsyonlu bilgisayarlı tomografiler aracılığıyla yapılan çalışmalar ışığında bronşiyolitis obliteransın solunum sistemindeki hasarın başlıca nedeni olduğu düşünülmektedir. Bronşiyolitis obliterans, öncelikle bronşiyoller olmak üzere kronik skarlaşma süreci içinde, ilerleyici doku yıkımı sonucu bronşiektazi ve obstruktif akciğer hasarıyla kendini gösteren bir patolojidir (39).

SM'nin üst solunum yollarına doğrudan etkisi, skarlaşma, fibrozis ve mukosilyer aktivitenin bozulmasıyla kendini gösterir. Sonuçta trake ve bronşlarda daralma görülür (39).

Akciğer dokusunun radyolojik incelemelerinde bronşiyollerin çevresinde çizgilenmeler, hava tuzakları ve hiperinflasyonla giden tıkayıcı havayolu hastalıklarına bağlı değişiklikler izlenmiştir. Genel olarak, FEV1 (forced expiratory volume in 1 s), FVC (forced vital capacity) ve bu ikisi arasındaki oranın azaldığı görülür (39).

Santral sinir sistemi: Tüm hastalarda apati (çevresine karşı ileri derecede ilgisiz, kayıtsız ve duyarsız kalma durumu) ve depresyon görülmektedir. İlk 2 hafta yaralılar uykulu bir haldedirler (37). Hafif ve orta düzeyde EEG değişiklikleri izlenebilir. En çok asenkronize ve yavaş dalgalar (teta) izlenir. EEG bulguları 6 hafta sonra normale döner (37).

Yaralılarda 38-40 °C ye varan ateş görülebilir. Genellikle konservatif tedaviyle düzelmekte fakat bazen 3-4 hafta ateş sürebilmektedir (37).

Lökositöz çok sık gözlenen bir laboratuvar bulgusudur. Trombosit sayımı çoğunlukla yükselmiş olmakla birlikte bazı hastalarda düşük veya normal izlenebilir (37).

Yaralıların cildinde en yaygın olarak görülen bakteriyel enfeksiyonlar arasında *Staphylococcus aureus* başta olmak üzere sırasıyla *Streptococcus*, *Enterobacter* ve *Proteus* yer alır. Balgamda ise *Acinetobacter*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus* ve *Moraxella* izole edilebilir (37).

SM'nin DNA'yı etkileyen potansiyel bir alkilasyon ajanı olması onun kanser gelişimini tetikleyeceği beklentisini doğurmaktadır. Laboratuvarlarda SM ile çalışan personelde, sık ve küçük dozlarda alınması nedeniyle üst solunum yolu ve akciğer kanserleri görülmüştür. Bu kapsamda, SM, Uluslararası Kanser Araştırmaları Merkezi (International Agency for Research on Cancer) tarafından karsinojenik bileşik olarak tanımlanmıştır. Önceki çalışmalarda SM lezyonlarına komşu bölgelerde cilt kanserlerinin arttığı yönünde bulgular verilmesine rağmen İranlı 40 yaralıda yapılan çalışmalar böyle bir artış riskinin olmadığını göstermektedir (41). Bununla beraber, halen günümüzde SM'nin lösemi gibi sistemik kanserlere neden olduğuna dair bir kanıt bulunmamaktadır.

SM maruziyetinin akut ve kronik belirti ve bulguları ile tedavi protokolleri çizelge 2.4, 2.5 ve 2.6'da özetlenmiştir (43).

**Çizelge 2.4.** SM'ye bağlı akciğer hasarı

<b><u>Erken Belirti ve Bulgular</u></b>	<b><u>Geç Belirti ve Bulgular</u></b>	<b><u>Akut tedavi</u></b>	<b><u>Kronik bulguların tedavisi</u></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ölüm</li> <li>• Ses kısıklığı</li> <li>• Dispne</li> <li>• Solunum epitel hücrelerinin nekrozu (yüksek dozda)</li> <li>• Hipoksi, metabolik asidoz</li> <li>• Öksürük, boğulma hissi ve bronkospazm</li> <li>• Akciğer ödemi</li> <li>• Takipne</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Akciğerlerde fibrosis ve total akciğer kapasitesinin azalması</li> <li>• Akciğer infeksiyonları (Tüberküloz vb.)</li> <li>• Hava yollarında daralmayla seyreden bronşiektazi, amfizem ve kronik bronşit hastalıklarının gelişimi</li> <li>• Akciğer kanserinin insidansında artış</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antibiyotikler</li> <li>• İzotonik salin solüsyonu ile solunum yolunun lavajı</li> <li>• Laringospazm gibi üst hava yolu obstrüksiyonu varsa trakeostomi</li> <li>• Şiddetli vakalarda mekanik ventilasyonla endotrakeal entübasyon</li> <li>• Muköz sekresyonların azaltılması amacıyla hidrasyon sağlanır</li> <li>• Siliyer aktivite azaldığı için mukolitik sekresyonların atılabilmesi amacıyla N-asetilsistein</li> <li>• Oksijen ile destekleyici tedavi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kronik inflamasyonu baskılamak amacıyla immünsüpresif tedavi</li> <li>• İnhale kortikosteroidler ve beta-2 agonistler</li> </ul>

Çizelge 2.5. SM'ye bağlı göz hasarı.

<b><u>Erken Belirti ve Bulgular</u></b>	<b><u>Geç Belirti ve Bulgular</u></b>	<b><u>Akut tedavi</u></b>	<b><u>Kronik bulguların tedavisi</u></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gözlerde yanma ve ağrı</li> <li>• Korneal abrazyon, ülserasyon ve perforasyon</li> <li>• Kuruluk</li> <li>• Görme kaybı</li> <li>• Fotofobi</li> <li>• Blefarospazm</li> <li>• Lakrimasyon artışı</li> <li>• Sekonder enfeksiyon</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kornea ve konjunktivada kronik vasküitle seyreden iskemi ve hemoraji</li> <li>• Korneal opasite, ülserasyon ve perforasyon</li> <li>• Korneal kalınlaşma ve erozyon</li> <li>• Limbal kök hücre kaybı</li> <li>• Uzayan yaşarma</li> <li>• Fotofobi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Yapay göz yaşı damlalarıyla günlük lubrikasyon ve irrigasyon sağlama</li> <li>• Göz içi basıncı kontrol altına almak amacıyla ve ağrıyı hafifletici antiglokoma ve/veya midriyatik damlalar</li> <li>• Okuler yıkama</li> <li>• Topikal antibiyotik ve kortikosteroidler</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Korneal transplantasyon</li> <li>• Aile yakınlarından limbal kök hücre transplantasyonu</li> <li>• Tarsorafi</li> <li>• Amniyotik membran transplantasyonu</li> </ul>

**Çizelge 2.6.** SM'ye bağlı cilt hasarı.

<b><u>Erken Belirti ve Bulgular</u></b>	<b><u>Geç Belirti ve Bulgular</u></b>	<b><u>Akut tedavi</u></b>	<b><u>Kronik bulguların tedavisi</u></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Koltuk altı, genital bölge, kasıklar ve dirseğin fleksör yüzü daha nemli olması nedeniyle en çok etkilenir</li> <li>• Yanma ve hassasiyet</li> <li>• Deskuamasyon</li> <li>• Ekimoz ve eritem</li> <li>• Çeşitli büyüklüklerde içi sıvı dolu büller</li> <li>• Hiper/hipopigmantasyon</li> <li>• Nekroz ve ülser</li> <li>• Pozitif nikolski bulgusu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atrofi</li> <li>• Kronik ürtiker</li> <li>• Ekzema</li> <li>• Keloidler</li> <li>• Kapiller hemanjiyomlar ve telenjektaziler</li> <li>• Kaşıntı</li> <li>• Lokal saç ve kıl kaybı</li> <li>• Vitiligo</li> <li>• Seboreik dermatit</li> <li>• Tinea versicolor</li> <li>• Psöriyazis</li> <li>• Melanositik nevüsler</li> <li>• Diskoid lupus eritematozus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gümüş sulfadiazin gibi topikal antibiyotikli kremler</li> <li>• RSDL gibi bir dekontaminant veya su ve nötral sabunla yıkama</li> <li>• 0.2-0.3 % kloramin-T solüsyonuyla dezenfeksiyon</li> <li>• Topikal steroid ve antiinflamatuvar ajanlar</li> <li>• Yüksek kalori ve proteinli diyet</li> <li>• Analjezik ve antihistaminikler</li> <li>• Çok büyük büllerin debrütmanı</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Güneşten koruyucu kremler</li> <li>• Nemlendirici kremler</li> <li>• Nonsteroidal ajanlar (aloe vera, kapsaisin, setirizin, doksepin, hidrosizin, fenol/mentol karışımı, pimekrolimus)</li> </ul>

#### 2.4.1.6. Tedavi ve Dekontaminasyonu

Sülfür mustard kimyasal savaş ajanına karşı yapılabilecek en etkin tedavi ciltten absorbe olmasını önleyebilecek bir ajanla hızlı dekontaminasyondur (44). Çünkü sülfür mustardın etkin bir antidotu yoktur. Cilt üzerinde ajana bağlanarak SM'nin ciltten absorpsiyonunu engelleyen pasif dekontaminantlar (fuller toprağı vb.) ve ajanla reaksiyona girip SM'yi detoksifiye eden aktif dekontaminantlar (RSDL vb.) günümüzde kullanılmaktadır.

Epidermisten daha aşağı inmeyen cilt hasarlarında hiç bir müdahale yapılmaksızın bir haftaya kadar lezyonların ağrısı geçmektedir. Hayvan deneyleri, mustard yaralanmalarında perkutan antiinflamatuvarların faydalı olduğunu göstermiştir. Özellikle kronik kaşıntıya yönelik tedavi, nemlendirici ve rahatlatıcı kremler ve oral yoldan alınan sistemik antihistaminikleri içermektedir (39). Yapılan çalışmalarda antiinflamatuvar ilaçlar, hücre içi radikal temizleyiciler, proteaz inhibitörleri ve poli (ADP-riboz) polimeraz kromozomal enzim inhibitörleri gibi çeşitli ilaçlar tek tek ya da kombine, sistemik veya topikal olarak kullanılmıştır. Casillas ve ark.nın çalışmasında istatistiksel olarak belirgin iyileşme saptadıkları 10 ürün raporlamışlardır. Bu rnler sırasıyla antiinflamatuvarlar: olvanil, octyl homovanillamide, retro olvanil, indometazin, hidrokortizon, 6 $\alpha$ -metilprednizolon, klorpromazin, niasinamid; antiproteazlar: peptit fosfonat ve temizleyici/şelatör dimerkaprol sayılabilir. Dachir ve ark.nın yaptığı bir çalışmada steroid ve nonsteroid kombinasyonunun (deksametazon ve diklofenak gibi) SM lezyonlarını istatistiksel olarak % 60-75 oranında iyileştirdiği gösterilmiştir. Oktenidin dihidroklorür, kimyasal yanıkların tedavisi için antiseptik ajan olarak kullanılabilir (21, 39). Yine bir vaka çalışmasında kazayla SM maruziyeti ile oluşan lezyona oktenidin solüsyonu ve poliheksametilen biguanid solüsyonu ile kombine yara pansumanı yapılmasının faydalı olduğu bildirilmiştir (40). Cilt bulgularının iyileşmesi maruziyetten sonra yaklaşık 2 ayda semptomatik tedaviyle gerçekleşebilir (40). Göz bulgularının tedavisinde oküler lubrikan damlalar ve gerekirse lokal immspresanlar kullanılabilir (39).

Kortikosteroidler, SM'nin yaptığı kronik akciğer hasarı tedavisinde etkili bulunmuşlardır. Çünkü birçok bilim adamı tarafından kortikosteroidlerin uzun süreli yan etkileri, SM'nin yaptığı doku hasarının şiddetlenmesine tercih edilmiştir. Beta agonistler ve antikolinerjiklerin, yapılan çalışmalarda hastaların % 50'sinde akciğer fonksiyonlarının düzelmesinde etkili olduğu grlmştir. Tedaviye yanıt alınamayan durumlarda interferon gama gibi immnmodlatrler bronşiyolitis obliterans tedavisinde kullanılabilir. Ayrıca makrolidler gibi antibiyotikler de tedavide yer alabilir (39). N-asetilsistein ve diklofenak sodyum semptomatik tedavide yer alabilirken; sitotoksisiteye neden olabilen ibuprofen kullanımından kaçınılması gerekir (40).

SM'a temastan çok kısa bir zaman sonra (2-3 dakika) penetre olduğu için doku hasarı gelişmeye başlar fakat SM'ın klinik belirtileri sonraki saatler içinde ortaya çıkması sebebiyle dekontaminasyonda, gecikme ve yetersizlik gözlenebilir. Bu nedenle dekontaminasyonun temastan sonraki ilk birkaç dakika içinde yapılması gereklidir (6).

**(1) Mukoza ve Gözler:** Bu bölgeler bol su ile temizlenir. Mümkün olursa izotonik sodyum bikarbonat (% 1.2) veya serum fizyolojik tatbik edilir.

**(2) Cilt:** SM, fuller toprağı gibi adsorbe edici tozlar ve kimyasal inaktivasyonu sağlayan sodyum ve kalsiyum hipoklorit gibi solusyonların kombine etkisi ile temizlenir. Bunu takiben bol su ile yıkanması önerilir. SM bulaşığı üzerine başlangıçta su dökülmesi yayımlara neden olduğundan su kullanılmaz.

**(3) Yaralar:** İzotonik sodyum bikarbonat veya aktif klorlu bileşiklerle dekontamine edimelidir.

## 2.5. KROMATOĞRAFİ

Bu yöntem ilk kez bir Rus botanikçisi olan M.S.Tsweet (1872-1919) tarafından 1900'lü yılların başında keşfedilmiştir. Tsweet, bitki pigmentleri ile çalışırken çok iyi bir adsorban (kalsiyum karbonat) ile doldurulmuş bir kolondan bitki ekstralarını petrol eteri-etanol ile elüe ettiğinde renkli halkaların kolonda ayrıldığını izlemiştir. Bu nedenle yönteme kromatografi adı verilmiştir (Yunanca chroma=renk ve graphein=yazmak anlamına gelir) (45).

Genel olarak kromatografi; bir karışımdaki bileşenlerin hareketli (mobil) fazın etkisi ile sabit (durağan) faz boyunca değişik hızlarda hareket ederek birbirlerinden ayrılması temeline dayalı bir yöntemdir (45). Bu işlemde ayrılacak olan bileşikler bu sistem içerisinde adsorbsiyon, dağılma (partisyon), çözünürlük, buhar basıncı, moleköl büyüklüğü ve iyonik yük yoğunluğu gibi karakterlerindeki farklılıklar nedeniyle farklı hareketlilikler gösterirler ve birbirlerinden ayrılırlar (45).

### **Kromatografik Yöntemler (46).**

1) Mobil ve sabit fazın fiziksel özelliklerine göre,

a) Sıvı kromatografisi

- Sıvı-katı kromatografisi

- Sıvı-sıvı kromatografisi
- b) Gaz kromatografisi
  - Gaz-katı kromatografisi
  - Gaz-sıvı kromatografisi
- 2) Uygulama biçimine göre,
  - a) Kolon (sütun) kromatografisi
  - b) Düzlemsel kromatografi
    - Kâğıt kromatografisi
    - İnce tabaka kromatografisi
    - Preparatif kalın tabaka kromatografisi
  - c) Gaz kromatografisi
  - d) HPLC
  - e) Elektrokromatografi
- 3) Ayrılma mekanizmalarına göre,
  - a) Adsorbsiyon (tutulma) kromatografisi
  - b) Partisyon (dağılma) kromatografisi
  - c) İyon değiştirme kromatografisi
  - d) İyon çifti kromatografisi
  - e) Moleküler eleme kromatografisi
  - f) Afinite kromatografisi

### 2.5.1. GC (Gaz Kromatografisi)

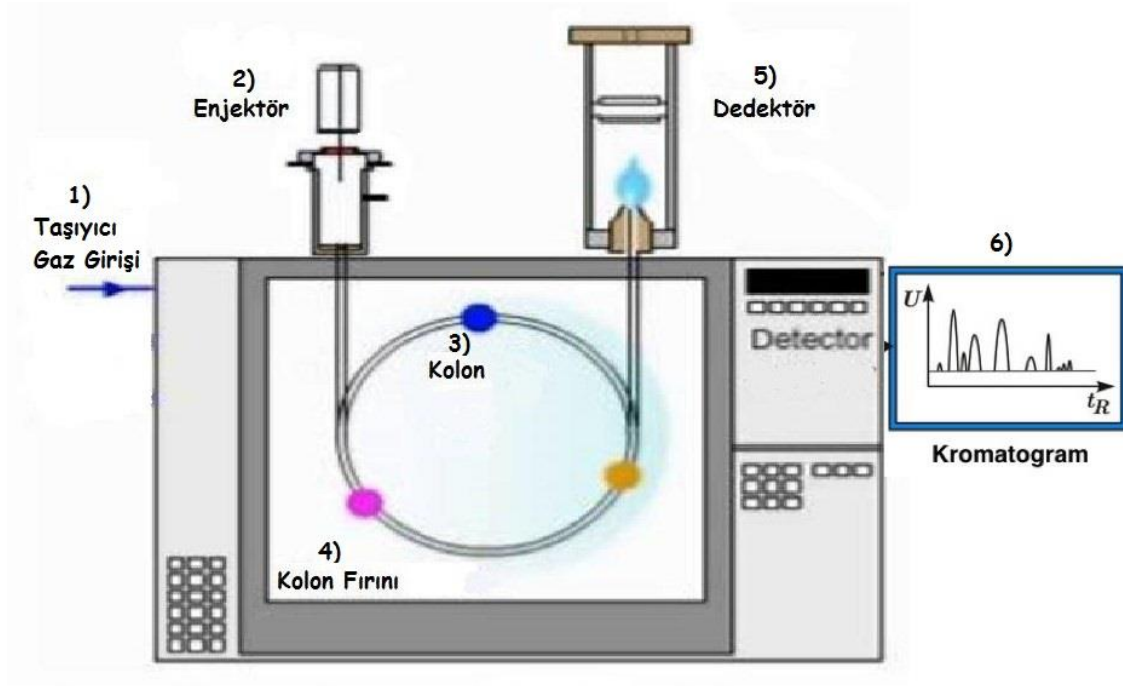
Gaz kromatografisi, uçucu veya yarı uçucu maddelerin ayrımını sağlamak amacıyla kullanılan bir tekniktir. Ayırma işi, analitin sabit fazda dağılımına ve hareketli faz (taşıyıcı gaz) olarak kullanılan inert (diğer moleküllerle reaksiyona girmeyen) bir gaz yardımıyla sabit fazda taşınmasına dayanır (47).

Temel olarak bir gaz kromatografi cihazı, aşağıda belirtilen kısımlardan oluşmaktadır (Şekil 2.6):

- 1) Hareketli faz olarak kullanılan bir gaz
- 2) Numunenin kolona verildiği numune giriş kısmı (Enjektör ve enjektör bloğu)



- 3) Kromatografik ayrımın gerçekleştiği kolon
- 4) Termostat olarak görev yapan ve kolonun yer aldığı kolon fırını
- 5) Madde sinyalini saptayan dedektör
- 6) Sonuçları kaydedecek ve bu sonuçları kromatogramlara dönüştürecek veri sistemi



Şekil 2.6. Gaz Kromatografisi Cihazının Kısımları

### Taşıyıcı gaz

Gaz kromatografisinde hareketli faz olarak genellikle helyum, azot veya hidrojen gibi gazlar kullanılır. Gazın içerisinde bulunan su ve oksijen, sabit fazın bozulmasına neden olduğu için kullanılan gazlar oldukça saf olmalı, su ve oksijen içermemelidir. En yüksek verimin azot gazı kullanıldığında elde edildiği, ancak azot gazının koroziv olması kolona ve cihaza zarar verebileceğinden tercih edilmemektedir. Hidrojen gazı ise ortamdaki  $O_2$  ile birleşerek su oluşturabilmesi ve patlayıcı özelliğinden dolayı çok fazla tercih edilmez. Helyum, hem düşük molekül ağırlıklı hem de inert bir gaz olduğundan dolayı GC'de en çok kullanılan taşıyıcı gazdır (47).

### Enjeksiyon

Gaz kromatografisinde numunenin kolona bir defada verilmesi gerekmektedir. Numunenin yavaş verilmesi pik genişlemesine ve düşük ayırma gücüne neden olur. Numunenin gaz kromatografisi sistemine verilmesi sızdırmaz enjektörler yardımıyla bir septumdan yapılır. Septum ve kolon giriş ucu arasında örneği buharlaştırmak için buharlaştırıcı bölme (enjeksiyon bloğu) yer alır (47).

### Kolon

Günümüzde gaz kromatografisinde kılcal kolonlar kullanılmaktadır. Bu kolonlar çeperi kaplı kılcal kolonlar (WCOT, Wall coated open tubular) ve destek kaplı kılcal kolonlar (SCOT, Support coated open tubular) olmak üzere temelde iki türdür. SCOT kolonlarda, kolon duvarı 30 µm kadar kalınlıkta diatome toprağı gibi bir destek maddesi ile kaplanmıştır. Sabit sıvı faz bu destek materyalinin iç duvarlarına tutturulmuştur. Bu tip kolonlar, WCOT kolonlara göre daha fazla sabit faz içerdiğinden numune kapasitesi daha fazladır. WCOT kolonlarda ise, sabit sıvı faz kolonunun iç duvarlarına tutturulmuştur. İlk WCOT kolonlar paslanmaz çelik, alüminyum, bakır ve camdan yapılmıştır. Daha sonradan WCOT kolonlar, eritilmiş silis kılcal kolonlar (FSOT, fused silica open tubular) olarak adlandırılmıştır. Bu kılcal borular, camdan yapılanlara göre çok daha ince duvarlara sahiptir. Bunların dış yüzeyleri poliamid tabakası ile kaplanmıştır ki böylelikle fazladan bir dayanıklılık ve esneklik kazanmıştır. Kolonun iç yapısında kullanılan maddeye göre farklı polariteye sahip sabit fazlar elde edilir. Bu fazlar ve polariteleri çizelge 2.7'de sunulmuştur (47).

**Çizelge 2.7.** Gaz kromatografisinde en çok kullanılan sabit fazlar (47)

Bağlı Faz	Polarite
Metilpolisiloksan	Apolar
% 95 Metilpolisiloksan - % 5 fenilpolisiloksan	Apolar
% 6 Siyanopropilfenilpolisiloksan - % 94 metilpolisiloksan	Orta polar
% 50 trifluoropropilpolisiloksan % 50 metilpolisiloksan	Polar
Polietilen glikol	Polar

## Dedektörler

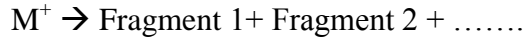
Gaz kromatografisinde kullanılan dedektörler, taşıyıcı gazdan farklı bir maddenin varlığını algılar ve algıladıkları bu bilgiyi elektrik sinyaline dönüştürürler. Dedektörler seçimli ve evrensel olmak üzere sınıflandırılabilir. Evrensel dedektörler hemen hemen tüm maddeleri tanıyabilirken, seçimli olanlar sadece belirli maddelere özgü çalışma prensibiyle işlerler (47). Bunların arasında SM'ye özgü olan seçimli dedektör FPD iken; evrensel dedektörler AED ve çalışmamızda kullandığımız MSD'dir (48).

Gaz kromatografisinde yaygın kullanılan dedektörler aşağıda verilmiştir:

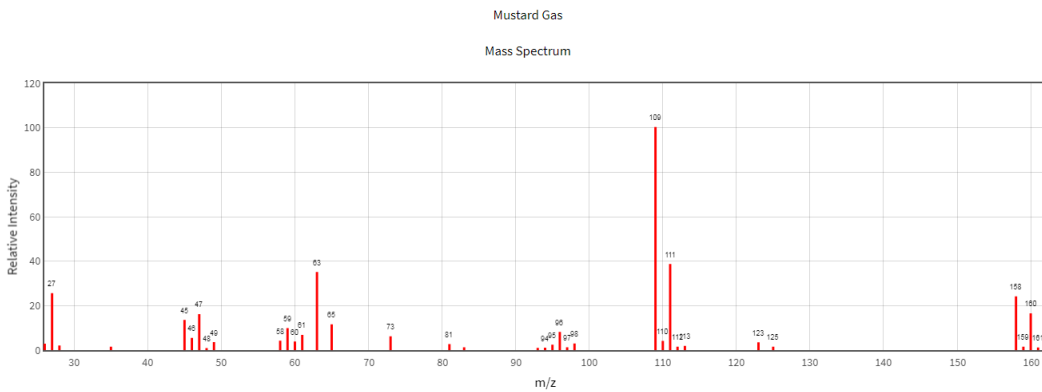
1. Alev iyonlaşmalı dedektör (FID)
2. Alev fotometrik dedektör (FPD)
3. Isısal iletkenlik dedektörü (TCD)
4. Elektron yakalamalı dedektör (ECD)
5. Azot fosfor dedektörü (NPD)
6. Fotoiyonizasyon dedektörü (PID)
7. Atomik emisyon dedektörü (AED)
8. Kütle seçici dedektör (MSD)

## Kütle Seçici Dedektör (MSD)

Kütle seçici dedektör, manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük ( $m/z$ ) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek analizleme esasına göre çalışmaktadır. Buraya gelen gaz fazındaki örnek, genellikle 70 eV'luk bir enerji ile elektron bombardımanına tabi tutulur. Bir organik molekül ile bu yüksek enerjili elektronlardan birinin çarpışması sonucu molekülden bir elektron kopar ve bir iyon meydana gelir. Bu iyonlar stabil değildir ve diğer moleküllerle veya bir yüzey ile temas ettikleri zaman fragmentlerine (parçalanma ürünleri) parçalanır ve yüklerini kaybederler (49, 50).



Oluşan her bir iyonla özgü, bir moleküler kütle ve yük mevcuttur. Kütle/yük (m/z) değerlerinin, yoğunluğa (intensite) karşı gösterildiği bir spektrum ile bileşik gösterilir (Şekil 2.7). Her bir iyonun yoğunluğu detektöre ulaşan miktarı ile orantılıdır ve her bileşiğin spektrumu kendine özeldir. Bir örneğin analizi sonucu elde edilen spektrum referans spektrumu ile karşılaştırılarak tanımlanır. Kütle spektrumundaki her yatay çizgi spesifik bir m/z değerine sahip iyonu gösterirken; bunların uzunlukları da bağıl yoğunluklarını simgeler. En şiddetli iyon 100 birim alınır ve temel pik olarak gösterilir. Geri kalan piklerin yükseklikleri bu temel pike oranlanarak temel pikin yüzdesi cinsinden uygun yükseklikte verilir. Kütle spektrometresinde elde edilen pek çok iyon tek yüke sahip olduğu için m/z aynı zamanda kütle değeridir. Kütle seçici dedektörün ayırma gücü bir atom kütle birimi (amu, atomic mass unit) olduğu için moleküler kütlelerinin doğru belirlenmesine imkan verir. Spektrumda en yüksek kütleli iyon, moleküler iyon olarak değerlendirilir. Daha düşük kütleli iyonlar ise moleküler iyonun fragmentleridir (49, 50).

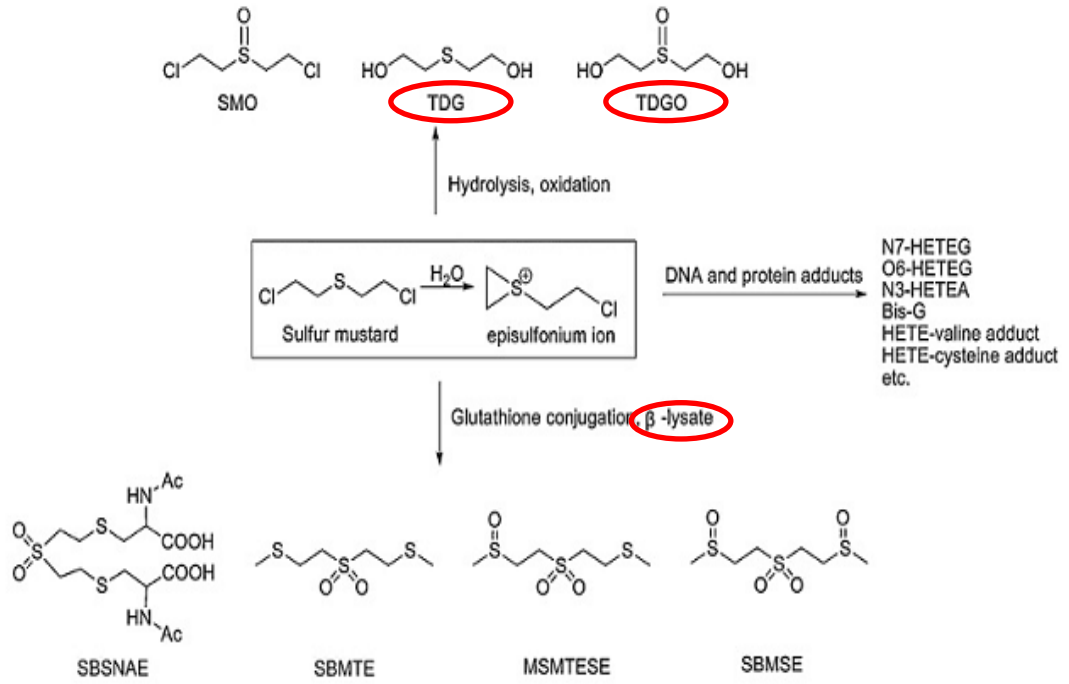


**Şekil 2.7.** Mustard gazının elektron iyonizasyon kütle spektrumu (NIST Chemistry WebBook, SRD 69)(<https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C505602&Mask=200>)  
(Cl-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>=109 m/z ; Cl-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>=63 m/z ; CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Cl=123 m/z)

## 2.6. SÜLFÜR MUSTARD BİYOBELİRTEÇLERİ

Sülfür mustard maruziyetinde idrar metabolitleri ve DNA katım ürünlerini içeren bir takım biyolojik belirteçler tanımlanmıştır. Kan ve idrar gibi biyomedikal örneklerde bu biyolojik belirteçlerin analizinin yapılması SM'in ortamda kullanılıp kullanılmadığına ilişkin kanıtları sağlamak ve tedavi öncesinde tanısını koymak için gereklidir. Özellikle bu ajanın tanısı için Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) ve Likid Kromatografisi-Kütle Spektrometresi(LC-MS) kullanılmaktadır. Sülfür mustard maruziyetini gösteren bir biyobelirteç olarak glutasyon türevi metabolitler (SBSNAE, SBMTE, MSMTESE ve SBMSE) ve oksidasyon/hidroliz ürünleri olan tiyodiglikol, tiyodiglikol sülfoksit (TDG, TDGO) GC-MS yardımıyla analiz edilebilmektedir.

TDG, sülfür sustard'ın basit hidroliz ürünü ve TDGO, TDG'nin oksidasyon ürünü olup, insanda, bu metabolitler diyetten ve çevresel kaynaklardan eser miktarlarda bulunmaktadır. Bu nedenle, TDG ve TDGO'nun maruz kalmayan bireylerde de bir miktar tespit edilebilmesi, SM'nin biyobelirteci olma özelliğini sınırlamaktadır. Tiyodiglikol sülfoksit bir kez daha oksidasyon sonucunda tiyodiglikol sülfon (TDGO<sub>2</sub>) molekülüne bozunur (51). Beta liyaz metabolitleri ise, SM ile maruziyeti kanıtlayan diğer ürünlerdir ve SM'in glutasyon ile reaksiyonundan oluşur. Glutasyonla reaksiyonu sonucu oluşan beta liyaz metabolitleri, SM ile maruziyeti tiyodiglikol ve tiyodiglikol sülfoksit'den çok daha iyi doğrular, çünkü çevreden veya diyetten hiç etkilenmezler, dolayısıyla fizyolojik şartlarda insanda bulunamaz (51). Bu bozunma ürünlerinin yanı sıra, biyolojik örneklerde SM, glutasyon konjugasyonu ile metabolize edilebilir ve mono ve bis N-asetilsistein konjugatlarını oluşturmak için daha fazla oksidasyon veya hidroliz reaksiyonlarına girebilir (51). SM'in major idrar metabolitleri tiyodiglikol (2,2-thiodiethanol, Bis-2-hydroxyethyl sulphide), TDGO ve Beta liyaz enzimleri ile katalizlenen ürünlerdir (Şekil 2.8) (1).



**Şekil 2.8.** Sülfür Mustard'ın Biyolojik Belirteçleri

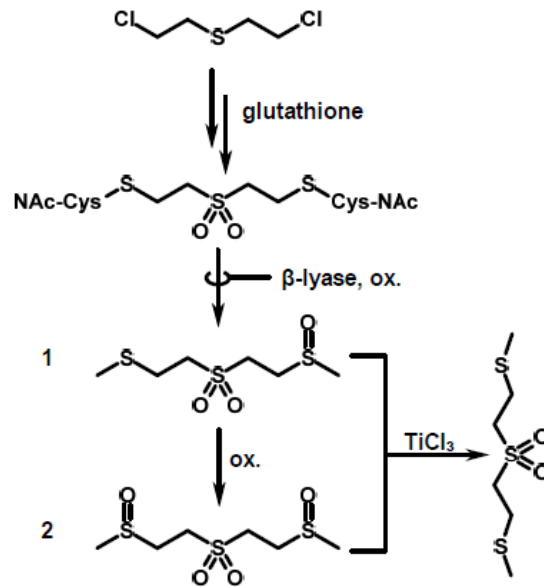
Hayvan deneylerinde (rat ve farelerle yapılan) şekil 2.8'de de gösterildiği üzere başlıca 4 metabolik yolak tanımlanmıştır. İlk yolak SM'nin doğrudan oksidasyonu ile bis-β-chloroethyl sulfoxide (SMO) oluşumunu, doğrudan hidrolizasyonu ile TDG ve TDG'nin oksidasyonu ile TDGO ürününün oluşumunu içerir. İkinci yolak glutatyonla reaksiyonu ve sonrasında sulfon formuna oksidasyonu ile β-lyase metabolitlerinin oluşumunu içermektedir. Beta Liyaz metabolitleri şunlardır (52):

- 1,1'-sülfonylbis[2-(metilsülfinyl)ethane] (SBMSE)
- 1-metilsülfinyl-2-[2-(metiltio)ethylsülfonyl]ethane] (MSMTESE)
- 1,1'-sülfonylbis[2-S-(N-acetylcysteinyl)ethane] (SBSNAE)
- 1,1'-sülfonylbis[2-(metiltio)ethane] (SBMTE)

Üçüncü yolak DNA'nın üzerindeki önemli nükleofilik bölgelerde meydana gelen reaksiyon sonucu SM-DNA katım ürünlerinin oluşumudur. SM'in DNA alkilasyonu yaparken etkilediği başlıca bölgeler guanin aminoasidinin N<sup>7</sup> ve O<sup>6</sup> pozisyonları, adenin aminoasidinin N<sup>3</sup> pozisyonu ve guanin aminoasidinin N<sup>7</sup> pozisyonunun zincir içerisindeki çapraz bağıdır. Bu katım ürünleri N<sup>7</sup>-[2-[(2-

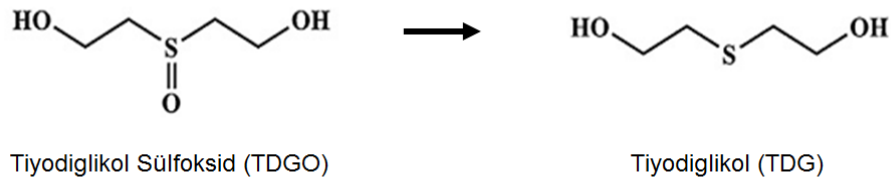
hydroxyethyl)thio]ethyl]-guanine ( $N^7$ -HETEG),  $O^6$ -[2-[(2-hydroxyethyl)thio]ethyl]-guanine ( $O^6$ -HETEG),  $N^3$ -[2-[(2-hydroxyethyl)thio]ethyl]-adenine ( $N^3$ -HETE) ve bis[2-(guanin-7-yl)ethyl] sulfide (Bis-G)'dir. Dördüncü ve son yolak ise proteinlerdeki çeşitli aminoasit kalıntılarının reaksiyonudur ki bunlardan en çok dikkat çeken hemoglobin katım ürünü HETE-valin (HETE-Val) ve albümin katım ürünü HETE-sistein'dir.

SBMSE ve MSMTESE, idrar örneğinde titan triklorid ( $TiCl_3$ ) ile muamele edilerek SBMTE'ye indirgenir (Şekil 2.9) ve katı faz ekstraksiyonunu müteakip GC-MS ile analiz edilir (4). Beta liyaz metabolitlerinin % 99'u maruziyetten sonra ilk hafta içerisinde ekskrete edilmekle birlikte, tavşan idrarında bir aya kadar tespit edilebildiği görülmüştür. Annette ve ark.nın yaptığı bir çalışmada kazayla SM maruziyeti sonrası insan idrarında 5'inci güne kadar beta liyaz metabolitlerini saptadıklarını bildirmişlerdir (40).



Şekil 2.9. SBMSE VE MSMTESE'nin  $TiCl_3$  ile SBMTE'ye reaksiyonu.

TDG ve TDGO; nötr, iyonlaşmayan ve polar moleküllerdir, bu nedenle sıvı ortamlardan izolasyonu çok güçtür. TDGO'nun, TDG'den daha polar olması nedeniyle izolasyonu daha da zordur. Bu nedenle analizi yapılırken TDGO,  $TiCl_3$  kullanılarak TDG'e dönüştürülür. Böylelikle TDG oranı artırılarak ölçümü daha net ve kolay hale getirilebilir (Şekil 2.10) (53).

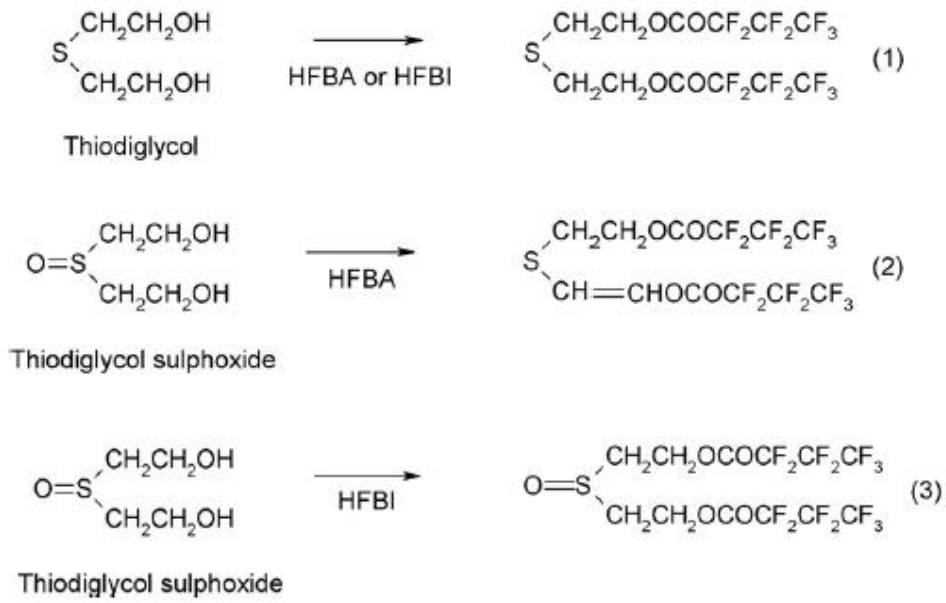


**Şekil 2.10.** TDGO'nun,  $TiCl_3$  ile TDG'ye reaksiyonu

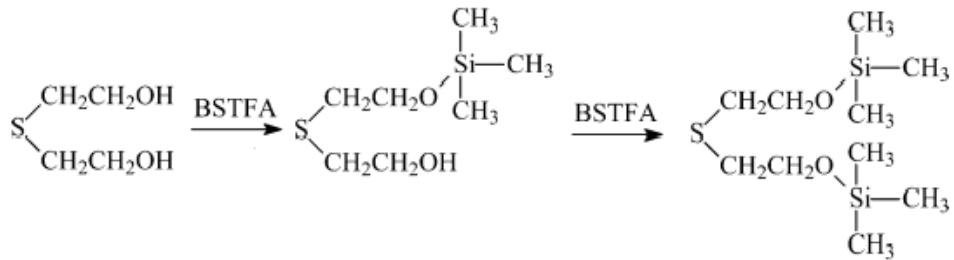
Bu ürünlerin GC-MS cihazı ile ölçümünün yapılabilmesi için dikkat edilmesi gereken diğer bir husus idrarın istemediğimiz proteinler ve hidrokarbonlar gibi yabancı maddelerden temizlenmesi gerektiğidir. Bu amaçla C18 gibi karbon tabanlı kartuşlar veya Florisil kartuş gibi polimerik bir kartuş kullanılarak katı faz ekstraksiyonu ve bunu müteakip sıvı ekstraksiyon yöntemleri kullanılmaktadır (54). Ayrıca aradığımız metabolitleri cihazın ölçümünü yapabileceği moleküller haline dönüştürebilmek için TDG ve TDGO'nun, GC'ye verilmeden önce türevlendirilmesi gereklidir. Türevleme amacıyla çevresel örnekler için "Trimethylsilyl" veya "tert-butyl dimethylsilyl" türevleyici olarak kullanılabilirken, biyolojik örneklerde genellikle "Heptafluorobutyric anhydride (HFBA)", "Heptafluorobutyryl imidazole (HFBI)", "N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA)" veya "N-methyltrifluoroacetamide (MTBSTFA)" kullanılmaktadır (54). Ayrıca "Pentafluorobenzoyl chloride" türevleyici olarak kullanılarak TDG ve TDGO, bis-pentafluorobenzoyl türevlerine dönüştürülebilir (55).

TDG ve TDGO, türevleme sonrası kullanılan reaktife göre farklı türevlere dönüşürler (Şekil 2.11 ve 2.12) (54, 56).





**Şekil 2.11.** TDG ve TDGO'nun, HFBA ve HFBI ile reaksiyonu sonucu oluşan heptafluorobutiril ester türevi ürünleri (54). (1) TDG HFBI, (2) TDGO HFBA (3) TDGO HFBI



**Şekil 2.12.** TDG'nin, N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) ile reaksiyonu sonucu oluşan türevi (56).

Yapılan çalışmalarda deteksiyon limitleri; TDG için GC-MS'te 1 ng/ml, GC-MS-MS'te 0.1 ng/ml ve Beta Liyaz metabolitleri için 0.038 ng/ml (0.5 ml idrarda izotop-dilüsyon GC CI-MS/MS) miktarlarındadır (54).

İdrar numunesi içerisinde TDG ve TDGO ürünlerini ayrı ayrı ölçüp belirleyebilecek mevcut yöntemler günümüzde halen pek memnuniyet verici görünmemektedir. TDGO, TDG'den daha polar olması nedeniyle sıvı matriksten izolasyonu daha zor olmaktadır. Ayrıca katı faz ekstraksiyon ve türevleme sırasında da TDG'nin bir kısmının TDGO'ya okside olması sağlıklı bir miktar tayini yapılmasına engel olur. Bu nedenle numuneden, bu maddelerin izolasyonu için daha polar solventler kullanılması gerekmekte ve sıvı-sıvı ve/veya katı-sıvı ekstraksiyon olarak bilinen çeşitli ayırma yöntemleri kullanılmaktadır. Ayrıca idrarda Beta liyaz metabolitlerinin ölçümü SM maruziyeti açısından daha patognomoniktir. Tüm bu koşullar göz önüne alındığında SM maruziyeti sonrası tanısal amaçlı yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu kromatografik yöntemlere doğru kaymış ve çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızın etik kurul onayı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Etik Kurulundan, 03 Mayıs 2016 tarihinde alınmıştır.

### 3.1. KORUYUCU TEDBİRLER

Yapmış olduğumuz çalışmada, örnekleri hazırlama, ön işlemler öncesi ve sonrası kontrol, değerlendirme işlemleri biyogüvenlik düzeyi 2 olan analiz ve araştırma laboratuvarında, aktif karbon filtre ile donatılmış polipropilen çekerocak (Resim 3.1) içerisinde gerçekleştirildi. Güvenlik önlemi olarak yarım yüz maske, maske filtresi, koruyucu gözlük, nitril eldiven ve kimyasal koruyucu C düzeyi tulum kullanıldı (Resim 3.1). Laboratuvarında hazırlanan tüm materyaller tamamiyle toksik kimyasal maddelerle çalışma kural ve talimatlarına uygun bir şekilde çalışılmıştır. Kullanılan tüm malzemeler çalışma sonrasında %5'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonu ile dekontamine edildi ve atıklar uzaklaştırıldı (57).



**Resim 3.1.** Koruyucu tedbirler

### 3.2. KULLANILAN CİHAZLAR VE EKİPMAN

1) Shimadzu GCMS-TQ8040 NCI Gaz Kromatografi Kütle-Kütle Spektrometresi (230 V) (Tokyo, Japonya)

- Elektron iyonizasyon (EI) probu, Shimadzu iyon kaynağı
- Shimadzu AOC-20i Otoenjektör (221-72315-38) ve AOC-20s Oto örnekleyici (221-72300-31)
- Vakum pompası: Edwards E1M30 oil sealed rotary vane pump (Japonya)
- Azot jeneratörü: Parker Balston GC/MS NitroFlow Lab (Japonya)
- Helyum ve Argon tüpü: ANKARA GAZ - Özel Gazlar, Endüstriyel Gazlar ve Gaz Ekipmanları (Ankara, Türkiye)
- Bilgisayar, HP Prodesk 400 G4 MT Business PC, Intel Core i5-2400,3.1 GHz CPU, HP 21,5-inch wide color LCD Monitör, Windows 7 Professional 32-bit version operating system ve HP Yazıcı,
- Shimadzu GCMS Solution workstation Version 4.41 software
- Analitik Kolon: Restek, Rxi-5ms 30m x 0,25mm x 0,25 µm (A.B.D.)
- Rxi guard kolon (5 m x 0,25mm ID) (CAT.Nu.:10029; Serial Nu.:1490644)

2) Soğutmalı Santrifüj cihazı, Universal 32 R (Almanya)

3) Hassas terazi, Precisa, Model XB 220A (İsviçre)

4) Otomatik Eppendorf pipetler (Değişken hacimli, tek kanallı, manuel) ve pipet uçları (Hamburg, Almanya)

5) Vorteks cihazı, Rx3 Velp Scientifica (İtalya)

6) Çalkalayıcı, IKA KS 130 basic shaker (Staufen, Almanya)

7) Buzdolabı, Arçelik (Türkiye)

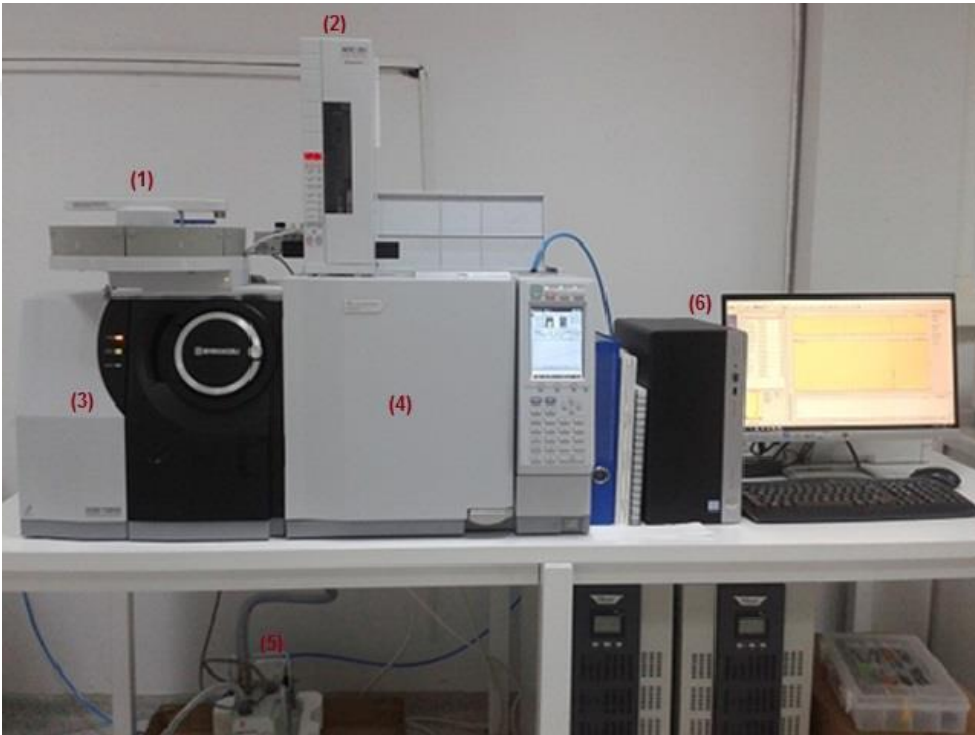
8) -86 °C derin dondurucu, Ultra-low temperature freezer, model DW-HL768 (Çin)

9) Milli-Q Distile su cihazı, Nüve (Almanya)

10) Mikrotüpler 0.5 ve 1.5 cc, ISOLAB Laborgeräte (Almanya)

11) Santrifüj tüpleri, Vida kapaklı, 50 mL, ISOLAB Laborgeräte (Almanya)

Analitlerin ayrımı için Restek, Rxi-5ms 30m x 0,25mm x 0,25 µm kapiller kolon kullanılmıştır. Cihazın iyon kaynağını ve kolonu kirlilikten korumak amacıyla Rxi guard kolon (5 m x 0,25mm ID) (CAT.Nu.:10029; Serial Nu.:1490644) kullanıldı. Mobil faz olarak Helyum gazı kullanılmıştır. Akış hızı 1 ml/dk olarak optimize edilmiştir. Söz konusu kimyasalların optimum yüzdeleri, çalışma esnasında denenerek belirlenmiştir. İyonizasyon için EI (Elektron iyonizasyon) tekniği kullanılmıştır. Analizler, Shimadzu marka GC-MS/MS TQ 8040 marka cihaz kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Resim 3.2).



**Resim 3.2.** Çalışmanın yapıldığı GC/MS-MS Sistemi (Shimadzu)

- |                                     |                   |
|-------------------------------------|-------------------|
| (1) Oto örnekleyici                 | (5) Vakum pompası |
| (2) Enjektör ve enjektör bloğu      | (6) Veri Sistemi  |
| (3) Dedektör                        |                   |
| (4) Kolonun yer aldığı kolon fırını |                   |

### 3.3. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER VE REAKTİFLER

- Titanium(III) chloride solüsyon min. %12, Sigma Aldrich /Almanya
- Potasyum asetat solüsyon 5 M, su içerisinde, Sigma Aldrich /Almanya
- 1,1'-sulfonylbis[2-(methylthio)ethane]-SBMTE >98% saflıkta, Spiez Laboratory /İsviçre
- 1,1'-sulfonylbis[2-(methylsulfinyl)ethane]-SBMSE >98% saflıkta, Spiez Laboratory /İsviçre
- MSMTESE >98% saflıkta, 1-methylsulfinyl-2-(2-(methylthio)ethylsulfonyl) ethane, Spiez Laboratory /İsviçre
- Heptan, >%99 saflıkta, Sigma Aldrich /Almanya
- 2-Propanol % 99.5 saflıkta, Sigma Aldrich /Almanya
- Aseton GC için  $\geq$ %99.9 saflıkta, Sigma Aldrich /Almanya
- Asetonitril GC için  $\geq$ %99.9 saflıkta, Sigma Aldrich /Almanya
- Kloroform GC için  $\geq$ %99.9 saflıkta, Sigma Aldrich /Almanya
- Sodyum Hidroksit solüsyon 5 M, Sigma Aldrich /Almanya
- Metanol LiChrosolv® Reag. Ph Eur gradient grade for liquid chromatography, Sigma Aldrich /Almanya
- Hidroklorik asit solüsyon %37, 12 M, Sigma Aldrich /Almanya
- C8 SPE kartuş 500 mg, 3 mL, Macherey Nagel/Almanya
- ENV SPE kartuş 60 mg, 3 mL; 200 mg, 3 mL, Macherey Nagel/Almanya

### 3.3.1 SBMTE, SBMSE, MSMTESE analitlerinin NMR spektrumları

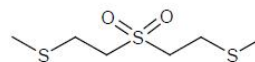
Kimyasallar Analitler:

**Çizelge 3.1.** Ölçümü yapılan kimyasal analitler (1.SBMTE, 2.SBMSE, 3.MSMTESE)

Item	Spiking chemical	CAS Number	Purity NMR
1	ETHANE, 1,1'-SULFONYLBİS (2-(METHYLTHİO))	137371-98-3	> 98 % ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C)
2	1,1'-SULFONYLBİS (2-(METHYLSULFİNYL)ETHANE)	137371-96-1	> 98 % ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C)
3	1-METHYLSULFİNYL-2-(2-(METHYLTHİO)ETHYLSULFONYL)ETHANE	137371-97-2	> 98 % ( <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C)

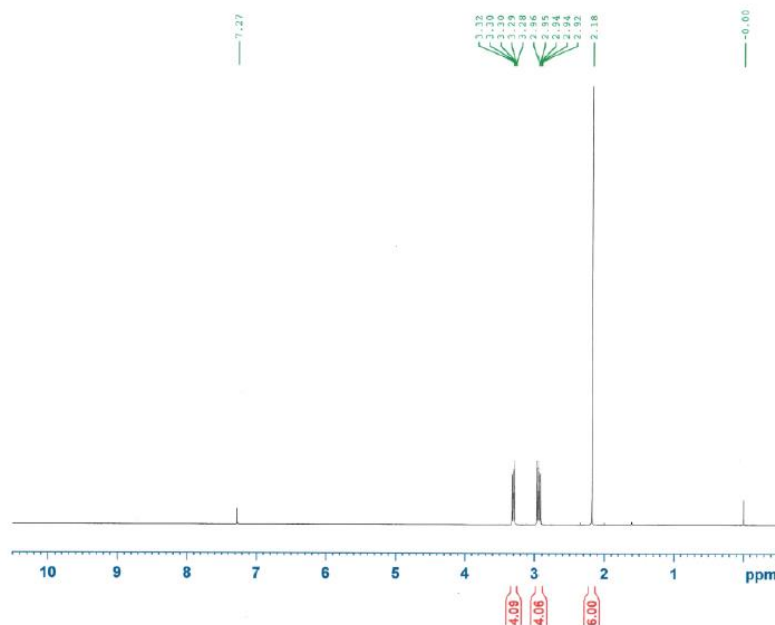


SPEIZ LABORATORY  
Chemistry  
CH-3700 Speiz



$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR: ( $\text{CDCl}_3$ ) *Item 1* ETHANE, 1,1'-SULFONYLBIS (2-(METHYLTHIO))

CAS: 137371-98-3  
PROTON  $\text{CDCl}_3$  C:\openaccess 10



**BRUKER**

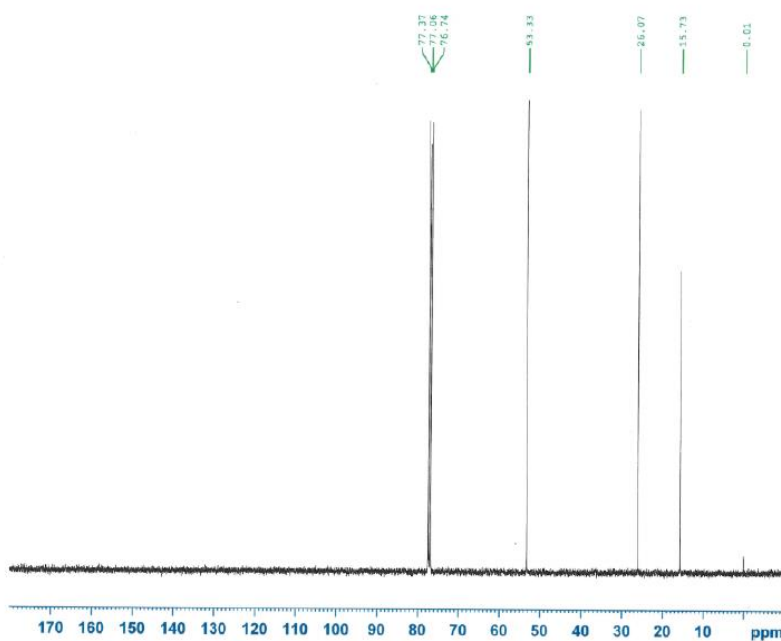
Current Data Parameters  
NAME Jun16-2017  
EXNO 20  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20170616  
Time 10.58  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm PABBO BB/  
PULPROG zgpg30  
TD 65536  
SOLVENT  $\text{CDCl}_3$   
NS 2  
DS 2  
SWH 8012.820 Hz  
FIDRES 0.132266 Hz  
AQ 4.839465 sec  
RG 114.38  
DW 62.600 usec  
DE 6.50 usec  
TE 298.0 K  
D1 1.0000000 sec  
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====  
SP01 400.4924732 MHz  
NUC1 1H  
P1 14.60 usec  
PLW1 12.80000019 W

F2 - Processing parameters  
SI 65536  
SF 400.4900056 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 0.30 Hz  
GB 0  
PC 1.00

CAS: 137371-98-3  
C13CPD  $\text{CDCl}_3$  C:\openaccess 10



**BRUKER**

Current Data Parameters  
NAME Jun16-2017  
EXFNO 21  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20170616  
Time 11.14  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm PABBO BB/  
PULPROG zgpg30  
TD 65536  
SOLVENT  $\text{CDCl}_3$   
NS 256  
DS 4  
SWH 24038.461 Hz  
FIDRES 0.266798 Hz  
AQ 1.3631438 sec  
RG 198  
DW 20.800 usec  
DE 6.50 usec  
TE 298.0 K  
D1 2.0000000 sec  
D11 0.03000000 sec  
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====  
SP01 100.7133608 MHz  
NUC1 13C  
P1 9.60 usec  
PLW1 47.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====  
SP02 400.4516020 MHz  
NUC2 1H  
CPDPRG2 waltz16  
PCPD2 90.00 usec  
PLW2 12.80000019 W  
PLW12 0.33684998 W  
PLW13 0.27283999 W

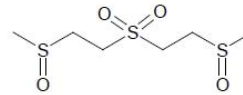
F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 100.7032906 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 1.00 Hz  
GB 0  
PC 1.43

Resim 3.3. SBMTE'nin  $^1\text{H}$ NMR ve  $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu



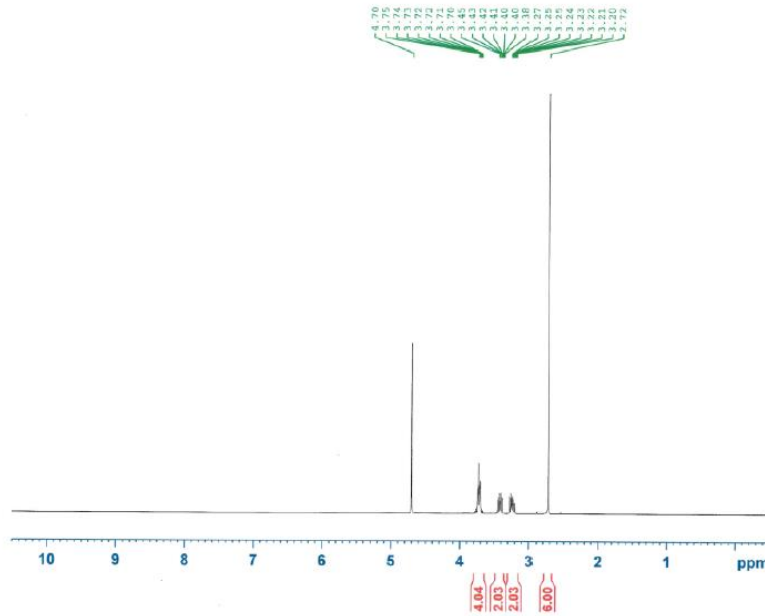


**SPIEZ LABORATORY**  
Chemistry  
CH-3700 Spiez



<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-NMR: (D<sub>2</sub>O) *Item 2* 1,1'- SULFONYLBİS (2-(METHYLSULFİNYL)ETHANE)

CAS: 137371-96-1  
PROTON D2O C:\openaccess 12



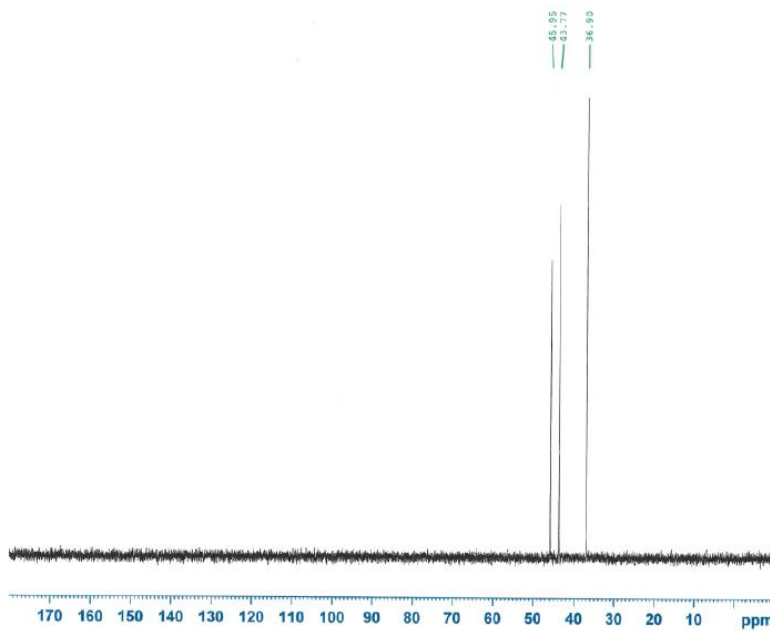
Current Data Parameters  
NAME Jun16-2017  
EXPNO 40  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20170616  
Time 11.47  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm PABBO BB/  
PULPROG zgpg30  
TD 65536  
SOLVENT D2O  
NS 32  
DS 2  
SWH 8012.820 Hz  
FIDRES 0.152266 Hz  
AQ 4.0894465 sec  
RG 114.38  
DM 62.400 usec  
DE 6.50 usec  
TE 298.0 K  
D1 1.0000000 sec  
TDO 1

===== CHANNEL f1 =====  
SFO1 400.4924732 MHz  
NUC1 1H  
P1 14.80 usec  
PLW1 12.80000019 W

F2 - Processing parameters  
SI 65536  
SF 400.4900000 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 0.30 Hz  
GB 0  
PC 1.00

CAS: 137371-96-1  
C13CPD D2O C:\openaccess 12



Current Data Parameters  
NAME Jun16-2017  
EXPNO 41  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20170616  
Time 12.03  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm PABBO BB/  
PULPROG zgpg30  
TD 65536  
SOLVENT D2O  
NS 256  
DS 4  
SWH 24038.461 Hz  
FIDRES 0.366798 Hz  
AQ 1.3631488 sec  
RG 198  
DM 20.800 usec  
DE 6.50 usec  
TE 298.0 K  
D1 2.0000000 sec  
D11 0.0300000 sec  
TDO 1

===== CHANNEL f1 =====  
SFO1 100.7133605 MHz  
NUC1 13C  
P1 9.60 usec  
PLW1 47.00000000 W

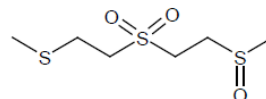
===== CHANNEL f2 =====  
SFO2 400.4916020 MHz  
NUC2 1H  
CPDPRG2 waltz16  
PCPD2 90.00 usec  
PLW2 12.80000019 W  
PLW12 0.33684395 W  
PLW13 0.27283995 W

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 100.7032905 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 1.00 Hz  
GB 0  
PC 1.40

Resim 3.4. SBMSE'nin <sup>1</sup>HNMR ve <sup>13</sup>CNMR spektrumu

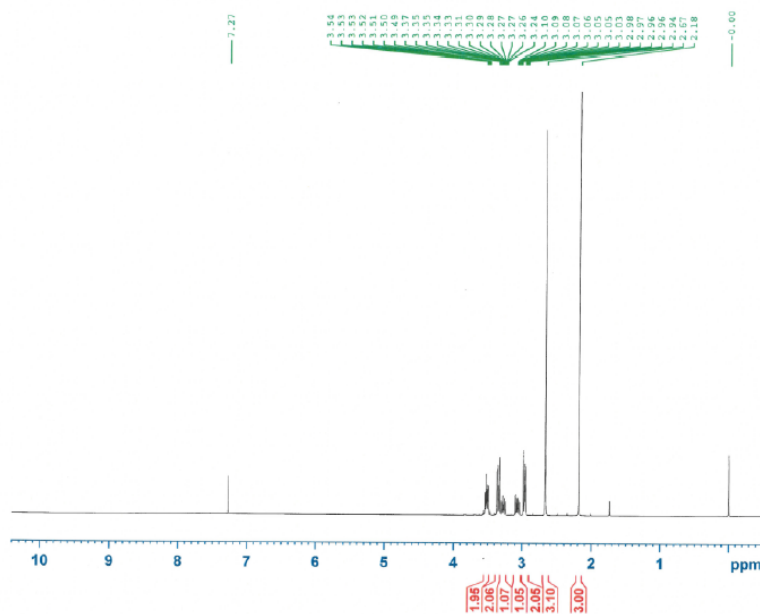


**SPEIZ LABORATORY**  
Chemistry  
CH-3700 Spiez



$^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR: ( $\text{CDCl}_3$ ) *Item 3* 1-METHYLSULFINYL-2-(2-(METHYLTHIO)ETHYLSULFONYL)ETHANE

CAS: 137371-97-2  
PROTON  $\text{CDCl}_3$  C:\openaccess 11



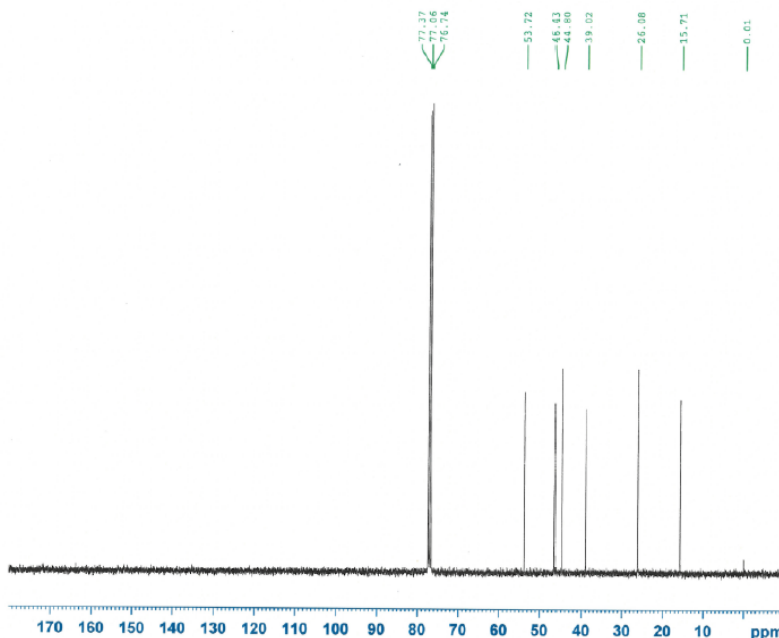
Current Data Parameters  
NAME Jun16-2017  
EXPNO 30  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20170616  
Time 11.23  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm PABBO BB/  
PULPROG zg30  
TD 65536  
SOLVENT  $\text{CDCl}_3$   
NS 32  
DS 2  
SWH 8012.820 Hz  
FIDRES 0.122266 Hz  
AQ 4.089465 sec  
RG 114.38  
DW 62.400 usec  
DE 6.50 usec  
TE 298.0 K  
D1 1.0000000 sec  
TDO 1

===== CHANNEL f1 =====  
SFO1 400.4924732 MHz  
NUC1 1H  
P1 14.60 usec  
PLW1 12.8000019 W

F2 - Processing parameters  
SI 65536  
SF 400.4900042 MHz  
WDW RM  
SSB 0  
LB 0.30 Hz  
GB 0  
PC 1.00

CAS: 137371-97-2  
 $\text{CDCl}_3$   $\text{CDCl}_3$  C:\openaccess 11



Current Data Parameters  
NAME Jun16-2017  
EXPNO 31  
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters  
Date\_ 20170616  
Time 11.39  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm PABBO BB/  
PULPROG zgpg30  
TD 65536  
SOLVENT  $\text{CDCl}_3$   
NS 256  
DS 4  
SWH 24038.461 Hz  
FIDRES 0.366798 Hz  
AQ 1.3631488 sec  
RG 198  
DW 20.800 usec  
DE 6.50 usec  
TE 298.0 K  
D1 2.0000000 sec  
D11 0.0300000 sec  
TDO 1

===== CHANNEL f1 =====  
SFO1 100.7133602 MHz  
NUC1 13C  
P1 9.60 usec  
PLW1 47.0000000 W

===== CHANNEL f2 =====  
SFO2 400.4916020 MHz  
NUC2 1H  
CPDPRG[2] waltz16  
PCPD2 59.00 usec  
PLW2 12.8000019 W  
PLW12 0.33684999 W  
PLW13 0.27283999 W

F2 - Processing parameters  
SI 32768  
SF 100.7032905 MHz  
WDW RM  
SSB 0  
LB 1.00 Hz  
GB 0  
PC 1.40

Resim 3.5. MSMTESE'nin  $^1\text{H}$ NMR ve  $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu

### 3.4. DENEKLERDEN ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Çalışmada kullanılan örnekleri, 5 sağlıklı gönüllüden SBÜ Tıbbi KBRN AD. Analiz ve Araştırma Laboratuvarında toplandı. Katılımcılar, gönüllülük esasına göre çalışmaya dahil edildiler. Sabah 08:30 ile 10:00 saatleri arasında, gönüllülerden alınan idrarlar laboratuvarında tek bir kaptaki birleştirildi ve sonra 1 mL hacimlere porsiyonlanarak reaksiyon tüplerine konuldu. Gönüllülerden alınan onam kapsamında; idrar örnekleri bu çalışma için kullanılabilecek kadar -86°C’de bekletildi.

### 3.5. ANALİZ METOTLARI

#### 3.5.1. Örnek ve Standartların Hazırlanması

Kalibrasyon doğrusu için kullanılacak standartların hazırlanması:

5 mg SBMTE, 5 mL metanol içerisinde çözünerek 1 mg/ml konsantrasyonunda stok solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan bu stok solüsyonundan seri dilüsyonla elde edilen SBMTE örnekleri uygun konsantrasyonda alınarak 1:1 oranında idrar ile seyreltildi. 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 25 ng/mL’lik konsantrasyonlarda çalışma solüsyonları elde edildi. Hazırlanan kontrol örnekleri ve idrar örneklerine ait bilgiler çizelge 3.2’de sunulmuştur.

Tüm kontrol ve idrar örnekleri GCMSMS analizi öncesinde aynı ön işlemlerden geçirildi. Metodun optimizasyonu değerlendirilirken metanol içerisine eklenen analitler ile idrar örnekleri karşılaştırıldı. Tespit limiti (Limit of Detection, LOD) ve tayin limitinin (Limit of Quantitation, LOQ) değerlendirilmesinde ise, idrar içerisinde hazırlanan analitlerinin kromatogramlarında sinyal/gürültü oranları karşılaştırıldı.

**Çizelge 3.2.** Kullanılan örneklere ait konsantrasyonlar

SBMTE Konsantrasyonu (ng/mL)	Kontrol Örnekleri	İdrar Örnekleri
2,5	500 µL metanol içerisinde	500 µL idrar içerisinde
5		
7,5		
10		
12,5		
25		

### 3.5.2. GC Koşulları

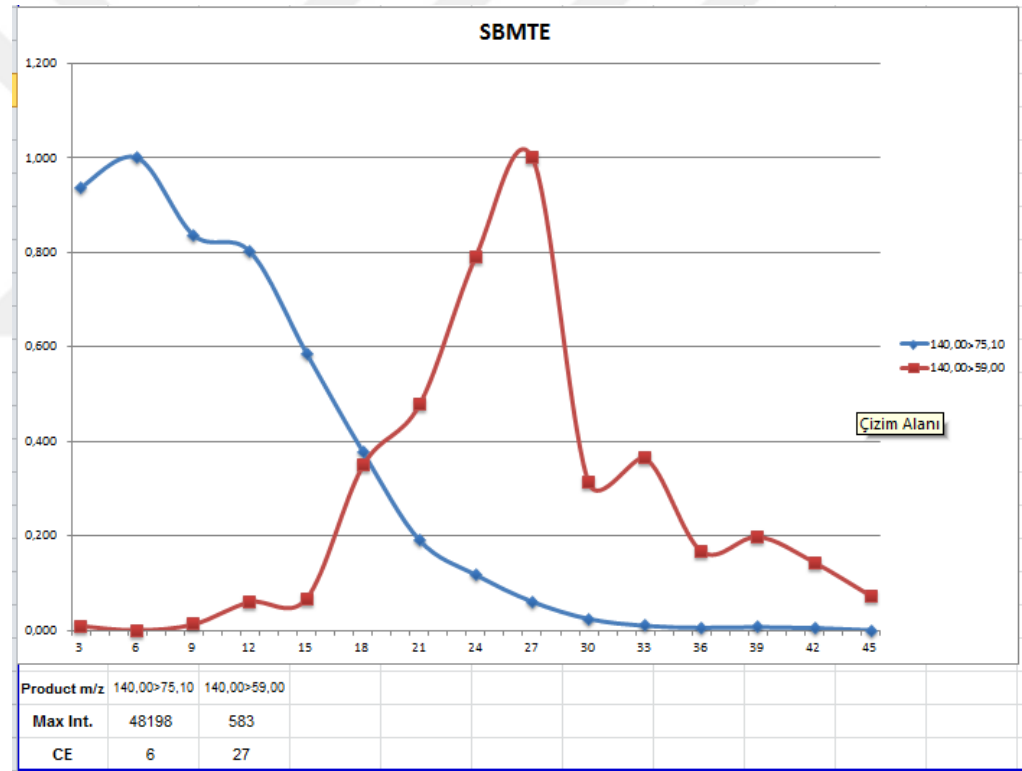
En iyi ayırım ve en yüksek intensiteye sahip pikler için yapılan çeşitli denemeler sonucunda GC için optimum koşullar belirlendi. Restek Rxi-5MS, 30 × 0.25 mm, 0.25 µm (Cat.No: #13423) olan düşük polaritede ancak metilpolisiloksandan daha polar özellikte kapiller kolon kullanıldı. Cihazın iyon kaynağını ve kolonu kirlilikten korumak amacıyla Rxi guard kolon 5 m x 0,25mm ID (CAT.Nu.:10029; Serial Nu.:1490644) kullanıldı. Young ve ark. (58) ile Steinritz ve ark.'nın (59) yaptıkları çalışmalar esas alınarak enjeksiyon modu splitless ve kolon akış hızı 1.20 ml/dk olarak belirlendi. Enjeksiyon bloğundan kolona analitin aktarımını hızlandırmak amacıyla örnekleme zamanı 1 dakikadan 0.5 dakikaya düşürüldü. Fakat daha hızlı aktarım sağlanırken analit miktarından kayıp vermemek için örnekten alınan hacim 2 µl olarak belirlendi. Kolonun fırın sıcaklığı; metanolün kaynama derecesinin 20 °C altında olacak şekilde 40 °C' ye sabitlendi. Yapılan çeşitli denemeler sonucu kolon fırınının son sıcaklığı 280 °C ve sıcaklık artışı 30 °C/dk olarak belirlendi.

### 3.5.3. MS/MS Koşulları

MS/MS taraması; Çoklu Reaksiyon İzleme (Multiple Reaction Monitoring: MRM) modunda yapıldı. İyon kaynağı olarak 70 eV enerjilik elektron iyonizasyonu (EI) ve çarpışma gazı olarak argon gazı kullanıldı. SBMTE iyonunun tespit ve teşhisi için kütle/yük ( $m/z$ ) oranlarına göre ana iyon ile ürün iyonu içeren MRM geçişi olarak  $140 \rightarrow 75$   $m/z$  iyon çifti kullanıldı. Toplam analiz süresi 13 dakika olmakla beraber çözücünün atılma süresi 3,5 dakika olarak ayarlandı. İyon kaynağı sıcaklığı  $230$  °C ve arayüz sıcaklığı  $280$  °C olarak belirlendi. SBMTE analitinin alıkonma zamanı (RT) 9,50 dakikada izlendi. MS/MS taraması; SBMTE analiti için pozitif iyonlaşmada yapıldı. SBMTE için tandem kütle spektrometresinde geçiş iyonlarını seçmek amacıyla full scan modunda 1 ppm SBMTE stok solüsyonundan çalışıldı. SCAN data üzerinden ana (precursor) iyon 140 olarak belirlendi. Ürün (product) iyonu 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42 ve 45 V çarpışma enerjileri (CE) kullanılarak Shimadzu cihaz yazılımı tarafından optimize edilerek belirlendi. Sonuç olarak  $140 \rightarrow 75$  MRM geçişi için SBMTE'nin en yüksek pik yoğunluğu, cihaz voltajı 6 V olduğunda elde edildi. Çarpışma enerjisi cihazdan cihaza değişen bir parametre olmakla birlikte cihazın kendi yazılımı aracılığıyla otomatik hesaplanan voltaj değeri 6 V olduğunda izlenen  $140 \rightarrow 75$   $m/z$  iyon çiftinin oranı %100 idi. SBMTE analiti için seçtiğimiz iyon çifti literatürlerde yer alan iyonlar ile uyumludur. (Şekil 3.1 ve 3.2). Son olarak tarama süresi, alınan pik için nokta sayısını arttırmak ve sonuçta daha keskin bir pik elde edebilmek amacıyla 0.05 saniye olarak belirlendi.

Serial #	Compound Name	Ret. Index	Ion1				Ion2				Ion3	
			Type	m/z	CE	Ratio	Type	m/z	CE	Ratio	Type	m/z
1	SBMTE	0	T	140,00>75,10	6	100,00	Ref.1	140,00>59,00	27	1,21	Ref.2	
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												

**Şekil 3.1.** SBMTE analitinin MRM metoduyla aranan iyon çifti için yapılan optimizasyon



**Şekil 3.2.** SBMTE analitinin MRM metoduyla aranan iyon çiftinin en uygun voltaj ve en yüksek yoğunluklarının grafiği

### 3.5.4.İdrarda $\beta$ -lyase metabolitlerinin GCMSMS ile tayini:

500  $\mu$ l idrar, 250  $\mu$ l titan triklorid ( $\text{TiCl}_3$ ) ile muamele edildikten sonra mono-sulfoksid ve di-sulfoksid (SBMSE, MSMTESE) formları disulfid (SBMTE) formuna dönüşür. Böylelikle analizi yapılacak örnekte 3 farklı ürün aramak yerine, SM maruziyeti gösteren tek bir ürün olan SBMTE'ye yönelebiliriz. Bu kapsamda aranan ürünün (SBMTE) miktarı artırılarak daha net bir sonuca varılabilir. İdrarda SBMTE miktarını tespit etmek için yapılan ön işlem kapsamında, çizelge 3.2'de konsantrasyonları verilen ve  $-86^\circ\text{C}$ 'de saklanan 500  $\mu$ l hacmindeki idrar örnekleri 2 ml'lik santrifüj tüplerinin içerisine kör ve standartlar olmak üzere pipetlendi. İdrarın üzerine 250  $\mu$ l % 12  $\text{TiCl}_3$  solüsyonu eklenip vortekslendi. Karışım  $75^\circ\text{C}$ 'de, 60 dakika etüvde bekletildi. Etüvden alınan örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Daha sonra örnekler; en iyi geri kazanımın elde edilebileceği uygun bir pH değerine ayarlanmaya çalışıldı. Bu aşamada 5 M ve 6 M olmak üzere iki farklı konsantrasyonda NaOH solüsyonu hazırlandı.  $\text{TiCl}_3$  ile muamele edilmiş olan idrar örneğine 5 M NaOH çözeltisinden 500  $\mu$ l ve 12 M HCl'den 250  $\mu$ l eklediğimizde örneğin pH'sının 1.00' in altında olduğu görüldü; 500  $\mu$ l, 5 M NaOH ve 12 M HCl'den 200  $\mu$ l eklediğimizde ise pH 1.18 olarak ölçüldü. Örneğe, 6 M NaOH çözeltisinden 500  $\mu$ l ve 12 M HCl'den 250  $\mu$ l eklediğimizde pH değeri 4.60 oldu. Yine 6 M NaOH çözeltisinden 500  $\mu$ l ve 12 M HCl'den 200  $\mu$ l eklediğimizde ise, literatüre uygun pH değeri olan 9.35' e ulaşıldı. Böylece sonraki çalışmalarını,  $\text{TiCl}_3$  ilavesi ile düşen pH değerini, örneğe 500  $\mu$ l 6 M NaOH ile beraber 12 M HCl'den 200  $\mu$ l ilave ederek dengeledik. HCl ilave edildiği zaman çözelti kirli beyaz bir renk aldı. Daha sonra çözelti oda sıcaklığında, 9000 rpm ve 10 dk süreyle santrifüj işlemine tabi tutulduğu zaman iki ayrı faz halinde çökelti ve şeffaf süpernatantın oluştuğunu izledik. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatant önceden 1 mL metanol ve 1 mL distile su ile şartlandırılmış C8 SPE 3 mL/500 mg kartuş içerisine transfer edildi. İçinden örnek geçirilen SPE kartuş 1000  $\mu$ l % 5' lik distile su/metanol karışımı ile yıkandı. Negatif basınç altında 5 dk kurutulduktan sonra C8 kartuşa 1 ml metanol ilave edildi ve örnek GC-MS/MS' e analiz için verildi.

Katı faz ekstraksiyonda denenen her kartuşun kendine özgü farklı bir şartlanma yöntemi mevcuttu. Bu kartuşlar arasında en iyi sonucu C8 kartuş verdi. C8

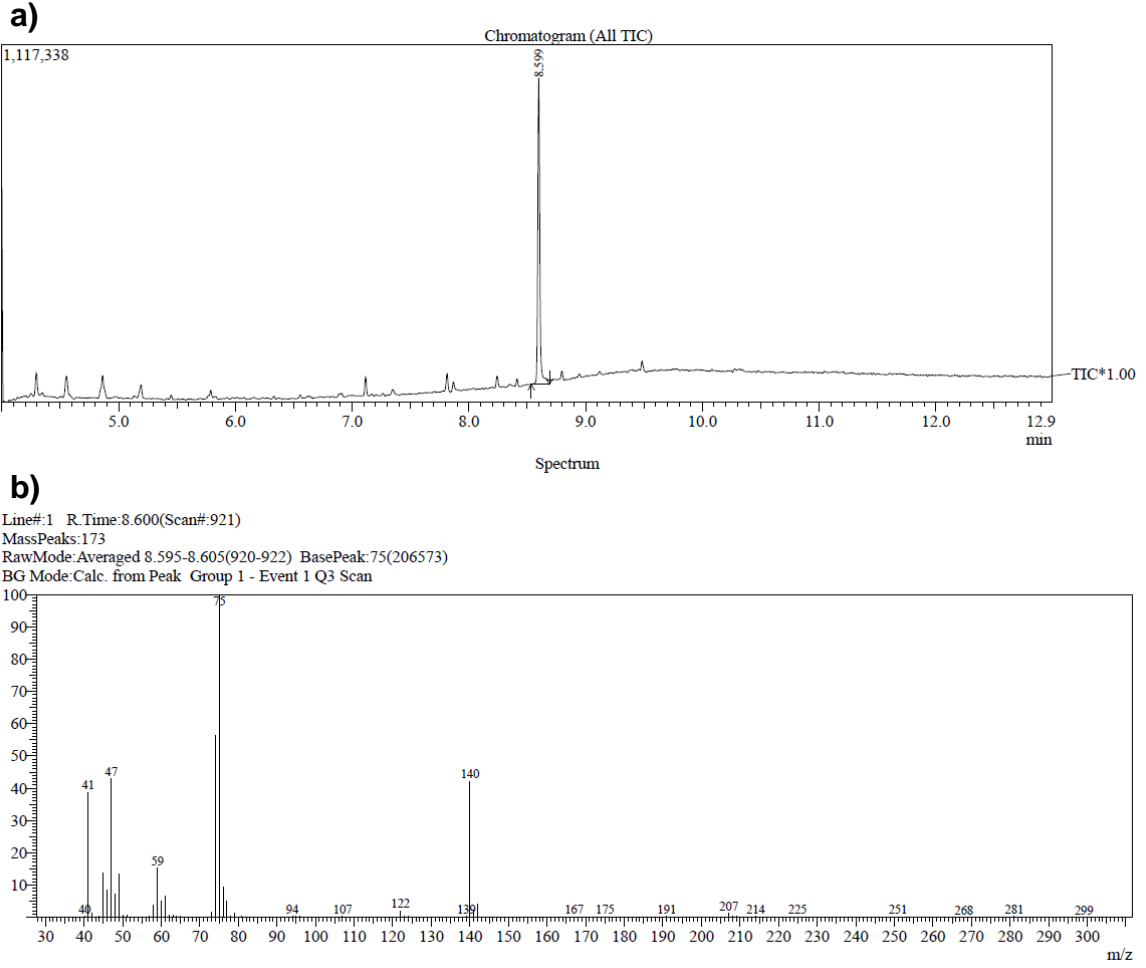
kartuşun şartlama yönteminde 1 mL metanol ve ardından 1 mL distile suyun yavaş yavaş damlatılmasını müteakip idrar örneği kartuştan geçirildi. Sonrasında % 5' lik distile su/metanol solüsyonu ile kartuş yıkandı. İşlem sonunda kartuşlar negatif basınç altında 5 dk spontan kurumaya bırakıldı ve son olarak kartuştan 1 mL metanol geçirilerek numune GC'ye verilmeden önce cam vialle alındı. SPE sonrası çözücü olarak asetonitril, metanol, kloroform ve izopropanol ayrı ayrı denendi. Taban çizgisinin (base line) en düşük olduğu ve SBMTE'ye ait en yüksek şiddette pikin, keskin görüntü verdiği solvent olduğu için metanol seçildi.

GC-MS/MS cihazında Rxi-5MS kapiller kolon (30m x 250µm x 0,25 µm) ve kolonda kirlilik oluşmasını engellemek maksadıyla Rxi guard column (5m x 0.25mmID) kullanıldı. Enjeksiyon sıcaklığı 280 °C ve transfer hattı sıcaklığı 280 °C' ye ayarlandı. GC fırın sıcaklığı programı 40 °C'de 1 dk bekleme ile başlanıp, ısının 30 °C/dk arttırılarak 280 °C'ye çıkarılması ve bu sıcaklıkta 4 dk beklenmesi şeklinde ayarlandı. Taşıyıcı gaz olarak helyum gazı (% 99,999 saflıkta; 1 ml/dk hızla) kullanıldı. SBMTE için MS/MS analizi MRM (multiple reaction monitoring) modunda 140 m/z → 75 m/z iyon geçişleri kullanılarak gerçekleştirildi ve ilgili pik 9,50 dk alıkonma zamanında tespit edildi.



## BULGULAR

### 4.1. SBMTE KROMATOGRAMI, KÜTLE SPEKTRUMU VE KÜTÜPHANE SPEKTRUMU

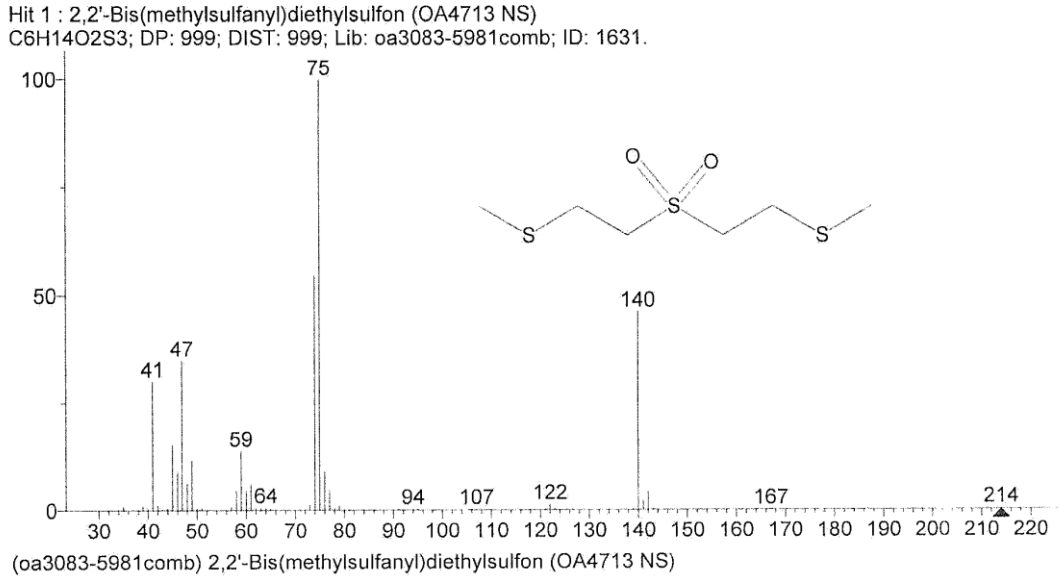


Şekil 4.1. a) 100 ng/mL konsantrasyonunda SBMTE kromatogramı.

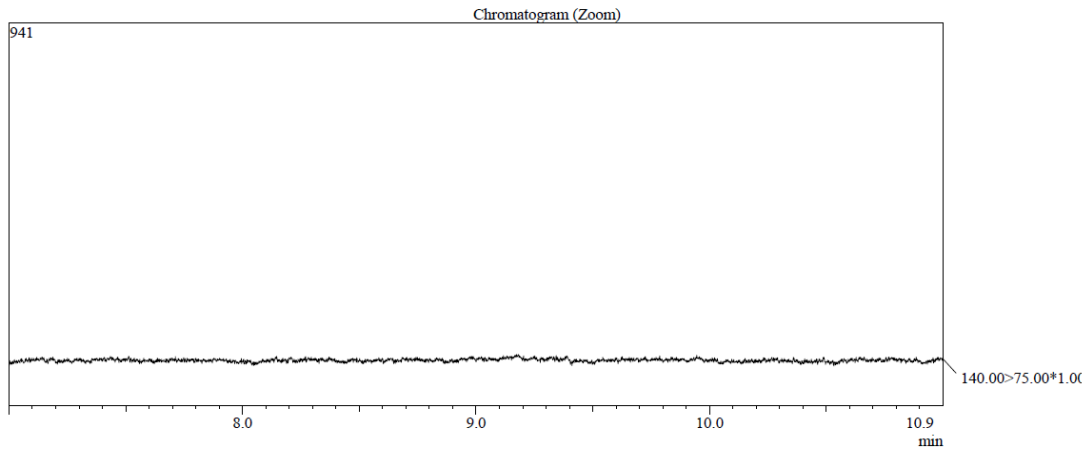
b) 100 ng/mL konsantrasyonunda SBMTE'ye ait kütle spektrumu.

Belirlenen metot koşullarında 100 ng/mL SBMTE standardı hazırlanarak Q3 SCAN modu ile analiz edildi. Yukarıda 100 ng/mL standart maddenin kromatogramı verilmiştir (Şekil 4.1.a). Pikin tepe noktası seçilerek, o noktaya ait kütle spektrumu şekil 4.1.b'de görülmektedir. Seçilen kütle spektrumu NIST kütüphanesinde taratılmıştır. Bulunan kütüphane sonucuna göre % 95 oranında SBMTE'ye benzerlik sağlanmıştır. Aşağıda verilen 2. spektrum kütüphanede SBMTE'ye karşılık gelen

spektrumdur (Şekil 4.2). Ayrıca analiz edilen 20 adet kör örneğin hiçbirisinde SBMTE maddesine rastlamadık (Şekil 4.3). Bu durum, literatürde yer alan diğer çalışmalarda da raporlandığı üzere SBMTE'nin, SM için seçici bir biyobelirteci olduğunu gösterebilir.



Şekil 4.2. SBMTE'ye ait referans kütüphane spektrumu



Şekil 4.3. SBMTE maddesine ait yapılan çalışmalarda kör örnek kromatogramı

## 4.2.YÖNTEM DEĞERLENDİRME VE VALIDASYONU

SBMTE için 6 noktalı (2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 ve 25 ng/mL) kalibrasyon doğrusu oluşturuldu ( $r^2=0,996$ ) (Şekil 4.4). Yöntem sinyal/gürültü oranı 3/1' e göre LOD'si 1 ng/mL; sinyal/gürültü oranı 10/1 e göre LOQ'sü 2,5 ng/ml olarak belirlendi (60). SBMTE için geliştirilen GCMSMS yönteminin validasyonu FDA (Amerika Gıda ve İlaç Ajansı) biyoanalitik validasyon ve kromatografik yöntemlerin validasyonu kılavuzlarına göre yapıldı (61, 62).

### 4.2.1.Tekrarlanabilirlik

SBMTE'ye ait 6 farklı konsantrasyonda (2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 ve 25 ng/mL) hazırlanan standart solüsyonlar gün içinde 3 kez duplike olarak ve 3 gün süreyle çalışıldı. SD ve aritmetik ortalama değerlerinden hesaplanan %CV değerleri çizelge 4.1 ve çizelge 4.2'de sunuldu. Buna göre tüm konsantrasyonlarda elde edilen en yüksek gün içi CV değeri % 6,46 ve günler arası CV değerinin % 4,01 olduğu gözlemlendi. FDA biyoanalitik yöntem validasyon klavuzunda CV değerinin % 15'den fazla olmaması gerektiği, ancak LOQ düzeyinde % 20'ye kadar olan CV değerlerinin kabul edildiği bildirilmiştir (61, 62). CV değerinin % 15'in altında olması kabul edilebilir düzey olarak değerlendirildiğinden, elde ettiğimiz sonucun geçerli olduğu sonucuna ulaşıldı.

$$\% CV = (\text{Standart sapma} / \text{ortalama}) \times 100$$

**Çizelge 4.1.** Gün içi CV değerleri

Konsantrasyon (ng/mL)	1. Gün		2. Gün		3. Gün	
	Ortalama (ng/mL)	CV (%)	Ortalama (ng/mL)	CV (%)	Ortalama (ng/mL)	CV (%)
2,5	2,66	4,03	2,74	3,79	2,82	3,94
5	5,13	4,01	5,22	4,64	5,45	2,29
7,5	7,52	2,02	7,65	1,95	7,74	1,15
10	10,12	3,01	10,14	3,12	10,21	3,34
12,5	12,63	2,79	12,60	2,76	12,71	3,91
25	25,11	2,02	25,57	5,53	25,47	6,46

**Çizelge 4.2.** Günler arası CV değerleri

Konsantrasyon (ng/mL)	Ortalama (ng/mL)	CV (%)
2,5	2,74	2,27
5	5,27	3,06
7,5	7,64	1,29
10	10,35	3,26
12,5	12,76	4,01
25	25,38	2,45

#### 4.2.2.Doğruluk

Analitik doğruluk, ölçülen değer in asıl değere olan yakınlığını ifade eder ve “bias” ile gösterilir. SBMTE ölçümüne ait bias verileri çizelge 4.3’de sunuldu.

$$\% \text{ Bias} = 100 \times (\text{Ölçülen değer} - \text{Asıl değer}) / \text{Asıl değer}$$

**Çizelge 4.3.** SBMTE için belirlenmiş 6 farklı konsantrasyonda doğruluk ve bias değerlendirmesi

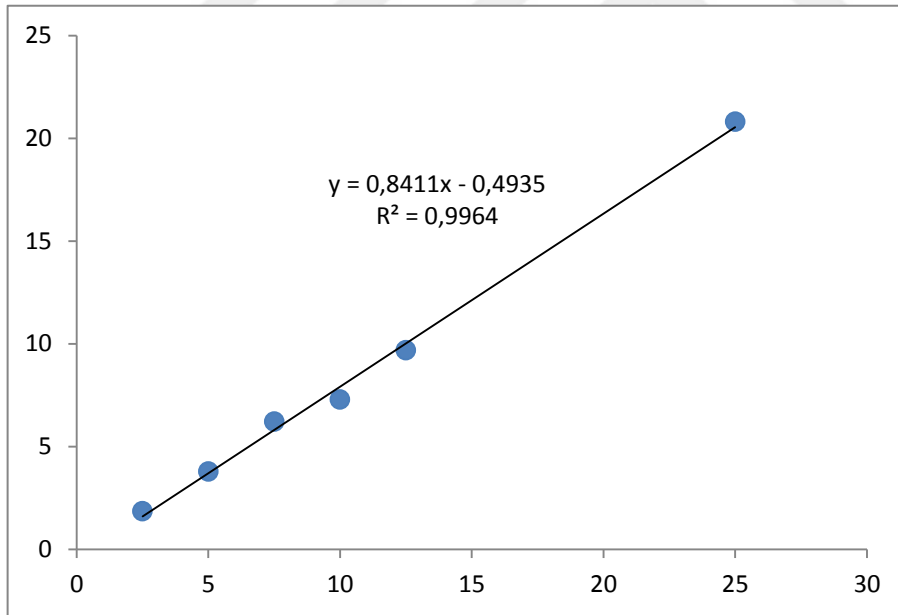
Asıl Değer (ng/mL)	Ölçülen Değer (ng/mL)	Ort.Geri Kazanım (%)	Bias (%)
2,5	2,7	108,4	8,4
5,0	4,96	99,2	-0,8
7,5	7,3	96,8	-3,2
10	10,33	103,3	3,3
12,5	13,05	104,4	4,4
25,0	27,1	108,5	8,5

#### 4.2.3. Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)

2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 ve 25 ng/mL konsantrasyonlarda çalışma örnekleri hazırlandı ve her bir örnek 20 tekrarlı olarak çalışıldı. LOD ve LOQ değerleri sinyal/gürültü oranının (S/N) oranı yöntemine göre yapıldı. Buna göre, S/N oranının en az 3:1 olduğu konsantrasyon LOD olarak ve S/N oranının en az 10:1 olduğu konsantrasyon ise LOQ (Limit of Quantitation) olarak kabul edildi. LOD değeri 1 ng/mL, LOQ değeri 2,5 ng/mL olarak tespit edildi (60).

#### 4.2.4. Doğrusallık

SBMTE analiti için; kör dahil 7 farklı konsantrasyonda (2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 ve 25 ng/mL) hazırlanan çalışma örnekleri GCMSMS cihazında analiz edilerek kalibrasyon doğrusu çizildi. Elde edilen kalibrasyon doğrusundan regresyon denklemi hesaplandı ve Şekil 4.4’de sunuldu.



Şekil 4.4. SBMTE için çizilen kalibrasyon doğrusu

## TARTIŞMA

Modern anlamda kimyasal silahların kullanımı, ilk kez I. Dünya Savaşında 22-24 Nisan 1915 tarihinde Ypres / Belçika'da klor gazı ile başladı. Kimyasal silahların kullanımı arttıkça, gaz maskeleri, kişisel koruyucu elbise ve ekipmanlar geliştirilmiş ve tedavi / dekontaminasyona yönelik AR-GE çalışmalarına daha büyük önem verilmişti. Bugün çok daha gelişmiş modelleri bulunan tam yüz / yarım yüz maskeler ilk kez I. Dünya Savaşı sırasında kullanılmıştı. Bununla beraber, I. Dünya Savaşı sırasında savaş alanındaki yaralanmaların büyük bir kısmından SM sorumlu idi. SM cildi, gözleri ve akciğerleri hedef alarak bu acımasız savaş oyununda çok sayıda askeri etkisiz hale getirmişti. Maruziyet sonucu ortaya çıkan yaralanmaların dramatik görüntüsünün askerler üzerinde büyük bir psikolojik etkisi vardı. Bu da SM'ı stratejik olarak da müthiş bir tehdit haline getirmekle beraber bu dönemde SM gazı "savaş gazlarının kralı" olarak tabir edilmiştir (3, 29).

Ülkemiz KBRN ajanlarına bağlı tehdidin en yüksek olduğu Ortadoğu coğrafyasına komşuluk yapmakta, gerek bu konumu, gerekse üç kıta arasında geçiş basamağında bulunması açısından bu tehdidin ortasında yerini almaktadır. Irak, Mart 2009'da iki adet sığınakta bilinmeyen miktarda kimyasal silah stoğu olduğunu KSYÖ'ne beyan etti ve belirsiz güvenlik durumundan dolayı imha faaliyeti ancak 2017'de başladı (63). 13 Mart 2018'de KSYÖ, Irak'ın tüm kimyasal silahlarının imha edildiğini açıklamış olsada Irak'daki mevcut kaotik durum göz önüne getirilirse kimyasal silahlarla ilgili açıklamalara şüpheyle yaklaşmanın uygun olacağı değerlendirilmektedir. Nihayet Suriye'ye gelindiğinde Suriye rejimi Temmuz 2012'de kimyasal silahlara sahip olduğunu açıklamıştı. Zaten bu duyurudan birkaç yıl önce, ABD istihbaratı Suriye'nin yakıcı ajanlar, sarin ve VX gibi sinir ajanları da dahil olmak üzere kimyasal silah stoğu olduğunu raporlarında belirtmişti. Dahası, 2002'de yazılmış olan ulusal güvenlik arşivlerinde (National Security Archives, 11 Eylül 2002) yer aldığı üzere, Suriye bu ajanları hava bombaları, balistik füzeler ve topçu roketleri ile kullanma kabiliyetine sahipti (64).

2012 yılının Aralık ayından itibaren Suriye'nin çeşitli bölgelerinde küçük çaplı kimyasal silah saldırılarına bağlı ölüm ve yaralanmaların olduğu bildirilmiş, Fransa ve ABD istihbaratı kimyasal silah kullanıldığını doğrulamış olsa da Birleşmiş Milletler (BM), Dünya Sağlık Örgütü ve KSYÖ koordineli olarak

Suriye'deki kimyasal silahların kullanımı hakkında yürüttükleri soruşturma çerçevesinde kullanılan kimyasal silahların türü ve kim tarafından kullanıldığı belirlenemese de 2013 yılının Mart - Nisan aylarında Suriye'de dört kez kimyasal silah saldırısı yapıldığına dair kanıtlar olduğunu raporladılar (65). 21 Ağustos 2013 tarihinde Şam'da gerçekleştirilen saldırı sonrası 14 Eylül 2013'de ABD ve Rusya, Suriye'nin kimyasal silahlarının muhasebesi, denetimi, kontrolü ve ortadan kaldırılması için ayrıntılı bir plan üzerinde anlaşmaya vardı ve planın KSYÖ tarafından onaylanmasını sağladı. Bu planda, Suriye'nin “bir hafta içinde” kimyasal silah stoklarının beyanı, Suriye'deki tüm kimyasal silah sahalarna KSYÖ ve BM erişiminin sağlanması, KSYÖ müfettişlerinin ilk incelemelerini Kasım 2013 tarihine kadar tamamlamaları, Suriye'nin 2014 yılının ilk yarısında kimyasal silah stoklarının imhası yer almakta idi. 16 Eylül 2013 tarihinde zamanın BM Genel Sekreteri Ban Ki-moon'un Suriye'de kimyasal silah kullanımına ilişkin sunduğu BM soruşturması kapsamındaki raporda, kimyasal silahların 21 Ağustos 2013 tarihinde “nispeten büyük ölçekte” kullanıldığı ve kurbanların sivilleri de kapsadığı açıklandı (65). Raporda, ayrıca sarinin hem çevrede hem de saldırının kurbanlarında mevcut olduğuna dair kanıtlara yer verildi. 20 Eylül 2013 tarihinde, ABD ve Rusya ile müzakere edilen anlaşma şartlarına uygun olarak Suriye, KSYÖ'ye kimyasal silah stoklarının bildirimini sundu. 12 Aralık 2013 tarihinde Suriye'de kimyasal silah kullanımını inceleyen BM ekibi tarafından sunulan son raporda, araştırılan yedi saldırının beşinde kimyasal silahların kullanıldığı ve sarin gazının, 21 Ağustos 2013'de Şam'da bir banliyöde büyük çaplı bir saldırıda kullanıldığı belirtildi. Suriye'de kimyasal silah stoğunun yüzde 45'inden fazlasının imha edildiği sıralarda, 11 Nisan 2014'de Kuzeypbatı Suriye'de muhalif güçlerin kontrolündeki bir köy olan Kafr Zita'da klor gazı bombalarıyla bir saldırı düzenlendiği bilgisi geldi ve KSYÖ tarafından 10 Eylül 2014'de Suriye'de klor gazı kullanıldığı doğrulandı (65). İnsan Hakları İzleme Örgütü, bu saldırıyla birlikte bugüne kadar yapılan saldırılarda 200'den fazla kişinin klor gazına bağlı olarak öldürüldüğünü tahmin ediyordu. 23 Haziran 2014'de KSYÖ Direktörü Büyükelçi Ahmet Üzümcü, Suriye'nin kimyasal silahlarının tamamının imha edilmek üzere Suriye'den taşındığını açıkladı ve bu kimyasal silahların içerisinde büyük miktarlarda sülfür mustard ajanının mevcut olduğunu belirtti (65). Ayrıca, 6 Kasım 2015 tarihinde KSYÖ'den yapılan basın

açıklamasında, 21 Ağustos 2015 tarihinde Kuzey Suriye'nin Marea şehrinde düzenlenen bir saldırıda sülfür mustard kullanıldığı iddia edildi ve beraberinde küçük çaplı kimyasal silah saldırılarının gerçekleştirildiği bildirildi. 4 Nisan 2017'de Suriye'nin kuzeyinde İdlib'te çok sayıda insanın öldüğü saldırıda kullanılan ajanın sarin gazı olduğunu KSYÖ doğruladı (65). Son olarak 13 Ocak 2018 ve 22 Ocak 2018 saldırılarının ardından Şubat ve Nisan ayları başında Duma / Suriye şehrinde 2018 yılı içerisinde dördüncü kez kimyasal silah saldırısının yapıldığı deklare edildi. Suriye'de şimdiye kadar yaşanan tüm kimyasal saldırıların kronolojisine baktığımızda ülkemizin ne kadar büyük bir tehlikenin eşiğinde olduğu rahatlıkla anlaşılmaktadır. Böylesine büyük bir felaket sınırlarımıza bu kadar yakın yaşanırken, biz de kimyasal savaş ajanlarının tanısına yönelik görevimizi bu çalışma ile pekiştirdik.

Sülfür mustard, kimyasal silah olarak kullanılmak üzere sentezlenmiş yoğun kıvamlı bir sıvıdır. Saf iken kokusuzdur fakat diğer kimyasallarla karıştırıldığında hafif bir sarımsak kokusu verir. Yağ, alkol ve benzin içerisinde kolaylıkla, su içerisinde birkaç dakikada ve distile su içerisinde daha yavaş çözünür. Çözünürken su ile reaksiyona girer ve farklı kimyasallara dönüşür. SM'in, gözden ve ciltten emilmesi veya buharının solunması yoluyla vücuda kolayca ve hızlıca girebilir. Giysilerden kolaylıkla geçebilir. SM vücutta başka kimyasallara dönüşür ve bunlar birkaç hafta içinde vücuttan idrarla atılır (66).

Toksikokinetik çalışmalarda, SM'nin doku dağılımının, hayvanlarda intravenöz ve intraperitoneal yoldan maruziyeti ile insanların göz, cilt ya da solunum yoluyla maruziyeti verilerinin birbirine benzemediği görülmüştür. Sülfür mustard'ın inhalasyon ve/veya cilt maruziyetinden 7 gün sonra ölen İranlı askerde doku dağılımı beyin > böbrek > karaciğer > dalak > akciğer şeklinde görülmüş iken; radyoaktif işaretli SM'nin sıçanda intravenöz enjeksiyonundan 4 gün sonra doku dağılımı böbrek > akciğer > karaciğer > dalak > beyin şeklinde izlenmiştir. Bu kapsamda, maruziyet yolu SM için önemli bir toksikokinetik faktör gibi görünmektedir (66).

Sülfür mustard, intramoleküler döngüde hiperaktif bileşiğini oluşturma eğilimindedir (Şekil 2.3 ve 2.4). Bu dönüşüm, göz gibi mukozal dokularda daha kolaydır. SM'in ara ürünleri; protein ve nükleik asitlerin sülfhidril (-SH) ve amino (-



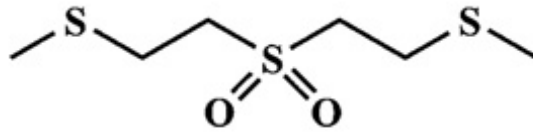
NH<sub>2</sub>) grupları gibi elektrondan zengin moleküller ile reaksiyona girer ve onları alkilerler. Metabolik yolların, DNA kalıntıları ve idrar metabolitlerini oluşturmak üzere doğrudan alkilasyon reaksiyonlarını, glutatyon reaksiyonlarını, hidroliz ve oksidasyon reaksiyonlarını içerdiği varsayılmaktadır (66).

SM' nin vücutta metabolize olması ve oluşan metabolitlerinin kan ve idrar örneklerinde tespiti çok zor değildir. Bu metabolitlerin homojenize dokulardan veya kandan ekstraksiyonu, organik solventler (diklorometan, metanol, asetonitril, etil asetat vb.) ile gerçekleştirilir. Katı faz ekstraksiyonu yöntemi ise kan ya da idrar gibi bir matriksten yabancı protein ve hidrokarbonların arındırılması için kullanılır ve bu yöntemde analizi yapılacak maddenin diğer maddelerden ayrılması, söz konusu madde molekülleriyle tutucu madde molekülleri arasındaki etkileşimler sayesinde olmaktadır. Analiz için nonpolar kılcal kolonlara sahip GC-MS-MS veya GC-MS kullanılabilir. Kan ve doku örneklerinde SM'nin tespiti amacıyla özellikle termal desorpsiyonlu iki boyutlu GC-MS kullanılması önerilmektedir (67). Bu yöntemde, numunenin bir çözücü içerisinde alınmasını müteakip, çözücünün bulunduğu tüp zayıf bir azot akışı altında GC-MS'in termal desorpsiyon ünitesine yerleştirilerek cihaza verilir. Bu yöntemde raporlanan tespit sınırı kan ve dokuda 10 pg/mL'dir. BM'in bu yöntemle kimyasal silah kullanımını tespit etmek için yaptıkları çalışmalarda, İran-Irak savaşındaki bir yaralıdan alınan saç numunesinde, diklorometan içerisinde 0.5-1 ppm'lik bir konsantrasyonda SM tespit edilmiştir. Maruziyetten 7 gün sonra alınan postmortem insan doku örneklerinde akciğerlerde, böbrekte ve beyinde 0,8–10,7 µg/g konsantrasyonlarda ve yağ dokusunda 15.1 µg/g konsantrasyonlarda SM tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, adipoz dokularda birikmiş SM'nin, hayvanlarla yapılan testlerin aksine daha uzun süre vücutta kalabileceğini göstermiştir (67).

Beta Liyaz metabolitleri; SM'a özgü biyobelirteçlerdir ve tespiti (0.1-0.3 ng/mL), SM maruziyetinin ikna edici bir kanıtıdır. Retrospektif bir çalışmada Birinci Dünya Savaşı sırasında SM ile yaralanan iki askerden 2-3 gün sonra alınan idrar örneklerinde 52-80 ng/mL konsantrasyonunda TDG ve 42-57 ng/mL konsantrasyonunda beta liyaz metaboliti tespit edilmekle beraber, yine retrospektif başka bir çalışmada maruziyetten 13 gün sonra alınan idrarlarda beta liyaz

metabolitlerinin konsantrasyonu, 0.1-5 ng/mL iken; TDG konsantrasyonu 11-72 ng/mL ile yüksekliğini koruduğu görülmüştür (67).

GC-MS-MS ile yapılan analizlerde, beta liyaz metabolitlerinden SBMTE (1,1-sulfonylbis[2-(methylthio)ethane])' nin (Şekil 5.1) tespitine yönelik ön işlemler  $TiCl_3$ , NaOH ve HCl gibi bir çok kimyasal gerektirmektedir ve numune hazırlama prosedürü zaman alıcıdır. Numune hazırlama prosedürünü önemli ölçüde basitleştiren ve analiz süresini kısaltan HPLC-MS/MS tekniği bu tür metabolitleri belirlemek için güvenilir ve kullanışlı diğer bir teknik olarak öne çıkmaktadır (67).



**SBMTE**

**Şekil 5.1.** SBMTE (1,1-sulfonylbis[2-(methylthio)ethane]) kimyasal yapısı (68)

Gaz kromatografisi (GC) bilim ve teknolojinin birçok dalında yaygın olarak uygulanan bir tekniktir. Yarım yüzyılı aşkın bir süredir GC, bir karışım içerisinde bulunan bileşenlerin hangi oranda var olduklarını belirlemede temel bir rol oynamıştır. Bununla birlikte, bu belirsiz ve indirgenmiş bileşiklerin kimyasal yapısını çözümlmek ve miktar tayini yapabilmek için spektroskopik bir tespit sistemi gerekir. Bu amaçla, molekülün "parmak izi" olarak da adlandırılan kütle spektrumunu elde etmeye yarayan Spektrometrik Kütle Dedektörü (MSD) en sık kullanılan dedektördür. Yüksek çözünürlüklü bir kütle spektrometresi, molekülün geometrisi ve izomerizmi, molekül ağırlığı, elemental kompozisyonu ve fonksiyonel grupların varlığı hakkında bilgi verir (69).

Gaz kromatografisinde, bir çözücü veya Katı Faz Mikro Ekstraksiyon (SPME) gibi bir sistem kullanılarak katı bir yüzeyden adsorbe edilen moleküller analiz edilebilir. Burada hareketli faz gazdır. Sabit faz ise genellikle sıvıdır ama katı veya katı-sıvı kombinasyonları da kullanılır. Gaz kromatografisinde analizi yapılacak maddelerin mutlaka gaz fazında olması gerekir. Analizi yapılacak numune, hızlı bir şekilde GC'ye transfer edilirken, nispeten yüksek bir sıcaklıkta (200-300 °C)

muhafaza edilen bir bölgeye aniden maruz bırakılarak gaz haline dönüştürülür ve taşıyıcı bir gaz (Ar, He, N<sub>2</sub> veya H<sub>2</sub>) ile karıştırılır. Bu gaz halindeki karışım, kromatografik kolon olarak adlandırılan ince polimer bir film kaplanmış silika yapısında kılcal bir tüpe girer. Karışım kolonda ilerlerken, moleküller taşıyıcı gaz (hareketli faz) ile polimer kaplı alan (sabit faz) arasında başlıca kimyasal yapılarına bağlı olarak ayrılırlar (69).

Kromatografik kolon diye adlandırılan bu kısım sonundaki algılama sisteminde moleküller fiziksel (termal iletkenlik) ve fizikokimyasal (iyonlaşma, elektron yakalama) özelliklerine göre bir elektriksel sinyal olarak tanınırlar ve bu elektrik sinyali kütle dedektöründe işlenerek kromatogram adıyla zamanla ilişkili bir grafik halinde görüntü verir (69).

Çalışmamızda tespit edebildiğimiz yeterli düzeyde sülfür mustard biyobelirteçlerini teşhis etmeyi, insanda SM maruziyetini kanıtlayabilecek hızlı, duyarlı ve güvenilir bir yöntem geliştirmeyi amaçladık. Geliştirdiğimiz bu çalışma, kimyasal savaş ajanlarının laboratuvar analizinde ulusal anlamda bir metot oluşturulmasına ön ayak olabilecektir.

Bilim adamlarının yaptığı araştırmalar ve bu araştırmaların sonuçları beta liyaz metabolitlerinin sülfür mustard maruziyetine spesifik iyi bir biyobelirteç olduğunu göstermektedir (1). Bu kapsamda ve yukarıda belirtilen hedefler ışığında, SM'ye özgü bir idrar biyobelirteci olan SBMTE'nin tespit edilmesine yönelik ülkemiz ve laboratuvarımızın koşullarına uygun araştırmalar yapmaya yöneldik. Çalışmamızda idrar örnekleri TiCl<sub>3</sub> ile muamele edilerek, SM'nin metabolize edilmesi ile ortaya çıkan iki analiti (SBMSE ve MSMTESE) tek bir analite (SBMTE) indirgeyerek verimi arttırmak ve gerek ön işlemlerden gerekse gaz kromatografisi cihazına verilen örnek sayısından tasarruf sağlamaktı. Hedeflenen SBMTE, disülfid formda olup, mono ve disülfoksit formları olan SBMSE ve MSMTESE'den daha az polar olması nedeniyle, örneklerin hazırlanması aşamasında idrardan izolasyonu daha kolay olmaktadır.

Young ve ark.nın yaptığı bir çalışmada analitin elüsyonu için metanol, diklorometan, aseton, etil asetat ve asetonitril kullanılmıştır (58). Bu çalışmada diklorometan/asetonitril (3:2) çözücüsünden iyi sonuçlar alınmıştır. Katı faz ekstraksiyonu müteakip SBMTE analitini metanol, kloroform, izopropanol ve

asetonitril gibi çözücülerin içinde çalıştık. Metanol içerisinde gaz kromatografisi cihazına verilen örneklerde; taban çizgisinin düşüklüğü (base line) ve pikin keskinliğine göre, en iyi sonucu elde ettik. Young ve ark. yaptıkları stabilite testlerinde SBMTE'nin -70 °C'de 10 yıl, -20 °C'de de en az 7 gün boyunca stabil kalabildiğini raporlamışlardır (58).

Çalıştığımız yöntem ile 3 saat içinde numuneleri cihaza verilebilir hale getirmek suretiyle hızlı bir numune hazırlama prosedürü oluşturuldu. Ayrıca yöntemimiz ile toplam analiz süresini temel aldığımız metottan 3 dk daha azalttık. Böylece bir numunenin GCMSMS ile çalışılma süresi 16 dakikadan 13 dakikaya düştü. Bu kapsamda laboratuvarımıza gelecek her 100 numunede yaklaşık 5 saat bir zaman tasarrufu sağlanabilmektedir. Bu da raporlamanın daha hızlı ve güvenilir olmasını, çünkü tek numune üzerinde istenirse daha fazla sayıda çalışma olanağı sağlamaktadır.

SBMTE; GC-MS cihazında çok uzun süreli kalıcı kirlilik yaratmasına rağmen, vial içerisinde hazırladığımız örnekler GC arayüzünün, enjeksiyon bloğunun ve MS'in kapsamlı bakımını gerektirmeyecek kadar temiz bir analiz imkanı sağlamaktadır. Cihazdan cihaza değişmekle birlikte cihazımızın rutin bakım prosedürüne göre 200 örnekte bir rutin GC bakımı gerekirken bizim, cihazda örnek okutma prosedürümüz ile bu sayıyı 500 örnekte bir olacak kadar yükselttik. Örnek okutma prosedürümüzde her SBMTE örneğini 3 kez okuttuktan sonra arada 1 kez metanol ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Ayrıca her 250 örneğin çalışılmasının ardından enjektörü enjeksiyon bloğundan çıkartıp aseton ile temizlemekle birlikte; prerun 3 kez ve postrun 9 kez olmak üzere asetonitril ve metanol solventlerinin enjeksiyonuyla cihazın arayüzünün temiz kalmasını sağladık. Bu temizleme prosedürü SM'nin üriner metabolitlerinin analizi için diğer yöntemlere göre GC-MS/MS cihazına daha az bakım yapılmasını gerektirmiştir.

Numune hazırlama prosedürü temiz sonuçlar vermesine rağmen analizin duyarlılığını ve seçiciliğini artırmak için üçlü kuadropollu Gaz kromatografisi ardışık kütle spektrometresi (GCMSMS) kullandık. Yöntemimizde kullandığımız sıvı-sıvı ekstraksiyon ve katı faz ekstraksiyon tekniği ve Elektron iyonizasyonuna (EI) bağlı GCMSMS ile 1 ng/ml'lik bir LOD (limit of detection, tespit limiti) ile iyi bir seçicilik ve yeterli hassasiyet sağlandı.

Hua ve ark.nın yaptığı bir çalışmada belirtildiği gibi hem TDG hem de TDGO endojen kaynaklı olabilmekte ve invivo çalışmalarda 2-8 ng/ml arasında görülebilmektedir. İran-Irak Savaşında, SM'ye deri yoluyla maruz kalmış olan yaralılar üzerinde yapılan çalışmalarda, önemli miktarlarda tiyodiglikolün maruziyetten sonraki 2 haftaya kadar idrarda bulunabildiği görülmüştür (66) fakat klinik olarak belirti ve bulguları olmaksızın TDG ve TDGO SM'nin spesifik bir biyobelirteci olarak değerlendirilmemektedir (1). Yine aynı çalışmada hasta idrarlarında TDGO düzeylerinin TDG'den daha yüksek olduğu görülmüş ve konsantrasyon-zaman profiline bakıldığında her ikisi de maruziyetten 3-4 gün sonra en yüksek seviyesinde iken 5.günden itibaren tedrici olarak azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte kan örnekleriyle yapılan çalışmalarda maruziyetten 48 saat sonra TDG ve TDGO saptanamamıştır (1).

Çalışmalarımızda kullanılan idrar miktarı 0,5 ml olup bir kimyasal saldırı durumunda yöntemimizde ihtiyaç duyulan idrar hacminin minimuma indirilmiş olması açısından çok değerlidir. Bu kapsamda, yalnız 1 ml idrar örneği, ajanı tanımlamak ve maruziyet derecesini değerlendirmek için birkaç farklı analiz yapmaya imkan vermesi açısından yöntemimizin hassas, güvenilir ve tekrarlanabilir olmasına imkan sağlamaktadır. Dahası semptomların henüz gelişmediği veya semptomlarla ilgili hiçbir bilginin bulunmadığı durumlarda yine yöntemimiz sayesinde SM maruziyetinin diğer vezikan ya da kimyasal ajanlara maruziyetten ayırt edilmesine yardımcı olabilir.

SMO (Okside sülfür mustard), SM'nin doğrudan oksidatif metabolitidir ve idrarda çok düşük seviyelerde olması nedeniyle SM biyobelirteci olarak dikkat çekmediği tespit edilmiştir. Buna rağmen SMO'nun endojen bir madde olmadığı düşünülürse SM'ye maruziyette önemli bir kanıt olarak değerlendirilmelidir. Beta liyaz metabolitleri de; TDG ve TDGO'dan farklı olarak SMO gibi sadece SM'ye maruz kaldıktan sonra üretilir (1).

SBMTE, SM'nin glutatyonla reaksiyonu sonucu üretilmesi nedeniyle maruziyetten sonra 3. günde en yüksek düzeyde saptanırken 4. günden itibaren zaman-konsantrasyon profiline TDG gibi tedricen değil, daha keskin bir düşüş gösterir. Bunun sebebi glutatyonun çok hızlı tükenmesidir. Dolayısıyla SM'nin glutatyon türevi olan beta liyaz metabolitlerinin (SBMTE, SBMSE ve MSMTESE)

idrarda ölçüm konsantrasyonunun zamanla olan ilişkisi bireysel metabolizma hızı ve glutasyon miktarına bağlıdır (1).

Black ve ark.(1991) yaptıkları çalışmada  $TiCl_3$  ile muamele edildikten sonra  $75^{\circ}C$  de 15 dakika inkübasyonla SBMSE ve MSMTESE'nin %95'in üzerinde SBMTE'ye dönüştüğünü göstermiştir (70). Lin ve ark. yaptıkları çalışmada  $TiCl_3$  in arta kalan miktarını parçalayıp ortamdan uzaklaştırmak amacıyla çözeltiliye 660-700  $\mu l$  hacminde 5 mol/L NaOH eklemiştirler. Sonrasında pH test kağıdıyla çözeltilinin pH değerini ölçmüşler ve en iyi SBMTE (1,1'-sulfonylbis[2-(methylthio)ethane) geri kazanımının pH 7-12 arasında olduğunu görmüşlerdir (4). Yine aynı çalışmada 800  $\mu l$  hacminde 5 mol/L NaOH eklendiğinde geri kazanım %50; 1mL eklendiğinde ise geri kazanım %30' lara düşmüştür. Biz çalışmamızda NaOH'i 5 M ve 6 M olmak üzere iki farklı konsantrasyonda hazırladık ve istenen pH değerine ulaşmaya çalıştık. Çözelti pH' sını dijital pH metre cihazıyla ölçtük.  $TiCl_3$  ile muamele edilmiş olan idrar örneğine 500  $\mu l$  5 M NaOH ve 250  $\mu l$  12 M HCl eklediğimizde örneğin pH'sı 1.00' in altında görüldü; 500  $\mu l$ , 5 M NaOH ve 200  $\mu l$  12 M HCl eklediğimizde ise örneğin pH'sı 1.18 olarak ölçüldü. Örneğe, 500  $\mu l$  6 M NaOH ve 250  $\mu l$  12 M HCl eklediğimizde örneğin pH değeri 4.60 oldu. Yine 500  $\mu l$  6 M NaOH ve 200  $\mu l$  12 M HCl eklediğimizde ise literatüre uygun pH değerine ulaşıldı. Böylece sonraki çalışmalarda,  $TiCl_3$  ilavesi ile düşen pH değerini, örneğe 500  $\mu l$  6 M NaOH ile beraber 200  $\mu l$  12 M HCl ilave ederek dengeledik. HCl ilave edildiği zaman çözelti kirli beyaz bir renk aldı. Daha sonra çözelti santrifüj işlemine bırakıldı. Yapılan çalışmalarda  $4^{\circ}C$ , 15000 rpm ve 10 dk süreyle santrifüje bırakılmış olan çözeltiyi biz oda sıcaklığında 9000 rpm ve 10 dk süreyle santrifüj işlemine bıraktığımızda çökeltinin ve şeffaf süpernatanın kesin olarak ayrıldığını izledik ve santrifüj hızındaki bu farklılığın sonuçlarımızı etkilemediğini değerlendirdik. Santrifüj sonrasında tüpün dibindeki çökeltinin üzerinde kalan şeffaf renkli süpernatan kısım alınarak ön işlemlere devam edildi. Lin ve ark.nın yaptığı çalışmada ön işlemlerin santrifüj sonrası aşamasında SBMTE analitinin kromatogramı alındığında arka planı yüksek olan kötü bir kromatogram elde edilmiş olması nedeniyle çözeltilinin temizlenmesi gerektiği ve bu işlemi bir katı faz ekstraksiyon kartuşu ile devam ettirdiklerini ifade etmişlerdir (4). SPE işleminde onlar 4 farklı kartuş (AccuBond C8, AccuBondC18, Oasis HLB and Cleanert PEP) kullanmışlar ve farklı

konsantrasyonların geri kazanımı değerlendirildiğinde en iyi sonucu Oasis HLB kartuştan almışlardır. Young ve ark.nın çalışmasında ise Chem Elute kartuşları ile ekstraksiyondan elde edilen ekstraktların yeterli temizliği sağladığı raporlanmıştır fakat onlar muhtemelen GC-MS/MS analizlerinde kimyasal iyonizasyon yöntemini kullanmaları nedeniyle bu kartuştan iyi bir verim almış olabilirler (58). Biz çalışmamızda, SPE için C8 500mg/3 ml, ENV 200 mg/3 ml ve ENV 60 mg/3 ml kartuşları denedik. Bu kartuşlar arasında en iyi sonucu C8 kartuştan aldık. SPE sonrası SBMTE metabolitinin içine alındığı çözücü olarak asetonitril, metanol, kloroform ve izopropanol ayrı ayrı denendi. Taban çizgisinin (base line) en düşük olduğu ve en yüksek şiddette, keskin pik görüntüsü metanol çözücüsü içerisinde alındı. Yapılan bu çalışmada asidik, alkali interferanslar ile idrardaki tuzların arındırılması maksadıyla örnekler % 5 amonyak ve % 2 formik asit ile yıkanmıştır. Biz çalışmamızda SBMTE analitimizi elverişli ve düşük arka plan kromatogramıyla elde edebilmemiz nedeniyle ve aradığımız metabolitimizde daha fazla kayıp yaşamamak amacıyla bu yıkama işlemine gerek duymadık.

GC-MS/MS için analitik koşullarını yüksek duyarlılık ve seçicilik hedeflerimizi karşılayacak şekilde optimize etmeye çalıştık. Yapılan çalışmalarda mid-polar özellikte 17 MS kolon ve rölatif olarak polaritesi daha az olan 5 MS kolon karşılaştırılmış olup 17 MS kolonunun daha yüksek yoğunluk ve keskinlikte pik verdiği raporlanmıştır. MS yönteminde ise CI ve EI modları karşılaştırıldığında EI modunda daha yüksek hassasiyet elde edilmiştir. CI modunda daha az kapsamlı bir SPE prosedürünün yeterli olabildiği yapılan çalışmalarda izlenmiştir. Biz de bu yüksek hassasiyeti almak için MS metodunda EI modunu kullanmayı tercih etmekle birlikte SPE ön işlemini çok daha dikkatli ve temiz yaptık fakat kolon seçiminde mid-polar Rxi-5 MS kolonu kullandık. Bunun nedeni, literatürlerde adı geçen araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda kantitatif olarak ölçülebilecek minimum konsantrasyonda en iyi piki almayı hedeflerken; biz SM maruziyetini kanıtlayabilecek düzeyde en elverişli şiddette pik görmeyi yeterli gördük. Bu kapsamda mid-polar Rxi-5 MS kolon ihtiyacımıza yeterli cevabı verebilmiştir. Ayrıca kütle spektrometresi çoklu reaksiyon izleme (MRM) modunda çalıştırılarak yöntemin duyarlılığını ve güvenilirliğini arttırdık. Bu çalışmada ki en önemli dezavantajımız iç standartımızın bulunamayışı olmuştur. Bu çalışmada örnek

aldığımız makalelerde yer alan çalışmalarda SBMTE için iç standart olarak SBETE(1,1'-sulfonylbis[2-(ethylthio)ethane) analogu kullanılmıştır.

SBMTE için tandem kütle spektrometresinde geçiş iyonlarını seçmek amacıyla full scan modunda 1 ppm SBMTE (1,1'-sulfonylbis[2-(methylthio)ethane) stok solüsyonundan çalışıldı. Buna göre MRM geçişleri 140 → 75 m/z (prekürsör / ürün) iyon çiftleri kullanıldı. En yüksek yoğunluk, cihaz voltajı 6 V olduğunda elde edildi. SBMTE analiti için seçtiğimiz iyon çiftinin yapılan literatür taramasında da aynı kütle / yük oranında olan iyonlar olduğu ve aynı zamanda cihazın bize verdiği sonuçlar içerisinde 140 → 75 m/z iyon çiftinin oranı %100 iken; cihaz voltajı 27 eV olduğunda görülen 140 → 59 m/z iyon çiftinin oranının 1.21 olacak şekilde çok düşük kaldığı görüldü (Şekil 3.1 ve 3.2).

Sülfür mustard maruziyetini kesin olarak işaret eden beta liyaz metabolitleri (SBMTE, SBMSE ve MSMTESE) idrarda analiz edildi. Sonuçta tek bir SBMTE metabolitinin idrarda ölçülebilir düzeylerde kromatogramları alındı. Bu kromatogramlardaki pikler gürültü düzeyinin üzerinde teyit edilen iyonlar olarak değerlendirildi. SBMTE metabolitinin analiz sonuçları çizelge 4.1 ve 4.2'de sunulmuştur. SBMTE metaboliti için ölçülebilir minimum konsantrasyon 1 ng/ml'dir. Bu nedenle, LOD değeri 1 ng/ml olarak değerlendirildi. Beta liyaz metabolitlerinin yarılanma ömrü 1 günden daha azdır. Bu nedenle hazırlanan konsantrasyonlarda (1; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 ve 25 ng/mL) mümkün olduğunca kısa sürede, hızlı ve tekrarlı çalışmayı gerektirmektedir.

Yöntem sistem uygunluk testleri duyarlılık, doğrusallık, doğruluk ve kesinlik validasyon parametreleri incelenerek valide edildi.

Sistem uygunluk testleri enjeksiyon tekrarlanabilirliği, SBMTE için sonuçlar incelendiğinde (Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2) elde edilen değerlerin FDA kılavuzlarına göre kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu görüldü (62). Geliştirilen kromatografik yöntemin SBMTE'nin analizi için uygun koşullar taşıdığı sonucuna varıldı.

LOQ ve LOD değerleri S/N oranına göre belirlendi. LOD 1 ng/mL, LOQ ise 2,5 ng/mL olarak bulundu. FDA biyoanalitik yöntem validasyonu kılavuzunda LOQ düzeyinde kesinliğin % 20'den az ve doğruluğun % 80-120 arasında olması



gerektiği bildirilmiştir. Yöntemde LOQ düzeyinde hesaplanan %CV değeri, % 108.40 bulundu. Bu nedenle 2,5 ng/mL LOQ olarak seçildi.

Yöntemin doğrusallığı 2,5-25 ng/mL aralığında araştırılmıştır. Kalibrasyon doğrusundan elde edilen tanımlayıcılık katsayısı ( $r^2$ ) 0.9964 olarak bulunmuştur. Ayrıca FDA biyoanalitik yöntem validasyonu kılavuzunda, LOQ ve kalibrasyon doğrusunun en üst noktasını içine alan en az dört nokta belirlenerek bu noktalarda hesaplanan konsantrasyon ile gerçek konsantrasyon arasında farkın standart sapmasının, LOQ düzeyinde % 20`ye kadar, diğer konsantrasyonlarda % 15`e kadar olanları kabul edilir. Yöntemde kalibrasyon doğrusu üzerindeki her noktada hesaplanan SS değerleri % 15`in altında bulundu (Şekil 4.4).

GC-MS yönteminde kalibrasyon aralığında seçilen altı farklı konsantrasyonda (2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 25 ng/mL) gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları yapıldı. FDA biyoanalitik yöntem validasyonu kılavuzunda kesinliğin (%CV) ve doğruluğun (%Bias) % 15`den fazla olmaması, ancak LOQ düzeyinde % 20`ye kadar olan değerler kabul edilebilir. Yöntemde %CV değerleri % 4,01-2,27 ve %Bias değerleri % -3,2-8,5 arasında bulundu (Çizelge 4.3). Bu sonuçların ışığı altında gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk çalışmaları sonucunda yöntemin tekrarlanabilir ve doğru sonuçlar verdiği sonucuna varıldı.

Çalışmamıza başladığımız günden bugüne kadar geçen bir yıllık süre, idrar örneklerinde SM biyobelirteçlerini kapsamlı bir şekilde araştırabilmemiz için bize çok değerli bir zaman sağladı. Laboratuvarımızda optimizasyonu yapılan yüksek duyarlılık ve seçiciliğe sahip GC-MS/MS yöntemi kullanıldı. Bir numunenin doğrulama testleriyle birlikte çalışma süresi yaklaşık 4 saattir. Glutatyondan türetilen beta liyaz metabolitleri örneklerde başarıyla tespit edilerek yöntem geçerliliği doğrulandı. Bu kapsamda SM`ye maruz kaldıktan sonraki ilk 10 günlük süreçte, idrar örneklerinin SM maruziyetini gösteren çok değerli biyomedikal numuneler olduğu değerlendirildi.

## SONUÇLAR

Son yıllarda terörist örgütlerinin hedefi; devlet başkanları, askeri personel veya üst düzey bürokratlara saldırmayı değil, sivilleri imha etmeyi ve paniğe sürüklemeyi kendilerine hedef seçmişlerdir. Bu hedeflerine ulaşmalarını sağlayacak en ucuz ve kolay üretilen silahlar ise kimyasal silahlar olup, elde edilmesi, kullanım kolaylığı ve yaratacağı korkunun büyüklüğü nedeniyle en çok kullanılma ihtimaline sahip KSA'nın Sülfür Mustard (SM) olduğu düşünülmektedir. Kullanıldığı durumda kalıcılığını günlerce sürdürebilen SM ajanının toprak, su ve çevre materyalden dekontaminasyonu büyük öneme sahiptir.

1822 yılında ilk kez Alman bilim adamı Despretz tarafından keşfinden beri sıkça kullanılmış olan ve gelecekte de kullanılma potansiyeli son derece fazla olduğu değerlendirilen bu tehlikeli silah için insanda maruziyetini kesin olarak teşhis edebilecek hızlı ve güvenilir bir yöntem ihtiyacı vardır. Bu amaçla, dünyada bir takım gelişmiş laboratuvarlarda ileri teknolojik cihazlarla çalışmalar sürdürülmektedir. Ne yazık ki bu tehlikeli silaha maruziyetin yaşandığı komşu ülkelerimiz olmasına rağmen ülkemizde SM'nin tespit ve teşhisine yönelik herhangi bir laboratuvar çalışması mevcut değildir. Bunun başlıca nedeni SM ile çalışmanın güçlüğüdür. Çünkü lipofilik özelliği nedeniyle emilebilirliğinin son derece fazla olması, toksisitesinin çok yüksek olması ve DNA hasarına yol açarak kanserojen olması nedeniyle SM, araştırmacıları korkutmakta ve bu konuda çalışmak istenmemektedir. Dolayısıyla SM'in, en az biyogüvenlik düzeyi II olan bir laboratuvar; kimyasallara dayanıklı kişisel koruyucu kıyafet içinde, uygun cihazlarla ve çok dikkatli çalışma zorunluluğu vardır.

Tüm bu dezavantajlara rağmen, terör saldırılarından doğabilecek maruziyet riski yüksek olan ülkemizde, SM maruziyetini teşhis edebilecek kromatografik bir yöntemi, üzerinde bazı modifikasyonlar yaparak optimize ettik. Bu tez çalışması içerik olarak sülfür mustard kimyasal savaş ajanının metabolitlerinin bu ajana maruz kalmış insanların idrarlarından alınan örneklerin GC-MS/MS ile analizi üzerine yapılan kromatografik çalışmaları içermektedir. Çalışmamızda uygun deteksiyon limitlerinde sülfür mustard biyobelirteçlerini ölçebilmeyi ve insanda maruziyetini kanıtlayabilecek hızlı, duyarlı ve güvenilir bir yöntem geliştirmeyi ve aynı zamanda

bu metodun ülkemizin çeşitli laboratuvarlarında kolaylıkla uygulanabilir olmasını hedefledik. Bu kapsamda çalışmamızda uyguladığımız yöntem ile; yöntem üzerinde yapılan validasyon sonuçları dikkate alındığında uygun deteksiyon limitlerinde sülfür mustard biyobelirteçlerini ölçebildiğimiz görülmektedir.

Bu çalışmanın başlıca önemi, sülfür mustard ajanının kromatografik olarak analizi ülkemizde ilk kez yapıldı. Dünyada ise, bu analizi yapan sınırlı sayıda laboratuvar mevcuttur. Ayrıca bu çalışma, ülkemize analiz yeteneği kazandırmakla birlikte kimyasal bir savaş ajanının laboratuvar analizinde ulusal anlamda bir metot oluşturulmasına ön ayak olabilecektir.



## KAYNAKLAR

1. Xu H, Nie Z, Zhang Y, Li C, Yue L, Yang W, et al. Four sulfur mustard exposure cases: Overall analysis of four types of biomarkers in clinical samples provides positive implication for early diagnosis and treatment monitoring. *Toxicology Reports*. 2014;1:533-43.
2. Kehe K, Szinicz L. Medical aspects of sulphur mustard poisoning. *Toxicology*. 2005;214(3):198-209.
3. Tuorinsky SD, United States. Department of the Army. Office of the Surgeon General., Borden Institute (U.S.). Medical aspects of chemical warfare. Falls Church, Va. Washington, DC: Office of the Surgeon General Borden Institute For sale by the Supt. of Docs., U.S. G.P.O.; 2008. 135-6 p.
4. Lin Y, Dong Y, Chen J, Li CZ, Nie ZY, Guo L, et al. Gas chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of beta-lyase metabolites of sulfur mustard adducts with glutathione in urine and its use in a rabbit cutaneous exposure model. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014;945-946:233-9.
5. Mahdi Balali-Mood RM, Rene Pita, Paul Rice, James Romano, Horst Thiermann, Jan Willems. Practical Guide for Medical Management of Chemical Warfare Casualties. OPCW2016. 141 p.
6. Doç.Dr.Kd.Alb.Şahan SAYGI YDTYBB, Dr.Uzm.Tbp.Bnb.Levent KENAR. Kimyasal Atakta Tıbbi Savunma ve Pestisitler. TC Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı, Ankara,2003.
7. Sidell FR, Takafuji ET, Franz DRDVM. Medical aspects of chemical and biological warfare. Bethesda, Md.: Uniformed Services University of the Health Sciences; 1997.
8. Cornish P. The CBRN system : assessing the threat of terrorist use of chemical, biological, radiological and nuclear weapons in the United Kingdom. London: Chatham House; 2007.
9. Fraser TR. On the physiological action of the Calabar bean. *Journal of Anatomy and Physiology*. 1867;1(2):323.
10. Spinney L. The killer bean of Calabar. *New Scientist*. 2003;178(2401):48-9.
11. Hall AHe, Isom GEe, Rockwood GAe. Toxicology of cyanides and cyanogens : experimental, applied and clinical aspects. 1st ed.
12. Szinicz L. History of chemical and biological warfare agents. *Toxicology*. 2005;214(3):167-81.

13. Sezigen S. Sağlık kurumlarında kitlesel NBC (KBRN)) yaralanmalarına yönelik davranış modelinin oluşturulması [Doctora]: Gülhane Askeri Tıp Akademisi; 2009.
14. Bradberry SM, Vale JA. Poisons. Initial assessment and management. *Clin Med (Lond)*. 2003;3(2):107-10.
15. Broughton E. The Bhopal disaster and its aftermath: a review. *Environmental Health*. 2005;4(1):6.
16. Okudera H. Clinical features on nerve gas terrorism in Matsumoto. *J Clin Neurosci*. 2002;9(1):17-21.
17. Okumura T, Hisaoka T, Naito T, Isonuma H, Okumura S, Miura K, et al. Acute and chronic effects of sarin exposure from the Tokyo subway incident. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2005;19(3):447-50.
18. Prockop LD. Weapons of mass destruction: Overview of the CBRNEs (Chemical, Biological, Radiological, Nuclear, and Explosives). *J Neurol Sci*. 2006;249(1):50-4.
19. Arıkan D, Yetim H, Sağdıç O, Kesmen Z. Gıdalarda dioksin kontaminasyonu ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*. 2009;12(2):9-15.
20. Pita R, Domingo J. The use of chemical weapons in the Syrian conflict. *Toxics*. 2014;2(3):391-402.
21. Kilic E, Ortatatli M, Sezigen S, Eyison RK, Kenar L. Acute intensive care unit management of mustard gas victims: the Turkish experience(). *Cutan Ocul Toxicol*. 2018:1-6.
22. Sarıbeyoğlu M. Kitle imha silahlarının kullanımının yasaklanmasına ilişkin uluslararası düzenlemeler. 2004.
23. Worek Fe, Jenner Je, Thiermann He. Chemical warfare toxicology.
24. Hooijschuur EW, Kientz CE, Brinkman UA. Analytical separation techniques for the determination of chemical warfare agents. *J Chromatogr A*. 2002;982(2):177-200.
25. Ciner FL, McCord CE, Plunkett RW, Jr., Martin MF, Croley TR. Isotope dilution LC/MS/MS for the detection of nerve agent exposure in urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;846(1-2):42-50.
26. Gupta RCe. Handbook of toxicology of chemical warfare agents. Second edition. ed.

27. Brevett CA, Sumpter KB, Nickol RG. Kinetics of the degradation of sulfur mustard on ambient and moist concrete. *Journal of hazardous materials*. 2009;162(1):281-91.
28. Jung H, Kah D, Lim KC, Lee JY. Fate of sulfur mustard on soil: Evaporation, degradation, and vapor emission. *Environmental Pollution*. 2017;220:478-86.
29. Darchini-Maragheh E, Balali-Mood M. Delayed Complications and Long-term Management of Sulfur Mustard Poisoning: Recent Advances by Iranian Researchers (Part I of II). *Iranian journal of medical sciences*. 2018;43(2):103-24.
30. Kenar L, Boyunaga H, Serdar M, Karayilanoglu T, Erbil MK. Effect of nitrogen mustard, a vesicant agent, on lymphocyte energy metabolism. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2006;44(10):1253-7.
31. Ivarsson U, Nilsson H, Santesson J. A FOA briefing book on chemical weapons: threat, effects and protection: Forsvarets Forskningsanstalt; 1992.
32. Kenar L, Karayilanoglu T, Eryilmaz M, Ortatli M, Yaren H. Chemical release at the airport and lessons learned from the medical perspective. *J Hazard Mater*. 2007;144(1-2):396-9.
33. Jung H, Lee HW. Understanding evaporation characteristics of a drop of distilled sulfur mustard (HD) chemical agent from stainless steel and aluminum substrates. *J Hazard Mater*. 2014;273:78-84.
34. Malhotra RC, Ganesan K, Sugendran K, Swamy RV. Chemistry and toxicology of sulphur mustard - A review. *Defence Sci J*. 1999;49(2):97-116.
35. Ghabili K, Agutter PS, Ghanei M, Ansarin K, Panahi Y, Shoja MM. Sulfur mustard toxicity: history, chemistry, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Crit Rev Toxicol*. 2011;41(5):384-403.
36. Shooter K, Edwards P, Lawley P. The action of mono- and di-functional sulphur mustards on the ribonucleic acid-containing bacteriophage  $\mu 2$ . *Biochemical Journal*. 1971;125(3):829-40.
37. Kehe K, Thiermann H, Balszuweit F, Eyer F, Steinritz D, Zilker T. Acute effects of sulfur mustard injury--Munich experiences. *Toxicology*. 2009;263(1):3-8.
38. Etezzad-Razavi M, Mahmoudi M, Hefazi M, Balali-Mood M. Delayed ocular complications of mustard gas poisoning and the relationship with respiratory and cutaneous complications. *Clin Exp Ophthalmol*. 2006;34(4):342-6.
39. Rowell M, Kehe K, Balszuweit F, Thiermann H. The chronic effects of sulfur mustard exposure. *Toxicology*. 2009;263(1):9-11.
40. Schmidt A, Steinritz D, Rudolf KD, Thiermann H, Striepling E. Accidental sulfur mustard exposure: A case report. *Toxicol Lett*. 2017.

41. Balali-Mood M, Hefazi M. Comparison of early and late toxic effects of sulfur mustard in Iranian veterans. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2006;99(4):273-82.
42. Balali-Mood M, Hefazi M, Mahmoudi M, Jalali E, Attaran D, Maleki M, et al. Long-term complications of sulphur mustard poisoning in severely intoxicated Iranian veterans. *Fundamental & clinical pharmacology*. 2005;19(6):713-21.
43. Graham JS, Schoneboom BA. Historical perspective on effects and treatment of sulfur mustard injuries. *Chem Biol Interact*. 2013;206(3):512-22.
44. Jenner J, Graham SJ. Treatment of sulphur mustard skin injury. *Chem Biol Interact*. 2013;206(3):491-5.
45. Onur F. *Analitik Kimya II*. Ankara Üniversitesi Basımevi 2011.
46. Kenar L. Plazma serbest aminoasitlerinin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve elektrokimyasal dedektör (HPLC-ECD) ile ölçümü. Ankara: Gülhane Askeri Tıp Akademisi; 1996.
47. Uçaktürk E. Ezetimib'in Biyolojik Materyalden Analizi için Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi Yönteminin Geliştirilmesi [Doktora]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2012.
48. Vanninen P. Recommended operating procedures for analysis in the verification of chemical disarmament. University of Helsinki, Helsinki. 2017.
49. Khopkar SM. *Basic concepts of analytical chemistry: New Age International*; 1998.
50. Biberoglu G. Kütle spektrometresi ve tıp alanında kullanımı. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*. 2003;23(6):491-8.
51. Baird SN. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Quantitation: Applications and Methods: University of Kansas*; 2013.
52. Barr JR, Pierce CL, Smith JR, Capacio BR, Woolfitt AR, Solano MI, et al. Analysis of urinary metabolites of sulfur mustard in two individuals after accidental exposure. *J Anal Toxicol*. 2008;32(1):10-6.
53. Elsinghorst PW, Thiermann H, Koller M. Verification of chemical warfare agent exposure in human samples. *Toxichem Krimtech*. 2013;80(Spec Iss):288-92.
54. Riches J, Read RW, Black RM. Analysis of the sulphur mustard metabolites thiodiglycol and thiodiglycol sulphoxide in urine using isotope-dilution gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007;845(1):114-20.

55. Black RM, Read RW. Improved methodology for the detection and quantitation of urinary metabolites of sulphur mustard using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 1995;665(1):97-105.
56. Popiel S, Nawala J, Dziedzic D, Soderstrom M, Vanninen P. Determination of mustard gas hydrolysis products thiodiglycol and thiodiglycol sulfoxide by gas chromatography-tandem mass spectrometry after trifluoroacetylation. *Anal Chem.* 2014;86(12):5865-72.
57. Kenar LK, T; Kose, S. Laboratory conditions and safety in a chemical warfare agent analysis and research laboratory. *Military medicine.* 2002;167(8):628.
58. Young CL, Ash D, Driskell WJ, Boyer AE, Martinez RA, Silks LA, et al. A rapid, sensitive method for the quantitation of specific metabolites of sulfur mustard in human urine using isotope-dilution gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2004;28(5):339-45.
59. Steinritz D, Striepling E, Rudolf KD, Schroder-Kraft C, Puschel K, Hullard-Pulstinger A, et al. Medical documentation, bioanalytical evidence of an accidental human exposure to sulfur mustard and general therapy recommendations. *Toxicol Lett.* 2016;244:112-20.
60. Armbruster DA, Tillman MD, Hubbs LM. Limit of Detection (Lod) Limit of Quantitation (Loq) - Comparison of the Empirical and the Statistical, Methods Exemplified with Gc-Ms Assays of Abused Drugs. *Clin Chem.* 1994;40(7):1233-8.
61. Food and Drug Administration Technical Review Guide: Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, MD,. 1994.
62. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM): Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation 2018.
63. Kimball D. Chemical and Biological Weapons Status at a Glance. 2018.
64. Koblentz G. Syria's Chemical Weapons Kill Chain 7 Nisan 2017. Available from: <http://foreignpolicy.com/2017/04/07/syrias-chemical-weapons-kill-chain-assad-sarin/>.
65. Kimball DD, Kelsey. Timeline of Syrian Chemical Weapons Activity, 2012-2018 Mayis 2018. Available from: <https://www.armscontrol.org/factsheets/Timeline-of-Syrian-Chemical-WeaponsActivity>.
66. Rosemond ZA, Beblo DA, Amata R. Toxicological profile for sulfur mustard (UPDATE). US Department of Health and Human Services Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2003;80.



67. Orlova O, Savel'Eva E, Khlebnikova N. Methods for the detection of sulfur mustard metabolites in biological materials: An analytical review. *Journal of analytical chemistry*. 2013;68(1):1-11.
68. Li C, Chen J, Liu Q, Xie J, Li H. Simultaneous quantification of seven plasma metabolites of sulfur mustard by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013;917-918:100-7.
69. Stashenko E, Martínez JR. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Advances in Gas Chromatography*: InTech; 2014.
70. Black RM, Clarke RJ, Read RW. Analysis of 1,1'-sulphonylbis[2-(methylsulphinyl)ethane] and 1-methylsulphinyl-2-[2-(methylthio)ethylsulphonyl]ethane, metabolites of sulphur mustard, in urine using gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr*. 1991;558(2):405-14.

HİZMETE ÖZEL

T.C.  
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI  
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI  
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTAN BİLİMSEL YARDIMCILIĞI  
ANKARA

ETİK KRL. : 50687469-1491 - 391 - 16/1648- 1235

06 Mayıs 2016


KONU : GATA Etik Kurulu Kararı.

Yrd. Doç. Hv. Tbp. Yb. Sermet SEZİGEN'e

İLGİ : GATA K.İğininin 19 Ağustos 2014 tarihli, HRK.EĞT.:50687469-1280-2190-14/  
Eğt.Öğt.(3) 1511-2913 sayılı ve "GATA Araştırma Amaçlı Anketleri Değerlendirme  
Kurulu Üye Görevlendirmesi" konulu yazısı.

1. GATA Etik Kurulu'nun 03 Mayıs 2016 günü yapılan 6'ncı oturumunda, GATA Tıbbi KBRN BD.Bşk.İğında görevli Yrd. Doç. Hv. Tbp. Yb. Sermet SEZİGEN'in sorumlu araştırmacılığını yaptığı "Sülfür Mustard Yakıcı Ajanının Biyobelirteçlerinin Ölçüm Yönteminin Optimize Edilmesi" başlıklı çalışma dosyası ile ilgili GATA Etik Kurulu'nun kararı EK-A'dadır.
2. Anket uygulaması yapılacak tüm çalışmalar ilgi emir gereği GATA Anket Kurulundan onay almak şartıyla araştırmalarını uygulayabileceklerdir.

Rica ederim.

  
Orhan KOZAK  
Profesör Tabip Tuğgeneral  
GATA Etik Kurulu Başkanı

EKİ :  
Bir Adet Etik Kurul Raporu (Def.Kyt.No:289)

HİZMETE ÖZEL

Bağlantı Noktası : Svl.Me.A.ÖZKAN (Tel : 2293)

HİZMETE ÖZEL

T.C.  
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI  
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI  
ETİK KURUL TOPLANTI RAPORU

OTURUM NO : 6  
OTURUM TARİHİ : 03 Mayıs 2016  
DEFTER KAYIT NO : 289  
OTURUM BAŞKANI : Prof. Hv. Tbp. Tuğg. Orhan KOZAK  
OTURUM SEKRETERİ : Prof. Diş Tbp. Alb. Necdet DOĞAN

GATA Etik Kurulu'nun 03 Mayıs 2016 günü yapılan 6'ncı oturumunda, GATA Tıbbi KBRN BD. Bşk.lığında görevli Yrd. Doç. Hv. Tbp. Yb. Sermet SEZİGEN'in sorumlu araştırmacılığını yaptığı "Sülfür Mustard Yakıcı Ajanının Biyobelirteçlerinin Ölçüm Yönteminin Optimize Edilmesi" başlıklı çalışması değerlendirildi.

Araştırma dosyasının amaç, yöntem ve yaklaşım bakımından etik ilkelere UYGUN olduğuna karar verildi.

BAŞKAN	ÜYE	ÜYE	ÜYE
<b>İMZALI</b>	<b>KATILMADI</b>	<b>İMZALI</b>	<b>İMZALI</b>
Orhan KOZAK Prof.Hv.Tbp.Tuğg.	Bülent BEŞİRBELLİOĞLU Prof.Tbp.Tuğg.	Metin HASDE Prof.Tbp.Alb.	Necdet DOĞAN Prof. Diş Tbp.Alb.
<b>ÜYE</b>	<b>ÜYE</b>	<b>ÜYE</b>	<b>ÜYE</b>
<b>KATILMADI</b>	<b>İMZALI</b>	<b>İMZALI</b>	<b>KATILMADI</b>
Bülent GÜLEÇ Prof.Tbp.Alb.	Fuat TOSUN Prof.Hv.Tbp.Alb.	Mahir GÜLEÇ Prof.Tbp.Alb.	Ömer DENİZ Prof.Tbp.Alb.
<b>ÜYE</b>	<b>ÜYE</b>	<b>ÜYE</b>	<b>ÜYE</b>
<b>İMZALI</b>	<b>İMZALI</b>	<b>İMZALI</b>	<b>İMZALI</b>
Suzi DEMİRBAĞ Prof.Tbp.Alb.	Ahmet KORKMAZ Prof.Hv.Tbp.Alb.	Harun TUĞCU Prof.Tbp.Alb.	Muharrem UÇAR Doç.Dr.J.Tbp.Alb.
			Emine İYİGÜN Doç.Dr.Hv.Sağ.Alb.

HİZMETE ÖZEL

## BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BOF)

### Araştırmanın tanımlanması

- Araştırmayı yapan kişi Arş.Gör.Dr. Ruşen Koray Eyison, kurum: SBÜ Tıbbi KBRN AD. Bşk.lığıdır.
- Araştırmanın amacı; sülfür mustard yakıcı ajanının biyobelirteçlerinin ölçüm yönteminin optimize edilmesidir.
- Araştırma tanı geliştirme çalışmasıdır, araştırmacılar aynı zamanda gönüllüdür.
- Gönüllü sayısı 5 kişidir
- Araştırma Tıbbi KBRN AD'da yapılacaktır.
- Araştırma süresi 1 yıldır.
- Gönüllülerden sadece idrar alınacaktır.
- Bu işlemler/girişimlerin ne kadar sürede yarım günde tamamlanacaktır.
- Gönüllüden elde edilecek biyolojik materyaller analiz amaçlı kullanılacaktır.
- Alınacak idrar miktarı yaklaşık 100cc olacaktır.
- Alınacak biyolojik materyaller analiz sonrası saklanmayacaktır.
- Alınacak biyolojik materyaller başka bir araştırmada kullanılmayacaktır.

### Beklenen yararlar

- Gönüllüler için herhangi bir fayda hedeflenmemektedir. SBÜ Tıbbi KBRN AD Bşk.lığına idrarda mustard analiz yeteneği ve bu kapsamda ülkemize kimyasal silahlar konusunda ileri analiz yeteneği kazandırılması hedeflenmektedir.

### Öngörülen riskler

- Öngörülen risk yoktur

### Alternatif tedavi seçenekleri

- Herhangi bir tedavi uygulanmayacaktır.

### Araştırma masrafları

- Analiz için kullanılacak malzemeler haricinde herhangi bir masraf yoktur.

### Katılımın gönüllülüğü

- Araştırmaya gönüllü olarak davet edilmiştir.
- Araştırmaya katılıp katılmamakta tamamen serbesttir.
- İsteddiği anda araştırmadan çekilme hakkı vardır.

### Katılımın sonlandırılması

Araştırmacı, gönüllünün sağlam olma kriterleri bozulduğunda katılımını sonlandırılacaktır.

### **Bilgilerin gizliliği**

- Gönüllüye ait tüm bilgiler gizli tutulacaktır.
- Araştırma sonucunda elde edilecek bilgilerin yayınlanması durumunda gönüllünün kimlik bilgilerinin açıklanmayacaktır.
- Araştırma için Etik Kuruldan olumlu görüşü alınmıştır ve araştırma bilgileri Etik Kurula açıktır.

### **İletişim kurulacak kişiler**

Çalışma ile ilgili ek bilgi için T.KBRN AD. Bşk. Prof.Dr.Levent KENAR'a başvurabilirler.

- Sorumlu araştırmacı Dr.Öğr.Üyesi Sermet SEZİGEN olup, SBÜ Tıbbi KBRN AD. Öğretim Üyesidir.
- Araştırmayı yapan araştırmacı Arş.Gör.Dr.Ruşen Koray Eyison'dur.

### **Gönüllü beyanı**

- Bütün bunların bana anlatıldığını, kendimin de bizzat okuduğumu, anladığımı ve gönüllü olarak araştırmaya katıldığımı beyan ederim.

### **Sorumlu araştırmacı**

Dr.Öğr.Üyesi Sermet SEZİGEN



### **Tanıklık eden kişi/kişiler**

Dr.Öğr.Üyesi Sermet SEZİGEN

Arş.Gör.Dr. R.Koray EYİSON



### **Gönüllüler**

Prof.Tbp.Kd.Alb.Levent KENAR



Dr.Öğr.Üyesi Sermet SEZİGEN



Yrd.Doç.Dr.Mesut ORTATATLI



Arş.Gör.Dr. Ruşen Koray EYİSON



Memur Elif ŞAHİNER



## ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM BİLGİLERİ



### Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı : Ruşen Koray EYİSON  
Doğum yeri ve tarihi : Sakarya, 21.06.1981  
Medeni durumu : Evli, 2 çocuk sahibi  
İletişim adresi ve telefonu : SBÜ, Gülhane/ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi KBRN AD. Bşk.lığı, 06010, Etlik/ANKARA 90 (312) 3043379, rusenkoray.eyison@sbu.edu.tr  
Yabancı dili : İngilizce

### Eğitimi

- 1988 – 1990 Cumhuriyet İlkokulu, Manisa
- 1990 – 1992 Kadri Paşa İlkokulu, Uzunköprü, Edirne
- 1992 – 1993 Sarıkamış Merkez Ortaokulu, Sarıkamış, Kars
- 1993 – 1995 Namık Kemal Ortaokulu, Ankara
- 1995 – 1999 Işıklar Askeri Lisesi, Bursa
- 1999 – 2007 Gülhane Askeri Tıp Fakültesi, Ankara

### Mesleki Deneyimi

- Mayıs 2008 - Temmuz 2010, Seslice Taburu/Şırnak, Sıhhiye Takım Komutanlığı görevi
- Temmuz 2010 - Ekim 2013, Özel Kuvvetler Komutanlığı, Ankara, Pratisyen Tabip
- Ekim 2013, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi KBRN BD.Bşk.lığında doktora öğrenciliğine başladı.
- Haziran 2018, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi KBRN AD., Tıbbi KBRN programından Ph.D. ünvanını aldı.

### **Katıldığı tatbikatlar**

- 1) Jandarma Komutanlığı KBRN Tatbikatı, Güvercinlik/Ankara, Kasım 2013
- 2) TSK Efes Tatbikatı, Seferhisar/İzmir, Mayıs 2014
- 3) GATA (Gülhane Askeri Tıp Akademisi) KBRN Tatbikatı, Ankara, Haziran 2015
- 4) Deniz Kuvvetleri Komutanlığı KBRN Tatbikatı, Gölcük/Kocaeli, Eylül 2015
- 5) GATA KBRN Tatbikatı, Ankara, Kasım 2015
- 6) GATA KBRN Tatbikatı, Ankara, Ocak 2016
- 7) NATO Toxic Trip Tatbikatı, Antalya, Ekim 2016
- 8) GEAH (Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi) Tıbbi KBRN Tatbikatı, Kasım 2017

### **Yayınları**

- 1) Kilic E, Ortatatli M, Sezigen S, **Eyison RK**, Kenar L. Acute intensive care unit management of mustard gas victims: the Turkish experience. *Cutan Ocul Toxicol.* 2018 May 7:1-6. doi: 10.1080/15569527.2018.1464018. PubMed PMID: 29648477.
- 2) Ortatatli M, Canitez K, Sezigen S, **Eyison RK**, Kenar L. Evaluation of Gamma-Radiation Inactivation of a Bioterrorism Agent, *Bacillus anthracis* Spores, on Different Materials. *Indian J Microbiol.* 2018 Mar;58(1):76-80. doi: 10.1007/s12088-017-0691-z. Epub 2017 Nov 9. PubMed PMID: 29434400; PubMed Central PMCID: PMC5801180.

### **Aldığı sertifikalar**

- 1) İlk yardım Eğitici Eğitimliği, Ankara, Şubat 2011
- 2) Uçuş Tabipliği Sertifikası, Eskişehir, Haziran 2011
- 3) Aile Hekimliği, Ankara, Kasım 2012
- 4) İşyeri Hekimliği Sertifikası, Ankara, Haziran 2013
- 5) Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Ankara, Şubat 2014

### **Katıldığı uluslararası kongreler**

- 1) 22-26 Haziran 2014 – IFCC Worldlab İstanbul 2014, İstanbul/Türkiye – 2 poster bildiri
- 2) 05-06 Nisan 2017 – 15th Medical Biodefense Conference, Münih/Almanya – 2 poster bildiri

3) 05-07 Aralık 2017 – International CBRN Congress, Ankara/Türkiye – Davetli konuşmacı, 2 sözlü bildiri ve 3 poster bildiri

4) 11-14 Mayıs 2018 – Balkan Askeri Tıp Kongresi – 7 sözlü bildiri

#### **Katıldığı ulusal kongre ve çalıştaylar**

1) 13-15 Mayıs 2014 – 7.Ulusal Hemşirelik Kongresi – 1 poster bildiri

2) 19-21 Kasım 2015 – 1.Ulusal Radyasyondan Korunma Kongresi (Ankara/Türkiye)

3) 6 Şubat 2016 – Toksikoloji Çalıştayı 2016 (Ankara/Türkiye)

4) 21-22 Şubat 2017 – KBRN Eğitim Çalıştayı (Ankara/Türkiye), Davetli Konuşmacı

#### **Katıldığı kurslar ve eğitimler**

1) 19-23 Mayıs 2014 – Advanced Training Course in Civil Defence Against Chemical Weapons (Lázně Bohdaneč, Çek Cumhuriyeti)

2) 07-08 Mart 2015 – LCMSMS Eğitimi (Konya/Türkiye)

3) 06-08 Mart 2017 – Uygulamalı Temel Hücre Kültürü ve Kök Hücre Teknikleri Kursu (Ankara/Türkiye)

4) 13-15 Aralık 2017 – GCMSMS Eğitimi (Ankara/Türkiye)