T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SESKİMUSTARD MARUZİYETİ SONUCU OLUŞAN MAKROMOLEKÜLER KATIM ÜRÜNLERİNİN TANIMLANMASI

Uzm. Kim. Muharrem CENK

Farmasötik Toksikoloji Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2025

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SESKİMUSTARD MARUZİYETİ SONUCU OLUŞAN MAKROMOLEKÜLER KATIM ÜRÜNLERİNİN TANIMLANMASI

Uzm.Kim. Muharrem CENK

Farmasötik Toksikoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof.Dr. Suna SABUNCUOĞLU

ANKARA

2025

Seskimustard Maruziyeti Sonucu Oluşan Makromoleküler Katım Ürünlerinin Tanımlanması

Öğrenci: Uzm.Kim. Muharrem CENK

Danışman: Prof.Dr. Suna SABUNCUOĞLU

Bu tez çalışması 11/07/2025 tarihinde, jürimiz tarafından "Farmasötik Toksikoloji Programı"nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	*Prof. Dr. Ü.Pınar ERKEKOĞLU*
	Hacettepe Üniversitesi
Üye:	*Prof. Dr. Sinem ILGIN*
	Anadolu Üniversitesi
Üye:	*Prof. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ*
	Ankara Üniversitesi
Üye:	*Prof. Dr. Sevtap AYDIN DİLSİZ*
	Hacettepe Üniversitesi
Üye:	*Prof. Dr. Gözde GİRGİN*
	Hacettepe Üniversitesi

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

21 Temmuz 2025

Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan ***"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"*** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. [(1)]
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. [(2)]
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. [(3)]

11.07.2025

Muharrem CENK

[1] *"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"*

*(1) Madde 6. 1. Lisansüstü tezle ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*

*(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*

*(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.*
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

***** Tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.***

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Uzm. Kim. Muharrem CENK

TEŞEKKÜR

"*Hayatta en hakiki mürşit ilimdir fendir, ilim ve fenden başka yol gösterici aramak gaflettir, dalalettir, cehalettir*."
— Mustafa Kemal ATATÜRK

Doktora eğitimim süresince engin bilgi ve deneyimiyle yol gösteren, fikirlerimi destekleyerek araştırmalarımda beni daima cesaretlendiren değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU'na,

Doktora eğitimimin her aşamasında bana katkı sağlayan Farmasötik Toksikoloji Anabilim dalının değerli öğretim üyelerine,

Tez sürecimin her aşamasında, bilgi birikimi, özverisi ve fedakârlığıyla yanımda olan, yalnızca bir meslektaş değil aynı zamanda bu sürecin en büyük emekçisi olan, anlayışı ve motivasyonu ile bu çalışmanın tamamlanmasında belirleyici rol oynayan değerli arkadaşım Dr. Havva BEKİROĞLU ATAŞ'a,

Bilimsel süreçte katkıları ve samimi destekleriyle yanımda olan "mikroplara fısıldayan adam" Dr. Süleyman YALÇIN'a ve laboratuvar sorumlumuz Dr. Pınar ATAKAN'a,

Her koşulda yanımda olan, en zor anlarımda desteğiyle beni ayakta tutan, sabrı ve anlayışı ile yanımda olan sevgili eşime, varlığıyla hayatıma anlam katan, her bakışıyla bana umut ve güç veren biricik oğluma, duaları, sevgileri ve sonsuz destekleriyle her zaman arkamda duran kıymetli anneme ve babama,

Sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Cenk, M., Seskimustard Maruziyeti Sonucu Oluşan Makromoleküler Katım Ürünlerinin Tanımlanması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2025. Seskimustard (Q; 1,2-bis(2-kloroetiltiyo)etan), yüksek vezikan etkisi ve düşük buhar basıncı nedeniyle çevresel kalıcılığı yüksek bir kükürtlü hardal bileşiğidir. Yapısal analoğu olan HD'ye benzer şekilde, canlı sistemlerde nükleofilik biyomoleküllerle kovalent bağlar oluşturarak toksik etkiler göstermektedir. Ancak HD'den daha toksik olan Q'nun biyotransformasyonu ve toksisitesine yönelik literatürde sınırlı çalışma bulunmaktadır. Bu tezde, Q maruziyetinin özgül biyobelirteçleri olabilecek GSH ve DNA ile oluşturduğu konjugat ve katım ürünlerinin kütle spektrometrik yöntemlerle tanımlanması ve biyolojik sistemlerde doğrulanması amaçlanmıştır. Q'nun GSH ve sistein (Cys) ile reaksiyonları sonucu dört konjugat (GSH-ETETE-GSH, HETETE-GSH, HETETE-Cys, Gua-ETETE-Cys) sentezlenmiş, DNA bazlarıyla yapılan in vitro tepkimelerle üç katım ürünü (HETETE-Ade, HETETE-Gua, Gua-ETETE-Gua) elde edilmiş ve LC-HRMS ile tanımlanmıştır. Tanımlanan yapıların analitik izlenebilirliği, 25, 50, 100 ve 250 µM Q'ya maruz bırakılan HaCaT hücre kültürü örneklerinde LC-MS/MS ile değerlendirilmiştir. Dört konjugatın tamamı aynı anda yalnızca 250 µM Q'ya maruz kalan hücrelerin lizatlarında, DNA katım ürünleri ise tüm doz gruplarında tespit edilmiştir. Böylece her iki metabolit grubunun da biyolojik sistemde oluştuğu doğrulanmıştır. Elde edilen bulgular, Q'nun tiyol grubu içeren küçük moleküller yanı sıra DNA bazları ile de yüksek özgüllükte reaksiyon vererek stabil alkilasyon ürünleri oluşturduğunu göstermektedir. Tanımlanan bu yapılar, tez kapsamında yapılan çalışmalar ile Q maruziyetinin retrospektif doğrulanmasında kullanılabilecek potansiyel biyobelirteçler olarak literatüre kazandırılmıştır. Bu çalışma, seskimustard'ın biyotransformasyon yolaklarının ve toksikolojik özelliklerinin anlaşılmasına katkı sunmakta, gelecek çalışmalara alt yapı oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Seskimustard, glutatyon konjugatı, DNA katım ürünü, HaCaT

ABSTRACT

Cenk, M., Identification of Macromolecular Adducts Formed as a Result of Exposure to Sesquimustard, Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Department of Pharmaceutical Toxicology Doctor of Philosophy Thesis, Doctor of Philosophy Thesis, Ankara, 2025. Sesquimustard (Q; 1,2-bis(2-chloroethylthio)ethane) is a sulfur-containing mustard compound that is highly persistent in the environment due to its high vesicant effect and low vapour pressure. Like its structural analogue HD, it has been observed to exhibit toxic effects by forming covalent bonds with nucleophilic biomolecules within living systems. However, literature on the biotransformation and toxicity of Q is limited, despite it being more toxic than HD. In this thesis, the aim is to identify the conjugates and adducts formed by Q exposure with GSH and DNA, which may be specific biomarkers, using mass spectrometric methods and to verify them in biological systems. Four conjugates (GSH-ETETE-GSH, HETETE-GSH, HETETE-Cys, Gua-ETETE-Cys) were synthesized as a result of Q's reactions with GSH and cysteine (Cys), and three adducts (HETETE-Ade, HETETE-Gua, Gua-ETETE-Gua) were obtained through in vitro reactions with DNA bases were obtained and identified by LC-HRMS. The analytical traceability of the identified structures was evaluated by LC-MS/MS in HaCaT cell culture samples exposed to 25, 50, 100, and 250 µM Q. All four conjugates were detected simultaneously only in the lysates of cells exposed to 250 µM Q, while DNA adducts were detected in all dose groups. Consequently, the formation of both metabolite groups within the biological system was substantiated. The findings indicate that Q reacts with high specificity not only with small molecules containing thiol groups but also with DNA bases, forming stable alkylation products. These structures, as identified in this study, have been added to the existing literature as potential biomarkers for the retrospective verification of Q exposure. This study contributes to the understanding of the biotransformation pathways and toxicological properties of sesquimustard and provides a foundation for future studies.

Keywords: Sesquimustard, glutathione conjugate, DNA adduct, HaCaT

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI iii
YAYIMLAMA ve FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI iv
ETİK BEYAN v
TEŞEKKÜR vi
ÖZET vii
ABSTRACT viii
İÇİNDEKİLER ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ xii
ŞEKİLLER xvi
TABLOLAR xviii
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Kimyasal Savaş Ajanlarının Tanımı 4
2.2. Kimyasal Savaş Ajanlarının Tarihçesi 5
2.3. Kimyasal Savaş Ajanlarının Sınıflandırılması 10
2.4. Kükürtlü Hardal Bileşikleri 12
2.4.1. Kükürtlü Hardal Bileşiklerinin Fizikokimyasal Özellikleri 13
2.4.2. Kükürtlü Hardal Bileşiklerinin Kimyasal Reaksiyonları 14
2.4.3. Kükürtlü Hardal Bileşiklerinin Toksisite Mekanizmaları, Toksik Etkileri ve Olası Tedavi Yaklaşımları 19
2.4.4. Toksikokinetik 27
2.4.5. Kükürtlü Hardal Bileşiklerine Maruz Kalımın Biyolojik Örneklerde Doğrulanması 41
2.4.6. Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi Yöntemleri 43
3. GEREÇ ve YÖNTEM 55
3.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler 55
3.2. Kullanılan Cihazlar ve Donanımlar 56
3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler 57
3.4. Analizlerde Kullanılan Yazılımlar 58
3.5. Çözeltilerin Hazırlanması 58

3.5.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması 58
3.5.2. %0,1 FA Çözeltisinin Hazırlanması 58
3.5.3. %0,1 FA İçeren ACN Çözeltisinin Hazırlanması 58
3.5.4. %70 (v/v) EtOH Çözeltisinin Hazırlanması 59
3.5.5. %50 (v/v) MeOH Çözeltisinin Hazırlanması 59
3.5.6. 0,1 M NaOH Çözeltisinin Hazırlanması 59
3.5.7. 4 M NaCl Çözeltisinin Hazırlanması 59
3.5.8. Doymuş $NaHCO_3$ Çözeltisinin Hazırlanması 59
3.5.9. Q Çözeltilerinin Hazırlanması 59
3.5.10. 50 mM Fosfat Tamponunun (pH 7,00) Hazırlanması 60
3.5.11. ctDNA Çözeltisinin Hazırlanması 61
3.6. Yöntemler 61
3.6.1. Deneylerde Kullanılacak Q'nun sentezi 61
3.6.2. GSH ve Cys'nin Q ile Doğrudan Konjugasyon Reaksiyonları 61
3.6.3. ctDNA ile Q Katım Ürünlerinin *İn Vitro* Oluşturulması 62
3.6.4. Hücre Kültürü 63
3.6.5. Hücrelere Q Uygulanması 63
3.6.6. GSH ve Cys Konjugatlarının Analizi İçin Numune Hazırlığı 65
3.6.7. Hücrelerden DNA İzolasyonu 65
3.6.8. HPLC–UV–PDA ile Fraksiyonel Saflaştırma İşlemleri 66
3.6.9. LC-HRMS Analizleri 67
3.6.10. GSH ve Cys Konjugatlarının LC-HRMS Analizlerinde Kullanılan Kromatografik Koşullar 69
3.6.11. DNA Katım Ürünlerinin LC-HRMS Analizlerinde Kullanılan Kromatografik Koşullar 69
3.6.12. LC–MS/MS Analizleri 70
3.6.13. GSH ve Cys Konjugatlarının LC-MS/MS Analizlerinde Kullanılan Kromatografik Koşullar ve Optimize Edilmiş MRM Parametreleri 71
3.6.14. DNA Katım Ürünlerinin LC-MS/MS Analizlerinde Kullanılan Kromatografik Koşullar 72
3.6.15. Atıkların Kontrolü ve Güvenlik Önlemleri 73
4. BULGULAR **74**
4.1. Q'nun GSH ve Cys ile Reaksiyon Ürünlerinin LC-HRMS ile Tanımlanmasına İlişkin Bulgular 74

4.2. HaCaT Hücre Kültüründe Q'nun GSH ve Cys Konjugatlarının Tespiti Belirlenmesine İlişkin Bulgular 93

4.3. LC-HRMS ile Q-DNA Katım Ürünlerinin Tanımlanmasına İlişkin Bulgular 96

4.4. HaCaT Hücre Kültüründe Q'nun DNA Katım Ürünlerinin Saptanmasına İlişkin Bulgular 104

5. TARTIŞMA 107

5.1. LC-HRMS Analizleri 107

5.1.1. GSH ve Cys Konjugatlarının Targeted MS/MS Yöntemi ile Yapısal Doğrulaması 109

5.1.2. DNA Katım Ürünlerinin Targeted MS/MS Yöntemi ile Yapısal Doğrulaması 112

5.2. LC-MS/MS Analizleri 115

5.2.1. HaCaT Hücre Kültüründe Q'nun GSH ve Cys Konjugatlarının Tespiti 115

5.2.2. HaCaT Hücre Kültüründe Q'nun DNA Katım Ürünlerinin Tespiti 118

6. SONUÇ ve ÖNERİLER 120

7. KAYNAKLAR 123

8. EKLER 143

Ek-1: Seskimustarda ait NMR sonuçları

Ek-2: Tüm doz ve sürelerde besiyerinden alınan örneklere ait MRM kromatogramları

Ek-3: Orijinallik Raporu

Ek-4: Dijital Makbuz

9. ÖZGEÇMİŞ 169

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µL	Mikrometre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
ACN	Asetonitril
APCI	Atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon
BHETE	1,2-Bis(2-hidroksietiltiyo)etan
Bis-G	Bis(etiltiyoetil)-N7-guanin
CE	Çarpışma enerjisi
CID	Çarpışma ile indüklenen ayrışma
cm^2	Santimetrekare
cm^3	Santimetreküp
ctDNA	DNA sodium salt from calf thymus
Cys	Sistein
Cys-ETETE-Cys	Bissisteinil etiltiyoetiltiyoetil konjugatı
DCM	Diklorometan
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
DPBS	Dulbecco’nun Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi
EIC	Ekstrakte edilmiş iyon kromatogramı
ESI	Elektrospray İyonizasyon
ETE	Etiltiyoetil
ETETE	Etiltiyoetiltiyoetil
EtOH	Etanol
EtONa	Sodyum etoksit
eV	Elektronvolt

FA	Formik asit
FBS	Fötal Sığır Serumu
FRC	Fraksiyon toplama ünitesi
g	Gram
GGT	γ-glutamiltransferaz
GSH	Glutatyon
GSH-ETE-GSH	HD bisglutatyonil konjugatı
GSH-ETETE-GSH	Bisglutatyonil etiltiyoetiltiyoetil konjugatı
GST	Glutatyon-S-transferaz
Gua-ETETE-Gua	Guanin-etiltiyoetiltiyoetil-guanin
HaCaT	İnsan epidermal keratinositlerinden türetilmiş ölümsüzleştirilmiş hücre hattı
HD	Kükürt hardalı, bis(2-kloroetil)sülfür
HDO	HD-sülfoksit
HDO_2	HD-sülfon
HETE	Hidroksietiltiyoetil
HETE-CP	Hidroksietiltyoetil-sisteinfenilalanin
HETE-CPF	Hidroksietiltiyoetil- sisteinprolinfenilalanin
HETE-GSH	HD monoglutatyonil konjugatı
HETETE	Hidroksietiltiyoetiltiyoetil
HETETE-Ade	Hidroksietiltiyoetiltiyoetil-adenin
HETETE-CP	Hidroksietiltiyoetiltiyoetil- sisteinprolin
HETETE-CPF	Hidroksietiltiyoetiltiyoetil- sisteinprolinfenilalanin
HETETE-Cys	Monosisteinil hidroksietiltiyoetiltiyoetil
HETETE-GSH	Monoglutatyonil hidroksietiltiyoetiltiyoetil konjugatı
HETETE-Gua	Hidroksietiltiyoetiltiyoetil-guanin
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografi
HRMS	Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi
HSA	İnsan serum albümini
ICt_{50}	Medyan kapatise bozucu konsantrasyon

kg	Kilogram
L	Litre
LC	Sıvı kromatografi
LC-MS	Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi
LC-MS/MS	Sıvı kromatografi-kütle/kütle spektrometrisi
LCt_{50}	Medyan letal konsantrasyon
LD_{50}	Medyan letal doz
m	Kütle
m/z	Kütle/ Yük
MeOH	Metanol
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MRM	Çoklu Reaksiyon İzleme
MS	Kütle spektrometrisi
MSMTESE	Metilsülfinil-2-[2-(metiltiyo)etilsülfonil]etan
N3-HETEA	N3-(hidroksietiltiyoetil)adenin
N7-HETEG	N7-hidroksietil guanin
NAC-S	N-asetilsistein-S konjugatı
NAD^+	Nikotinamid adenin dinükleotid
NAT	N-asetiltransferazlar
NMR	Nükleer manyetik rezonans
PARP	poli(ADP-riboz) polimeraz
PDA	Photodiode array
PIS	Ürün iyon spektrumu (Product Ion Spectra)
ppm	Milyonda bir birim (parts per million)
Q	Seskimustard, 1,2-bis(2-kloroetiltio)etan
QqQ	Üçlü kuadrupol
Q-TOF-MS	Kuadrupol-Zaman-Uçuşlu Kütle Spektrometrisi

ROS	Reaktif oksijen türleri
SBMSE	1,1'-sülfonilbis[2-(metilsülfinil)etan] (SBMSE)
SBMTE	1-sülfonilbis(metiltiyo)etan
SBSNAE	Sülfonilbis-[2-S-(N-asetilsisteinil)etan]
SRM	Seçilmiş Reaksiyon İzleme
TDG	Tiyodiglikol
TDGO	Tiyoglikol sülfoksit
$TDGO_2$	Tiyoglikol sülfon
TIC	Toplam iyon kromatogramından
UHPLC	Ultra yüksek performanslı likit kromatografi
Δm	Kütle hatası

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Q'nun sentez basamakları	10
2.2. HD'nin termal bozunma reaksiyonu	14
2.3. HD (a) ve Q (b) bileşiklerinin sülfonyum iyonları üzerinden ilerleyen hidroliz mekanizmaları	16
2.4. HD (a) ve Q (b) hidroliz ürünlerinin oksidatif dönüşüm reaksiyonları	17
2.5. HD'nin doğrudan oksidatif dönüşüm reaksiyonları	17
2.6. HD ve Q'nun eliminasyon reaksiyonları sonucu vinil sülfür türevlerinin oluşum reaksiyonları	17
2.7. HD maruziyeti sonrasında görülen tipik semptomlar **a.** Oküler semptomlar; bilateral konjonktivit, göz kapağı ödemi, blefarospazm ve fotofobi **b.** Dermal semptomlar; eritem, vezikül ve bül oluşumları	25
2.8. HD (a) ve Q (b) bileşiklerinin nükleofilik merkezlerle reaksiyonları sonucunda monoalkilasyon ve çapraz bağlanma ürünlerinin oluşumu	31
2.9. HD'nin GSH konjugatları; a. HD bisglutatyonil konjugatı (GSH-ETE-GSH) b. HD monoglutatyonil konjugatı (HETE-GSH)	33
2.10. HD'nin GSH konjugasyonu sonrası gerçekleşen merkaptürik asit ve β-liyaz yollarını içeren metabolik dönüşüm şeması	35
2.11. HD'nin albümin katım ürünleri **a.** HETE-CPF **b.** HETE-CP	36
2.12. Q'nun albümin katım ürünleri **a.** HETETE-CPF **b.** HETETE-CP	37
2.13. HD'nin globin katım ürünü N-HETE-Valinin kimyasal yapısı	38
2.14. DNA'nın guain üzerinden HD ile alkilasyon mekanizması	39
2.15. HD maruziyeti sonrası DNA bazlarıyla oluşan başlıca katım ürünlerinin yapıları: a. N7-HETEG b. Bis-G c. O6-HETEG d. N3-HETEA	40
2.16. Bir kütle spektrometresi sisteminin şeması	45
2.17. ESI ve APCI iyon kaynaklarında iyonlaşma mekanizmasına ilişkin şematik gösterim	49
2.18. Lineer kuadrupol kütle analizörünün yapısı (217). **(a)** Lineer kuadrupol analizörün şematik temsili. **(b)** Gerçek bir kuadrupol kütle analizörünün yapısını gösteren fotoğraf	50
2.19. Bir QqQ analizörün şematik gösterimi	51
2.20. QTOF kütle analizörünün şematik görünümü	53

4.1. HETETE-GSH'ye ait m/z 472,1240 için EIC (A) ve bu yapıya ait LC-HRMS spektrumunda gözlenen izotopik pik dağılımı (B) 76

4.2. GSH-ETETE-GSH'ye ait m/z 761,1973 için EIC (A) ve bu yapıya ait LC-HRMS spektrumunda gözlenen izotopik pik dağılımı (B). 77

4.3. HETETE-Cys'ye ait m/z 286,0600 için EIC (A) ve bu yapıya ait LC-HRMS spektrumunda gözlenen izotopik pik dağılımı (B) 78

4.4. Cys-ETETE-Cys'ye ait m/z 286,0600 için EIC (A) ve bu yapıya ait LC-HRMS spektrumunda gözlenen izotopik pik dağılımı (B) 79

4.5. HETETE-GSH'ye ait PIS 80

4.6. GSH-ETETE-GSH'ye ait PIS 81

4.7. HETETE-Cys'ye ait PIS. 89

4.8. Cys-ETETE-Cys'ye ait PIS 89

4.9. 30 dakika boyunca 250 µM Q'ya maruz bırakılan hücrelerin lizatında tespit edilen GSH ve Cys konjugatlarına ait LC–MS/MS (MRM) kromatogramları. (A) HETETE-GSH, (B) GSH-ETETE-GSH, (C) HETETE-Cys ve (D) Cys-ETETE-Cys 94

4.10. Konsantrasyon ve maruziyetten sonra geçen süre ile konjugat oluşumundaki değişiklikler **A.** 250 µM Q maruziyeti ile konjugat oluşumunun zamana bağlı değişimi; **B.** 0. dakika (B1) ve (B2), 6. saatte (B3) konjugat oluşumunun konsantrasyona bağlı değişimi. C: Kontrol, dk: Dakika, S: Saat 95

4.11. HETETE-Ade'ye ait m/z 300, 0947 için EIC (A) ve bu yapıya ait LC-HRMS spektrumunda gözlenen izotopik pik dağılımı (B) 97

4.12. HETETE-Gua'ya ait m/z 316,0896 için EIC (A) ve bu yapıya ait LC-HRMS spektrumunda gözlenen izotopik pik dağılımı (B) 98

4.13. Gua-ETETE-Gua'ya ait m/z 449,1285 için EIC (A) ve bu yapıya ait LC-HRMS spektrumunda gözlenen izotopik pik dağılımı (B) 99

4.14. HETETE-Ade'ye ait PIS 101

4.15. HETETE-Gua'ya ait PIS. 101

4.16. Gua-ETETE-Gua'ya ait PIS 102

4.17. 250 µM Q'ya maruz bırakılan hücrelerde DNA katım ürünlerine ait LC–MS/MS (MRM) kromatogramları. A) HETETE-Ade, B) HETETE-Gua, C) Gua-ETETE-Gua 106

4.18. Konsantrasyon ile DNA katım ürünü oluşumundaki ilişki. C: Kontrol 106

TABLOLAR

Tablo **Sayfa**

2.1. I. Dünya Savaşı sonrası kimyasal savaş ajanlarının askerî ve terör amaçlı kullanımına ilişkin kronolojik örnekler 7

2. 2. HD Sentez Yöntemleri ve Formülasyonları 9

2.3. Toksikolojik etkilerine göre kimyasal savaş ajanlarının sınıflandırılması 11

2.4. Kimyasal savaş ajanı olarak tanımlanan ve Kimyasal Silahlar Sözleşmesi Liste 1'de yer alan kükürtlü hardal bileşikleri 12

2.5. HD ve Q'nun bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri 13

2.6. Bazı sinir ajanları ve HD'nin insanlar için tahmin edilen toksik seviyeleri 23

2.7. HD ve Q için tahmini toksiste değerleri 23

2.8. HD'ye bağlı akut toksik etkilerin zamana bağlı gelişimi 24

2.9. HD maruziyeti sonucu gelişen akut, kronik ve gecikmiş klinik toksik etkiler 25

3.1. GSH ve Cys konjugatlarının HPLC-PDA-FRC ayrımı için uygulanan analizler için gradient elüsyon koşulları 67

3.2. DNA katım ürünlerinin HPLC–PDA-FRC ayrımı için uygulanan analizler için gradient elüsyon koşulları 67

3.3. Q-TOF/MS için optimize edilmiş operasyonel parametreler 68

3.4. GSH ve Cys konjugatlarının LC-HRMS analizlerinde uygulanan gradient elüsyon programı 69

3.5. DNA katım ürünlerinin LC-HRMS analizlerinde uygulanan gradient elüsyon programı 70

3.6. LC–MS/MS iyonizasyon parametreleri 70

3.7. GSH ve Cys konjugatları için optimize edilmiş MRM parametreleri 71

3.8. DNA katım ürünlerinin LC-MS/MS analizlerinde kullanılan gradient elüsyon programı 72

3.9. DNA katım ürünleri için optimize edilmiş MRM parametreleri 72

4.1. Q'nun GSH ve Cys ile oluşturduğu konjugatlara ait moleküler yapılar, elementel bileşimler, teorik ve deneysel $[M+H]^+$ monoizotopik kütle değerleri ile kütle hataları 75

4.2. HETETE-GSH'ye ait monoizotopik iyon ve izotopik bileşenlerine ilişkin teorik ve deneysel m/z değerleri, bağıl bolluk yüzdeleri ve kütle hataları 76

4.3. GSH-ETETE-GSH'ye ait monoizotopik iyon ve izotopik bileşenlerine ilişkin teorik ve deneysel m/z değerleri, bağıl bolluk yüzdeleri ve kütle hataları 77

4.4. HETETE-Cys'ye ait monoizotopik iyon ve izotopik bileşenlerine ilişkin teorik ve deneysel m/z değerleri, bağıl bolluk yüzdeleri ve kütle hataları 78

4.5. Cys-ETETE-Cys'ye ait monoizotopik iyon ve izotopik bileşenlerine ilişkin teorik ve deneysel m/z değerleri, bağıl bolluk yüzdeleri ve kütle hataları 79

4.6. GSH-ETETE-GSH'ye ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları 82

4.7. HETETE-GSH'ye ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları 86

4.8. Cys-HETETE'ye ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları 90

4.9. Cys-ETETE-Cys'ye ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları 91

4.10. Q'nun ctDNA ile oluşturduğu DNA katım ürünlerine ait moleküler yapılar, elementel bileşimler, teorik ve deneysel $[M+H]^+$ monoizotopik kütle değerleri ile kütle hataları 96

4.11. HETETE-Ade'ye ait monoizotopik iyon ve izotopik bileşenlerine ilişkin teorik ve deneysel m/z değerleri, bağıl bolluk yüzdeleri ve kütle hataları 98

4.12. HETETE-Gua'ya ait monoizotopik iyon ve izotopik bileşenlerine ilişkin teorik ve deneysel m/z değerleri, bağıl bolluk yüzdeleri ve kütle hataları 98

4.13. Gua-ETETE-Gua'ya ait monoizotopik iyon ve izotopik bileşenlerine ilişkin teorik ve deneysel m/z değerleri, bağıl bolluk yüzdeleri ve kütle hataları 99

4.14. HETETE-Ade'ye ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları 103

4.15. HETETE-Gua'ya ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları 103

4.16. Gua-ETETE-Gua'ya ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları 104

1. GİRİŞ

I. Dünya Savaşı (1914–1918), yalnızca tarihin en yıkıcı çatışmalarından biri olmakla kalmamış, aynı zamanda kimyasal savaş ajanlarının ilk kez organize ve endüstriyel ölçekte kullanıldığı bir dönem olmuştur. Özellikle, hardal gazı olarak da bilinen kükürt hardalı (HD; bis(2-kloroetil)sülfür) gibi vezikan ajanların yaygın olarak kullanılması, bu savaşın literatürde "Kimyagerlerin Savaşı" olarak anılmasına neden olmuştur (1). Kimyasal silahların insanlık üzerindeki yıkıcı etkileri, savaş sonrasında uluslararası düzeyde yasal ve diplomatik sınırlamalar getirilmesine yol açmıştır. Bu çabaların en somut örneği, 1997 yılında yürürlüğe giren Kimyasal Silahlar Sözleşmesi'dir. Günümüzde 193 ülke tarafından onaylanan sözleşme, kimyasal silahların geliştirilmesini, üretimini, alınmasını, depolanmasını, bulundurulmasını, transferini ve kullanımını yasaklamaktadır (2). Buna rağmen son yıllarda Irak ve Suriye gibi uzun dönem devam ettiği bölgelerde kimyasal silah kullanımları tekrar rapor edilmiş, bu maddelerin günümüzde de ciddi bir tehdit unsuru olarak varlığını sürdürdüğünü ortaya koymuştur (3).

Tarihsel olarak değerlendirildiğinde, kimyasal savaş ajanları arasında HD en sık rapor edilen ve en yaygın şekilde kullanılan kimyasal savaş ajanlarının başında gelmektedir (4). Bu durum, HD'nin nispeten basit sentezlenebilir, öncül kimyasallarının yaygın olarak temin edilebilir olmasına ve sentez süreçlerinin teknik olarak kompleks altyapı gerektirmemesine dayanmaktadır. Bu koşullar, yalnızca devlet merkezli kimyasal silah programlarının değil, aynı zamanda devlet dışı aktörlerin de bu ajanı tercih etmesine neden olmuştur (5, 6). HD'nin çatışma ortamlarında sıkça kullanılmış olması ve toksik etkilerinin klinik düzeyde gözlemlenebilir olması da bilimsel ilginin bu ajana yoğunlaşmasına katkı sunmuştur. Bu doğrultuda, HD'nin toksisite mekanizmaları, biyotransformasyon ürünleri ve maruziyet sonrası tanısal biyobelirteçleri üzerine çok sayıda deneysel ve klinik çalışma gerçekleştirilmiştir.(7-16).

Seskimustard (Q; 1,2-bis(2-kloroetiltio)etan) bileşiği, HD'nin yapısal analoğu olup, yüksek vezikan etkisine rağmen bilimsel literatürde nispeten ihmal edilmiş ajanlardan birisidir. Literatürde Q'nun, HD'ye kıyasla daha güçlü vezikan özellikler

gösterdiği ve daha yüksek sitotoksisite potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (17, 18). Bu özellikleri, Q'yu potansiyel olarak daha tehlikeli bir ajan haline getirmekte ve toksikolojik açıdan sistematik biçimde değerlendirilmesini gerekli kılmaktadır. Literatürde Q ile ilgili çevresel bozunma süreçleri üzerine belirli çalışmalar bulunmaktadır (19-32). Ancak, Q'nun toksisite mekanizmaları, biyotransformasyon yolları ve maruziyet sonrası biyobelirteç profilleri üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Bu kapsamda, kimyasal savaş ajanlarının kullanıldığı olayların adli, askeri ve uluslararası denetim kapsamında soruşturulmasında, çevresel olanların yanı sıra biyolojik örneklerden elde edilen analitik bulgular en güvenilir doğrulama araçları arasında yer almaktadır. Bu tür örnekler arasında kan, idrar, saç, deri, vücut sıvıları ve biyolojik dokular yer almakta, analiz edilen örneğin türüne bağlı olarak hem erken hem de retrospektif maruziyetin değerlendirilmesi mümkün olabilmektedir. Biyolojik örnekler, hedef organizmaya ait olmaları sayesinde doğrudan maruz kalımı ortaya koyabilmeleri açısından oldukça değerlidir. Bu durum, özellikle ajanla temasın üzerinden uzun süre geçtiği durumlarda, maruziyetin kesin olarak doğrulanmasını mümkün kılmaktadır. Bu bağlamda biyolojik örneklerden elde edilen bulgular, uluslararası kuruluşlar tarafından yürütülen soruşturmalarda olayın ciddiyetini belgelemek, maruziyetin özgünlüğünü ve kapsamını belirlemek, maruz kalanlara uygulanacak tıbbi müdahaleleri şekillendirmek ve gerektiğinde adli süreçlerde delil sunmak amacıyla bilimsel ve hukuki geçerliliği yüksek veriler üretmektedir. Bu nedenle elde edilen biyolojik örneklerin analitik olarak değerlendirilmesi, kimyasal silahların yasaklanmasına yönelik uluslararası hukukun teknik temelini oluşturmaktadır (33).

Vezikan ajanların canlı sistemlerde oluşturduğu toksisitenin temelinde, elektrofilik özellik gösteren ara ürünlerinin, canlı biyolojik sistemlerin ana yapıtaşları olan deoksiriboz nükleik asit (DNA), protein ve glutatyon (GSH) gibi nükleofilik biyomoleküllerle reaksiyona girerek kovalent bağlanma ürünleri oluşturmasına dayanmaktadır (34). Bu reaksiyonlar sonucu oluşan yapılar, canlı maruziyetini göstermeleri bakımından yüksek özgüllüğe sahip biyobelirteçler olarak kabul

edilmektedir. HD'ye ait birçok metabolit ve katım ürünü literatürde tanımlanmışken (35-38), kimyasal olarak daha güçlü bir vezikan olan Q için özgül biyobelirteçlerin sayısı oldukça sınırlıdır.

Literatür verileri, Q'nun insan serum albümini üzerindeki sistein (Cys)-34 kalıntısı ile reaksiyona girerek HD'ye benzer şekilde albümin katım ürünleri oluşturduğunu ortaya koymuştur. Her iki ajan için de bağlanmanın aynı nükleofilik hedef (Cys34) üzerinden gerçekleştiği gösterilmiştir. (39-43). Bu durum, Q'nun biyolojik sistemlerde benzer elektrofilik davranışlar sergileyerek DNA ve GSH gibi diğer hedeflerle de kovalent bağlar oluşturabileceğini düşündürmektedir. Özellikle HD maruziyeti sonrası biyolojik örneklerde hem GSH konjugatlarının hem de DNA bazlarında oluşan alkilasyon ürünlerinin başarıyla tanımlanmış olması, Q'ya ait benzer biyotransformasyon ürünlerinin araştırılmasını bilimsel olarak anlamlı ve gerekli kılmaktadır.

Bu tez çalışmasının ana hipotezi, yapısal analoğu olan kükürt hardala benzer şekilde, Q ajanının da biyolojik sistemlerde GSH ve DNA ile reaksiyona girerek kovalent konjugatlar ve katım ürünleri oluşturabileceğidir. Bu doğrultuda, Q'nun GSH konjugatları ve DNA katım ürünlerinin, HaCaT hücre kültüründe Q'ya maruz kalım sonrası araştırılması, özgül ve izlenebilir biyobelirteçlerinin kütle spektrometrik yöntemler ile tanımlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kimyasal Savaş Ajanlarının Tanımı

Kimyasal savaş ajanları, insanlar üzerinde fiziksel ve psikolojik yıkıcı etkiler oluşturmak amacıyla üretilen kimyasallardır. Ayrıca, bitkisel ve hayvansal kaynakları kirletmek, ekonomik hedefleri işlevsiz hale getirmek, bireylerin hareket kabiliyetini kısıtlamak ve uygulandıkları bölgede paniğe yol açmak amacıyla da kullanılabilmektedir (44). Bir kimyasal silah, toksik özellikleri nedeniyle kasıtlı olarak ölüme veya zararlı etkilere neden olmak amacıyla kullanılan kimyasal maddeler ile bunların salınımını sağlayan cihaz ve ilgili donanımlardan oluşur (45). Kimyasal silahlar, kitle imha silahları arasında insanoğlunun yarattığı en acımasız silahlardan biri olarak kabul edilmektedir. Üretimlerinin ucuz olması ve küçük terörist gruplar tarafından bile kitlesel kayıplara yol açabilecek şekilde nispeten kolay üretilebilmeleri, ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (46). Barışçıl amaçlar doğrultusunda herhangi bir kullanım alanı olmayan kimyasal silahlar 1993 yılında imzaya açılan ve 1997 yılında yürürlüğe giren Kimyasal Silahlar Sözleşmesi ile yasaklanmıştır (47). Kimyasal Silahlar Sözleşmesi, kimyasal silahların yayılmasını önlemek, bunların elde edilmesini ya da geliştirilmesini engellemek ve devletlerin elindeki mevcut kimyasal silahları imha etmek için düzenlenmiş güçlü bir uluslararası yayılmayı önleme anlaşmasıdır. Bu bakımdan sadece kimyasal silah kullanımını yasamakla kalmayıp taraf devletlerin kimyasal silah geliştirmek, üretmek, edinmek, stoklamak, tutmak veya diğer taraflara devretmek gibi eylemlerini de yasaklamaktadır (48). Sözleşme, tam adı “Kimyasal Silahların geliştirilmesinin, Üretiminin, Stoklanmasının ve Kullanımının Yasaklanması ve Bunların İmhası ile İlgili Sözleşme” olan bir silah kontrol antlaşmasıdır. Sözleşmenin uygulanması ve denetlenmesinden Kimyasal Silahların Yasaklanması Örgütü sorumludur (2). Daha önce kimyasal silah olarak geliştirilmiş, üretilmiş, stoklanmış, kullanılmış veya toksikolojik ve fizikokimyasal özellikleri bakımından kimyasal silah olarak kullanılmasını mümkün kılan özelliklere sahip kimyasal maddeler ile bunları sentezlemek için gerekli birçok öncül kimyasal, Kimyasal Silahlar Sözleşmesi’nin eklerinde yer alan üç farklı listede belirtilmiştir (49, 50).

2.2. Kimyasal Savaş Ajanlarının Tarihçesi

Kimyasal silahlar, antik çağlardan günümüze kadar savaşlarda, terör saldırılarında ve suikast girişimlerinde kullanılmış olup zamanla daha gelişmiş formları üretilmiştir. İlk dönemlerde zehirli dumanlar, zehirli bitkiler, yılan ve akrep zehirleri, düşmanları zayıflatmak veya kendilerini savunamaz hale getirmek amacıyla kullanılmıştır. Ayrıca, su ve gıda kaynaklarının bu tür maddelerle kirletilmesiyle düşmana karşı avantaj sağlanmaya çalışıldığına dair kayıtlar da bulunmaktadır. Orta Çağ'da en meşhur kimyasal silah, özellikle deniz savaşlarında kullanılan Rum Ateşi'dir. Bunun yanı sıra arsenik ve kükürt dumanları da bu dönemde harp alanlarında yaygın olarak kullanılmıştır. Zehirli maddelerin kullanımını yasaklayan ilk uluslararası antlaşma, 1675 yılında Fransa ve Almanya tarafından imzalanan Strazburg Anlaşması'dır. 17. ve 18. yüzyıllarda kimya endüstrisinin gelişmesi ile klor, hidrojen siyanür (HCN), siyanojen klorür, fosgen, HD ve kloropikrin gibi potansiyel kimyasal silah bileşenleri keşfedilmiştir (51). 1899 yılında birinci Lahey Sözleşmesi ile zehirli silahların kullanımı yasaklanmış, tarafların boğucu veya zararlı gazların yayılmasını amaçlayan mühimmatları kullanmamaları gerektiği belirtilmiştir. 1907 yılında ikinci Lahey Sözleşmesi ile bu yasak teyit edilmiştir. Yapılan bu anlaşmaya rağmen I. Dünya Savaşı sırasında taraflar arasında kimyasal silah kullanımı olmuştur (52). Kimya bilimi ve endüstrisindeki hızlı ilerleme, tehlikeli kimyasalların büyük ölçekli üretimini mümkün kılmış ve toksik etkilerine dair artan bilgi birikimi, bu kimyasalların kitle imha silahı olarak kullanılmasına zemin hazırlamıştır (53).

Kimyasal savaş ajanlarının geniş çaplı taktiksel ve stratejik kullanımı, I. Dünya Savaşı'nın başlamasından yaklaşık bir yıl sonra ortaya çıkmıştır. Modern kimyasal savaş, 22 Nisan 1915'te I. Dünya Savaşı sırasında Fransa'nın *Ypres* Muharebesi'nde Alman ordusunun 168 ton klor gazı kullanmasıyla başlamıştır (54). Savaşın en yıkıcı kimyasal saldırılarından biri, 12 Temmuz 1917'de yine *Ypres* kentinde gerçekleşmiş ve Alman ordusu tarafından HD kullanılmıştır. HD, önceki ajanlara kıyasla daha kalıcı, düşük dozlarda bile etkili, solunum yolları, gözler ve cilt üzerinde ciddi yaralanmalara yol açan bir ajandır. Askeri sağlık sistemine ağır yük getiren bu madde, aynı zamanda askerlerin hareket kabiliyetini de kısıtlayarak savaşın seyrini değiştirmiştir (55). Klor

gazı ve HD dışında bromoasetat, o-dianisidin klorosülfonat, kloroaseton, fosgen, HCN, siyanojen klorür, kloropikrin, fenildiklorarsin, difenilsiyanoarsin, metildikloroarsin ve etilmetildikloroarsin gibi kimyasallar da I. Dünya Savaşı'nda kullanılan başlıca kimyasal ajanlar arasında yer almıştır (51, 53, 56).

I. Dünya Savaşı'nın yıkıcı etkileri, savaş sonrası dönemde zehirli gazların kullanımını yasaklamaya yönelik kamuoyunda güçlü bir isteğin doğmasına neden olmuştur. Bunun bir sonucu olarak, biyolojik savaş ajanlarının, boğucu ve zehirli gazları, ayrıca benzer sıvı ve maddelerin kullanımını yasaklayan Cenevre Protokolü, 1925 yılında imzalanmıştır. Ancak bu protokol, kimyasal savaş ajanlarının üretimini yasaklamamış ve imzalayan bazı taraflar, kendilerine yönelik bir saldırı durumunda misilleme yapma hakkını saklı tutmuştur. Bu nedenle, protokole rağmen mevcut ve yeni kimyasal ajanların geliştirilmesi ve daha etkili mühimmat ile dağıtım sistemleri üzerinde çalışmalar devam etmiştir (52, 54).

Cenevre Protokolü'nün imzalanması, kimyasal silah kullanımını tamamen engelleyememiştir. II. Dünya Savaşı'na kadar meydana gelen çeşitli savaşlarda kimyasal silah kullanımına dair raporlar mevcuttur. II. Dünya Savaşı sırasında ise kimyasal savaş ajanları, Nazi Almanya'sı tarafından kitlesel soykırım amacıyla gaz odalarında kullanılmıştır (56). Savaş sırasında kayda geçen bir diğer önemli olay, 1943 yılında Alman hava saldırısı sonucunda İtalya'nın Bari Limanı'nda bulunan bir Amerikan gemisindeki HD'nin salınması ve bunun sonucunda altı yüzden fazla kişinin etkilenmesidir. Bu örnekler dışında, savaş sırasında kimyasal savaş ajanları doğrudan çatışmalarda kullanılmamıştır. Ancak II. Dünya Savaşı'nın başlamasıyla birlikte öncü devletler kimyasal silah geliştirme programlarına hız vermiştir. Bu süreçte birçok kimyasal savaş ajanı geliştirilmiş ve depolanmıştır. Bu dönemde tabun, sarin, soman ve VX gibi sinir ajanları keşfedilmiştir. Ayrıca, kükürtlü hardal bileşiklerinin daha etkili hâle getirilmesine yönelik yapılan çalışmalar sonucunda, HD damıtılarak *Q*, *O-mustard* ve levisitlerle karıştırılmış, böylece daha güçlü kimyasal silahlar elde edilmiştir. Sonraki süreçte azot hardallarının geliştirilmesi ve mühimmatlarda kullanılmasına yönelik çalışmalar da raporlanmıştır. Soğuk Savaş döneminde ise kimyasal silah araştırmaları

kesintisiz şekilde devam etmiş, kimyasal cephanelikler daha gelişmiş ve etkili ajanlarla donatılmıştır (51).

Kimyasal savaş ajanları, modern savaş tarihinin en yıkıcı unsurlarından biri olarak ilk kez I. Dünya Savaşı'nda kullanılmış, ilerleyen yıllarda ise bilimsel ve teknolojik gelişmelere paralel olarak daha gelişmiş, hedefe yönelik ve etkili bileşikler haline gelmiştir. Bu süreç, yalnızca bilimsel ilerlemenin bir göstergesi olmakla kalmamış, aynı zamanda bilimin kötüye kullanımına ilişkin çarpıcı bir örnek oluşturmuştur. Başlangıçta sağlık, tarım veya endüstri gibi alanlarda geliştirilen kimyasal bileşiklerin, savaş ve terör amaçlı olarak yeniden işlevlendirilmesi, bilimsel bilginin insanlık yararına kullanımının ne denli kolaylıkla suistimal edilebileceğini gözler önüne sermektedir. Bu durum, özellikle kimya ve toksikoloji disiplinlerinin etik sorumluluklarını daha da görünür kılarken, bilim insanlarının araştırmalarında etik ilkelere bağlı kalmalarının ve uluslararası düzenlemelere uygun hareket etmelerinin önemini artırmaktadır. Kimyasal savaş ajanlarının, tarihsel süreçte birçok savaş, çatışma, terör eylemi ve suikastta kullanılmasıyla ortaya çıkan toplumsal ve çevresel tahribat, bu bileşiklerin kontrolsüz kullanımının ne denli yıkıcı sonuçlar doğurabileceğini açıkça göstermektedir. Bu kapsamda, kimyasal savaş ajanlarının kullanıldığı başlıca olaylara Tablo 2.1'de yer verilmiştir.

Tablo 2.1. I. Dünya Savaşı Sonrası Kimyasal Savaş Ajanlarının Askerî ve Terör Amaçlı Kullanımına İlişkin Kronolojik Örnekler.

Tarih	Olay	Kullanılan Ajan	Kaynak
1921-1926	Rif Savaşı'nda İspanya'nın kimyasal silah kullanımı	HD	(51)
1935	İtalya'nın Etiyopya işgalinde kimyasal silah kullanımı	HD	(51, 53)
1937	Japonya'nın Çin'e karşı kimyasal silah kullanımı	HD, levisit, fosgen, HCN	(51, 53)
1935-1945	II. Dünya Savaşı'nda toplama kamplarında kimyasal kullanımı	Zyklon B (HCN)	(46, 53)
1963-1967	Yemen İç Savaşı'nda kimyasal silah kullanımı	HD	(46, 53)
1963-1973	Vietnam Savaşı'nda kimyasal silah kullanımı	*Agent Orange* (2,4,5-T ve 2,4-D karışımı)	(46, 53)
1978	Bulgar yazar Georgi Markov suikastı	Ricin	(53)
1980-1988	İran-Irak Savaşı'nda kimyasal silah kullanımı	HD, Sarin, Tabun	(51, 53)
1987	Libya'nın Çad'a karşı kimyasal silah kullanımı	HD	(51)
1988	Halepçe Katliamı	HD, Sarin	(51, 53)

Tablo 2.1. (Devam) I. Dünya Savaşı Sonrası Kimyasal Savaş Ajanlarının Askerî ve Terör Amaçlı Kullanımına İlişkin Kronolojik Örnekler.

Tarih	Olay	Kullanılan Ajan	Kaynak
1994	Japonya, Matsumoto terör saldırısı	Sarin	(51, 53)
1995	Japonya, Tokyo metrosu terör saldırısı	Sarin	(51, 53)
2002	Moskova tiyatro rehine krizi	Fentanil analogları	(53, 57)
2011-2018	Suriye İç Savaşı'nda kimyasal silah kullanımı	HD, Sarin, klor gazı	(58-60)
2015-2016	Tuzhurmatu kimyasal saldırısı	HD	(61)
2017	Kim Jong-nam suikastı	VX	(48, 62)
2018	Sergei Skripal suikast girişimi	*Novichok* (A-234)	(48, 63)
2018	Amesbury'de Novichok maruziyeti	*Novichok* (A-234)	(48, 63)
2020	Alexei Navalny suikastı	*Novichok*	(48, 64)

Sonuç olarak, kimyasal savaş ajanları toksikolojik açıdan değerlendirildiğinde hem akut hem de kronik etkileriyle insan sağlığı üzerinde yüksek morbidite ve mortalite riski taşıyan ajanlardır. I. Dünya Savaşı sırasında başta Almanya, Fransa, Britanya, Rusya ve ABD olmak üzere büyük güçler tarafından yaklaşık 200.000 ton kimyasal savaş ajanı üretilmiş, bu süreçte yaklaşık bir milyon asker maruz kalmış ve vakaların %10'u ölümle sonuçlanmıştır. II. Dünya Savaşı'nda ise bu miktar 400.000 tonun üzerine çıkmış, üretimin yaklaşık %66'sını HD ve levisit gibi ajanlar oluşturmuştur. Bu kapsamlı üretim, sadece savaş alanındaki akut toksik etkileriyle değil, aynı zamanda psikolojik etkileri, lojistik zorlukları ve uzun vadeli sağlık yüküyle de toksikolojinin savaş patolojisindeki önemini ortaya koymaktadır (65).

Kimyasal Silahlar Sözleşmesi 1997 yılında yürürlülüğe girmiş, söz konusu ajanların geliştirilmesi, üretimi, stoğu ve kullanımını yasaklayarak uluslararası alanda önemli bir düzenleyici çerçeve sunmuştur. Kimyasal Silahları Yasaklama Örgütü gibi bağımsız denetim mekanizmaları ile desteklenen bu sözleşme, konvansiyonel devlet aktörlerinin kimyasal silah kapasitesini sınırlama açısından etkili bir yapı oluşturmuştur. Ancak, toksikolojik açıdan değerlendirildiğinde, teknolojinin ilerlemesiyle birlikte daha etkili ve seçici ajanların sentezlenebilmesi, aynı zamanda düşük maliyetli ve basit yöntemlerle laboratuvar ölçeğinde üretilebilmeleri, bu tehdidin hâlen sürdüğünü göstermektedir. Özellikle devlet dışı aktörlerin bu ajanlara erişim kabiliyetindeki artış ve terörist grupların potansiyel kullanımı, Tablo 2.1.'de yer alan vakalarda da görüldüğü üzere, kimyasal ajanların küresel ölçekte hâlâ ciddi bir halk sağlığı tehdidi oluşturduğunu ortaya koymaktadır.

Tarih boyunca pek çok kimyasal savaş ajanı geliştirilmiş ve çeşitli çatışmalarda kullanılmıştır. Ancak bu ajanlar arasında HD hem kullanım sıklığı hem de toksik etkileri bakımından diğerlerinden belirgin şekilde ayrılmaktadır. Modern savaş tarihinde kullanılan ilk kimyasal ajanlardan biri olmasının yanı sıra, günümüzde hâlâ kullanılıyor olması taktik ve stratejik hedeflerin yanında bu ajanının sentez yöntemlerinin basitliği ve düşük maliyetli hammaddelerle üretilebilmesi ile de ilişkilidir (66).

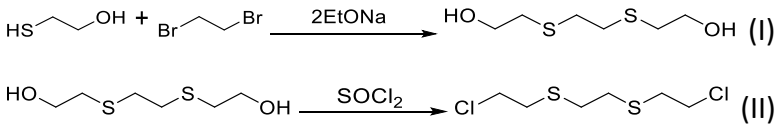
Kükürt hardalı, ilk kez 1822 yılında *César-Mansuète Despretz* tarafından kükürt diklorür (SCl_2) ile etilenin (C_2H_4) reaksiyonu sonucunda sentezlenmiştir. Takip eden yıllarda, bir İngiliz boya üreticisi *Levinstein*, bu bileşiği daha erişilebilir bir yöntemle, kükürt monoklorür (S_2Cl_2) ve C_2H_4 reaksiyonu üzerinden sentezleyerek literatüre "*Levinstein* prosesi" olarak geçen metodu geliştirmiştir. 1860 yılında *Frederick Guthrie*, benzer bir reaksiyonla HD sentezleyerek bu bileşiğin vezikan etki gösterdiğini ilk tanımlayan bilim insanı olmuştur. 1886 yılında *Viktor Meyer*, tiyodiglikolü (TDG) sentezlemiş ve ardından bu ara ürünü fosfor triklorür (PCl_3) ile reaksiyona sokarak yüksek saflıkta HD elde etmiştir. Bu yöntem, HD'nin kontrollü ve yüksek verimli sentezine olanak sağlamış ve daha sonra Almanya tarafından I. Dünya Savaşı sırasında kimyasal silah üretiminde kullanılmıştır. Daha sonra *Hans Thacher Clarke*, aynı ara ürünü kullanarak PCl_3 yerine derişik hidroklorik asit (HCl) ile reaksiyona sokmuş ve alternatif bir sentez yöntemi oluşturmuştur (67). HD'nin sentezine yönelik farklı yöntemler Tablo 2.2'de sunulmuştur.

Tablo 2. 2. HD Sentez Yöntemleri ve Formülasyonları.

Yöntem	**Formülasyon**
Depretz	$SCl_2 + 2C_2H_4 \rightarrow (Cl_2\text{-}CH_2CH_2)_2S$
Levinstein	$8S_2Cl_2 + 16C_2H_4 \rightarrow 8(Cl_2\text{-}CH_2CH_2)_2S + S_8$
Meyer	$2(HO\text{-}CH_2CH_2)_2S + 2PCl_3 \rightarrow 3(Cl_2\text{-}CH_2CH_2)_2S + 2P(OH)_3$
Meyer-Clarke	$(HO\text{-}CH_2CH_2)_2S + 2HCl \rightarrow (Cl_2\text{-}CH_2CH_2)_2S + 2H_2O$

Seskimustard ise ilk kez 1921 yılında *Bennett* ve *Whincop* tarafından sentezlenmiştir. İlk olarak, etil alkol ile hazırlanan sodyum etoksit (EtONa) çözeltisi, etilen dibromür ve 2-hidroksietantiyol ile reaksiyona sokularak 1,2-Bis(2-

hidroksietiltiyo)etan (BHETE) ara ürünü elde edilmiştir. BHETE'nin tiyonil klorür ($SOCl_2$) ile klorlanması sonucunda hedef bileşik olan Q sentezlenmiştir (68). Bu reaksiyonun sentez basamakları Şekil 2.1'de gösterilmektedir. Q'nun vezikan özellikler gösterdiği 1922 yılında *Rosen ve Reid* tarafından yapılan bir çalışmada ortaya konmuştur (69). Bu çalışma, Q'nun toksikolojik profilinin HD'ye benzerlik gösterebileceğine dair ilk bilimsel kanıtı oluşturmuştur.



Şekil 2.1. Q'nun sentez basamakları (69).

2.3. Kimyasal Savaş Ajanlarının Sınıflandırılması

Kimyasal savaş ajanları, fizikokimyasal özellikleri, kimyasal yapıları ve canlı organizmalar üzerindeki toksik etkilerine göre farklı sınıflandırma yöntemleriyle kategorize edilebilirler. Bu sınıflandırmalar, ajanların hem kimyasal özelliklerini hem de biyolojik etkileşimlerini daha iyi anlamayı hedefler. En yaygın yaklaşım, kimyasal savaş ajanlarının canlı organizmalar üzerindeki toksik etkileri temelinde yapılmasıdır. Bu yöntem, ajanların zararlı etkilerini ve etki mekanizmalarını ortaya koymada temel bir rehber görevi görür (34, 70).

Kimyasal Silah Sözleşmesi'nde yer alan tanımlamalar esas alınarak, fizyolojik ve toksik etkilerine göre kimyasal savaş ajanları Tablo 2.3'de verildiği şekilde sınıflandırılabilir. Söz konusu tablo literatürde yer alan farklı kaynaklardan elde edilen veriler doğrultusunda uyarlanmıştır (45, 46, 49, 56, 65, 71-74).

Kükürtlü hardal bileşikleri, toksikoloji bilimi açısından değerlendirildiğinde sadece tarihsel bir tehdit değil bugünün ve geleceğin potansiyel kimyasal silah tehditleri arasında en öncelikli risk faktörlerinden biri olmaya devam etmektedir.

Tablo 2.3. Toksikolojik etkilerine göre kimyasal savaş ajanlarının sınıflandırılması.

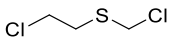
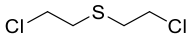
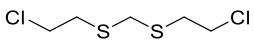
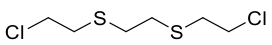
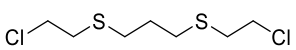
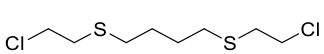
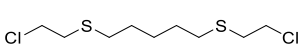
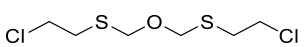
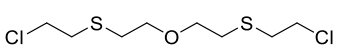
Ajan Tipi	Etki	Örnek
Sinir Ajanları	Asetilkolinesteraz inhibisyonu sonucu periferik ve merkezi sinir sistemini etkileyen parasempatik sistemin aşırı uyarılması, kas spazmları, solunum yetmezliği, ölüm.	G tipi sinir ajanları -Sarin (GB) -Soman (GD) -Tabun (GA) V tipi sinir ajanları -VX -RVX -CVX A tipi sinir ajanları (*Novichok* ajanlar) -A230 -A232 -A234 Karbamatlar - Dimetilkarbamoiloksipiridinlerin kuaternerleri - Dimetilkarbamoiloksipiridinlerin biskuaternerleri
Vezikan/ *Blister* Ajanlar	Ciltte, mukoz membranda ve gözlerde ciddi yanıklar. Ciltte, solunum yollarında ve akciğerlerde bül (*blister)* oluşumu. Sitotoksisite, biyomolekül alkilasyonu.	Kükürtlü Hardallar (H, HD, Q, T) Azotlu Hardallar (HN1, HN2, HN3) Levisitler (L1, L2, L3) Fosgen oksim (CX)
Boğucu/ Pulmoner Ajanlar	Akciğerlerde doku hasarı, inflamasyon, pulmoner ödem, solunum yetmezliği.	Klor Gazı (Cl) Kloropikrin (PS) Difosgen (DP) Fosgen (CG)
Kan Ajanları	Sitokrom oksidaz sistemini inhibisyonu sonucu hücresel solunumda bozulma, sistemik toksisite sonucu organ hasarı.	Hidrojen siyanür (AC) Siyanojen klorür (CK)
Kapasite Bozucular	Asetilkolin inhibisyonu, akut beyin sendromu, deliryum, şiddetli halüsinasyonlar.	3-kinüklidinil benzilat (BZ)
Toksinler	Protein sentezinin inhibisyonu, Nörotoksisite	Risin Saksitoksin
Kargaşa Kontrol Ajanları	Göz, deri ve solunum yollarında geçici irritasyon, kaşıntı, göz yaşarması ve tahriş	2-klorobenzalmalononitril (CS) Kloroasetofenon (CN) Kapsaisin (OC)

Seskimustard ile ilgili toksikolojik araştırma verilerine ilişkin literatürde oldukça sınırlı çalışma bulunmaktadır. Şimdiye kadar kükürtlü hardal bileşiklerine yönelik araştırmaların büyük çoğunluğu, geniş kullanım geçmişi ve klinik gözlem sayısının fazlalığı nedeniyle HD üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak elde edilen bulgular, yalnızca HD'ye özgü olmayıp, diğer kükürtlü hardal bileşikleri için de geçerli kabul edilmektedir. Bu bileşiklerin fizikokimyasal özellikleri bakımından belirli farklılıklar taşısa da genel toksikolojik davranışlar bakımından yüksek benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (75). Bu nedenle, bu bölümde yer alan literatür bilgileri genel olarak HD ile ilişkili olup, Q'nun kimyasal reaksiyonları ve toksikolojik etkileri açısından karşılaştırmalı değerlendirme amacıyla kullanılmaktadır.

2.4. Kükürtlü Hardal Bileşikleri

Kükürtlü hardal bileşikleri, *blister* ajanlar ya da vezikanlar olarak bilinen öncelikli hedefi cilt olan bununla birlikte solunum yolları ve gözlere de belirgin zarar veren güçlü sitotoksik alkilleyici bileşiklerdir (72, 76). Birbiri ile yapısal benzerliklere ve karşılaştırılabilir özelliklere sahip dokuz bileşik Kimyasal Silahlar Sözleşmesi Liste 1'de kükürtlü hardal bileşikleri grubunda yer almaktadır (Tablo 2.4) (49).

Tablo 2.4. Kimyasal savaş ajanı olarak tanımlanan ve Kimyasal Silahlar Sözleşmesi Liste 1'de yer alan kükürtlü hardal bileşikleri.

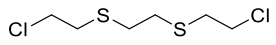
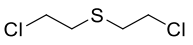
Bileşik Adı	CAS	Kimyasal Yapı
2-Kloroetilklorometilsülfid	2625-76-5	
Bis(2-kloroetil)sülfid (Kükürt Hardalı, Hardal Gazı)	505-60-2	
Bis(2-kloroetiltiyo)metan	63869-13-6	
1,2-Bis(2-kloroetiltiyo)etan: ***Seskimustard***	3563-36-8	
1,3-Bis(2-kloroetiltiyo)-n-propan	63905-10-2	
1,4-Bis(2-kloroetiltiyo)-n-bütan	142868-93-7	
1,5-Bis(2-kloroetiltio)-n-pentan	142868-94-8	
Bis(2-kloroetiltiometil)eter	63918-90-1	
Bis(2-kloroetiltiyoetil)eter (*O-Mustard*)	63918-89-8	

Bu bileşiklerden genellikle hardal gazı olarak bilinen HD, dünya savaş tarihi boyunca en sık kullanılan kimyasal savaş ajanı olma özelliği taşımaktadır (77). Diğer kükürtlü hardal bileşiklerinin savaşlarda kullanıldığına dair bir kanıt yoktur. Ancak II. Dünya Savaşı sırasında HD ile *Q* veya *O-Mustard* karışımları içeren kimyasal silah formülasyonlarının geliştirildiği ve stoklandığı bilinmektedir (78). HD haricindeki diğer hardal bileşikleri ise *Levinstein* prosesi gibi mühimmat formülasyonlarında safsızlık olarak bulunabilmektedir (21, 79).

2.4.1. Kükürtlü Hardal Bileşiklerinin Fizikokimyasal Özellikleri

Saf HD renksiz kokusuz yağımsı viskoz bir sıvıdır (67). Ancak HD ve Q gibi kükürt hardalı bileşiklerinin sentezi sonrasında ortaya çıkan birçok kükürt içeren safsızlıklardan dolayı bu bileşikler hardal ya da sarımsak kokusuna benzer ayırt edici bir kokuya sahiptir. HD içerisindeki safsızlıklar arttıkça rengi sarıdan kahverengiye doğru değişir. Q'yu HD'den ayıran en önemli özelliği ise ortam şartlarında katı olmasıdır (80). HD ve Q'nun temel fizikokimyasal özellikleri karşılaştırmalı olarak Tablo 2.5.'te sunulmuştur.

Tablo 2.5. HD ve Q'nun bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri (81-83).

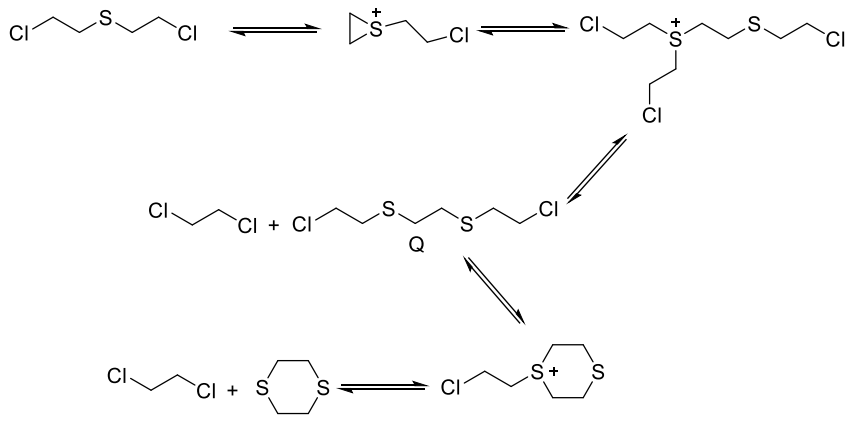
	Q	**HD**
Kimyasal yapı		
Moleküler formülü	$C_6H_{12}Cl_2S_2$	$C_4H_8Cl_2S$
CAS numarası	3563-36-8	505-60-2
Moleküler Kütle	219,2 g/mol	159.08
Yoğunluk (Sıvı)	1.27 g/cm^3 (25 °C)	1.27 g/cm^3 (25 °C)
Fiziksel Hal	Katı	Sıvı
Erime noktası	56 °C	14,45 °C
Kaynama Noktası	328,7 °C	227,8°C
Buhar Basıncı	3,5.10^{-5} mm Hg (25 °C)	0,11 mmHg (25 °C)
Adlandırma	1,2-bis(2-kloroetilsülfanil)etan (UIPAC) 1,2-Bis(2-kloroetiltiyo)etan Bis(2-kloroetiltiyo)etan 1,8-Dikloro-3,6-ditiyaoktan Sesquimustard/ Seskimustard Agent Q Q	1-kloro-2-(2-kloroetilsülfanil)etan (UIPAC) Bis(2-kloroetil)sülfit Bis(β-kloroetil)sülfit 2,2'-Diklorodietil sülfür Q Yperite Mustard Gas/ Hardal Gazı Sulfur Mustard/ Kükürt Hardalı HD

56 °C'nin altında katı halde bulunması ve oldukça düşük buhar basıncına sahip olması nedeniyle Q çevresel ortamda yüksek kalıcılık sergilemektedir. Ancak bu özellikler, tek başına kimyasal savaş ajanı olarak operasyonel etkinliğini sınırlamaktadır (78). Bu duruma yönelik stratejik bir yaklaşım geliştirilerek %70 HD ve %30 Q içeren ve HQ olarak tanımlanan bir formülasyon elde edilmiştir. Literatürde, HQ'nun HD'ye kıyasla daha üstün vezikan özelliklere ve daha uzun süreli çevresel stabiliteye sahip olduğu belirtilmiştir (23).

2.4.2. Kükürtlü Hardal Bileşiklerinin Kimyasal Reaksiyonları

Termal Bozunma Reaksiyonu

Bağımsız bir kimyasal silah formülasyonu olarak kullanılmayan Q, HD'nin *Levinstein* prosesi gibi mühimmat formülasyonlarında safsızlık olarak bulunabilir (19). Ayrıca, mühimmat ve taşıyıcılarda depolanan HD'nin termal bozunmasıyla Q'ya dönüştüğü bilinmektedir (84). Bu dönüşüm reaksiyonu Şekil 2.2'de şematik olarak sunulmuştur. Bu bağlamda hem HD'nin bozunma ürünü hem de sentez yan ürünü olarak HD içeren tüm mühimmatların önemli miktarda Q bileşiği içerebileceği değerlendirilmektedir (85).

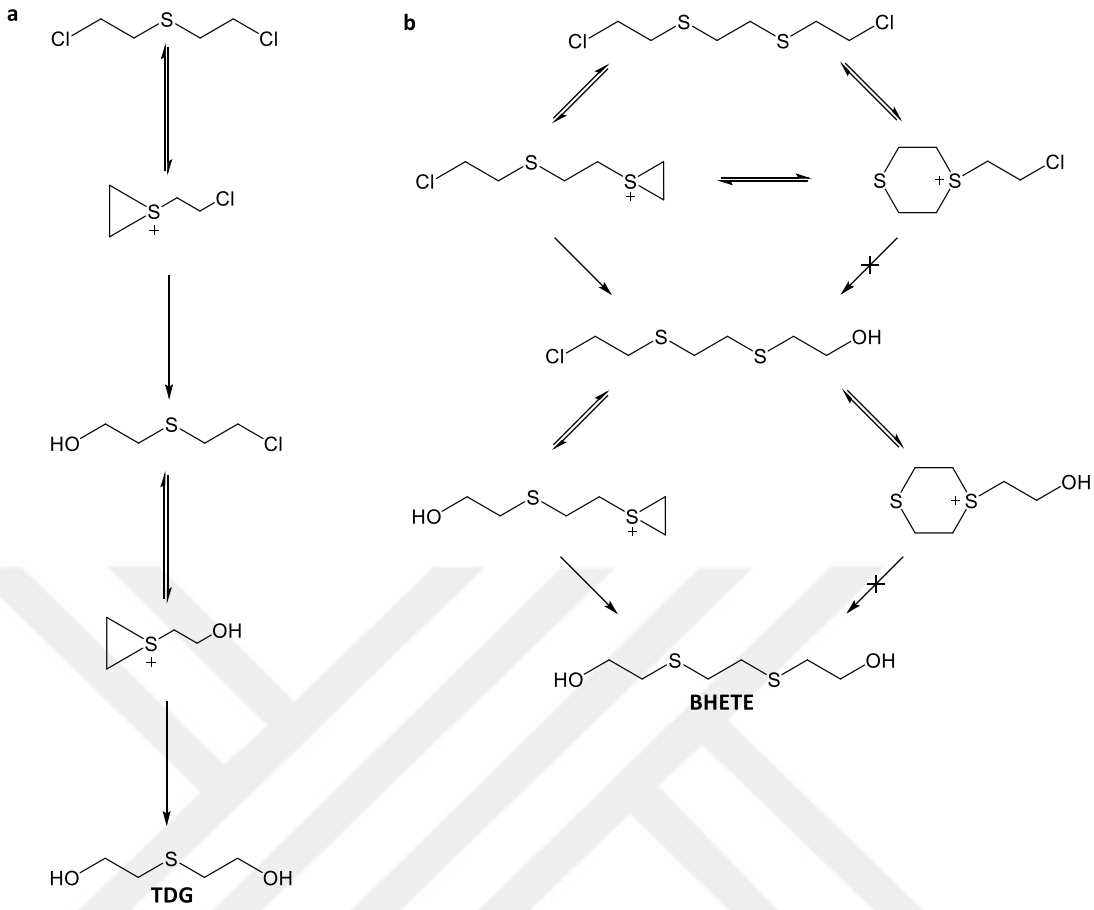


Şekil 2.2. HD'nin termal bozunma reaksiyonu.

Hidroliz

Kükürt hardallarının temel reaktivitesi, molekül içi bir nükleofilik saldırı ile başlar. Bu reaksiyon, kükürt atomuna komşu β-karbon üzerinde yer alan klor atomunun ayrılmasıyla gerçekleşir. Söz konusu nükleofilik saldırı genellikle SN1 benzeri bir mekanizma ile ilerler ve sonucunda oldukça elektrofilik özellik taşıyan trisiklik bir sülfonyum (episülfonyum) ara ürünü oluşur. Bu reaktif ara tür, daha sonra SN2 mekanizması aracılığıyla çeşitli nükleofillerle yer değiştirme reaksiyonlarına girerek stabil ürünlere dönüşür (67, 86-88).

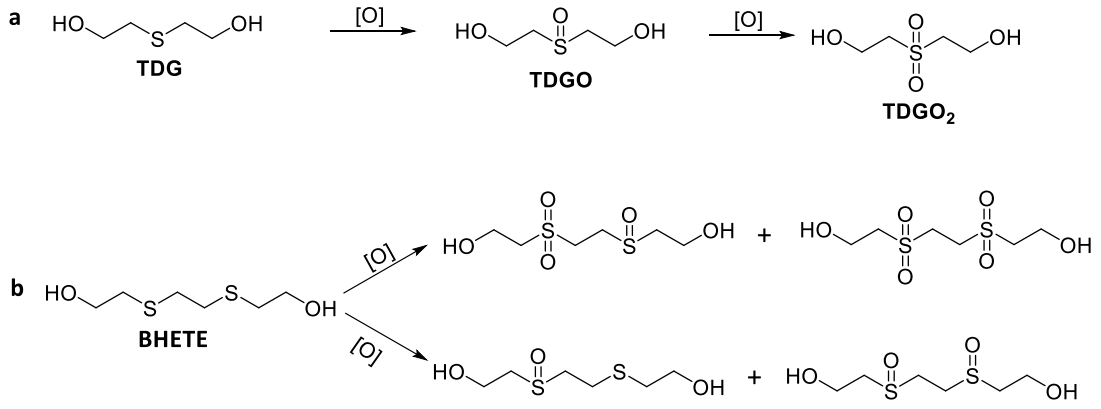
Sulu ortamlarda, HD'nin episülfonyum iyonu halka açarak klor atomları kademeli şekilde hidroksil grupları ile yer değiştirir ve bileşik hızla hidrolize olur. Bu hidroliz reaksiyonu, toksik olmayan ve polar yapıya sahip TDG oluşumu ile sonlanır. Q'da HD'ye benzer bir mekanizma ile hidrolize olur. Ancak Q'nun yapısında merkezden uzak ikinci bir kükürt atomunun bulunması, reaksiyon mekanizmasında önemli bir fark yaratır. Bu kükürt atomunun nükleofilik saldırısı sonucunda, episülfonyum iyonlarının yanı sıra hekzasiklik sülfonyum iyonları da oluşur. Hekzasiklik sülfonyum iyonları, episülfonyum türlerine kıyasla daha kararlı olup, daha düşük elektrofilik özellik gösterir. Ancak zamanla episülfonyum iyonlarına dönüşerek Q'nun reaksiyon sürecine katkı sağlayabilmektedir. Bu şekilde episülfonyum iyonları üzerinden ilerleyen Q'nun hidroliz reaksiyonu, BHETE oluşumu ile sonuçlanır (89). Hidroliz ürünleri olan TDG ve BHETE, aynı zamanda HD ve Q'nun sentezinde önemli ara bileşiklerdir (24). HD ve Q'nun hidroliz reaksiyon mekanizmaları Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3. HD (a) ve Q (b) bileşiklerinin sülfonyum iyonları üzerinden ilerleyen hidroliz mekanizmaları.

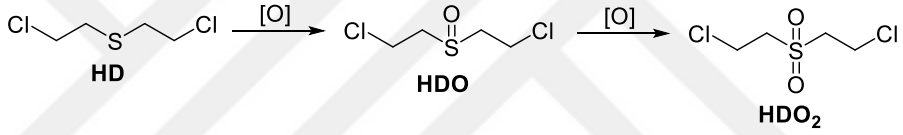
Oksidasyon

Hidrolizi takip eden oksidasyon reaksiyonları, yapısında yer alan kükürt atomunun oksidasyonu sonucu TDG'nin sırası ile tiyoglikol sülfoksit (TDGO) ve tiyoglikol sülfon ($TDGO_2$) türevlerine dönüşmesine yol açar. BHETE'nin yapısındaki fazladan bir kükürt atomu nedeniyle oksidasyon reaksiyonları çoklu oksidasyon ürünlerinin oluşması ile sonuçlanır (Şekil 2.4). HD ve Q'nun hem hidroliz hem de oksidasyon ürünleri oldukça kararlıdır (23, 25-27, 31).



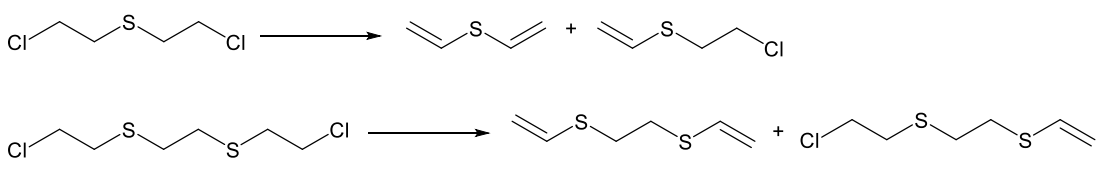
Şekil 2.4. HD (a) ve Q (b) hidroliz ürünlerinin oksidatif dönüşüm reaksiyonları.

Bazı durumlarda HD, oksidatif şartlarda hidrolize uğramadan doğrudan oksidasyon reaksiyonlarına girerek HD-sülfoksit (HDO) ve HD-sülfon (HDO_2) yapılarına dönüşebilir (Şekil 2.5) (88, 90).



Şekil 2.5. HD'nin doğrudan oksidatif dönüşüm reaksiyonları.

Bazik koşullarda, kükürtlü hardal bileşikleri eliminasyon reaksiyonları yoluyla vinil sülfür türevlerine dönüşür. Bu reaksiyon, kükürt hardallarının kimyasal nötralizasyon stratejilerinin temelini oluşturur. Ayrıca oluşan bozunma ürünleri, çevresel matrikslerde bu bileşiklerin olası kullanımını retrospektif olarak doğrulamada değerli analitik belirteçlerdir (28, 67, 88). HD ve Q'nun bazik ortamda gerçekleşen eliminasyon reaksiyonları Şekil 2.6'te şematik olarak sunulmuştur.



Şekil 2.6. HD ve Q'nun eliminasyon reaksiyonları sonucu vinil sülfür türevlerinin oluşum reaksiyonları.

Hidroliz, oksidasyon ve eliminasyon gibi yaygın bozunma mekanizmalarının yanı sıra, HD ve Q gibi kükürt hardalı bileşikleri, hidroksil, amin, tiyol ve karboksil gibi nükleofilik gruplar içeren moleküllerle yüksek düzeyde reaktivite gösterir. Bu elektrofilik ajanlar, ortamda bulunan nükleofiller ile doğrudan yer değiştirme reaksiyonlarına girerek kovalent bağ oluşumuna yol açar (88). Bu tür reaksiyonlar, özellikle HD ve Q gibi kimyasal ajanların etkisiz hale getirilmesine yönelik nötralizasyon ve dekontaminasyon stratejilerinin temelini oluşturmaktadır Günümüzde kullanılan birçok dekontaminasyon ajanı, bu nükleofilik yer değiştirme mekanizması esas alınarak geliştirilmiş olup, hardal bileşiklerinin kimyasal reaktivitesini azaltarak toksisitelerini hızlı bir şekilde sonlandırmayı hedeflemektedir (29, 32).

Bu reaksiyonların önemi yalnızca çevresel düzeyle sınırlı değildir. HD ve Q gibi elektrofilik bileşikler, canlı sistemlerde proteinler, nükleik asitler ve enzimler gibi biyomoleküllerde bulunan hidroksil, karboksil, amin ve tiyol gibi nükleofilik gruplarla da benzer mekanizmalar üzerinden etkileşime girmektedir. Özellikle tiyol ve amin grupları üzerinden gerçekleşen bu kovalent bağlanmalar, enzim aktivitesinin inhibisyonu, protein yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hatta hücresel sinyal yollarının kesintiye uğraması gibi ciddi biyolojik sonuçlar doğurabilir. Dolayısıyla, bu tür reaksiyonlar yalnızca çevresel bozunma süreçlerinin değil, aynı zamanda kükürtlü hardal bileşiklerinin biyolojik etkilerinin moleküler düzeyde anlaşılması açısından da kritik öneme sahiptir (67).

Tüm bu reaksiyon mekanizmaları, kükürtlü hardal bileşiklerinin kimyasal stabilitesi, biyolojik hedeflerle etkileşimi ve etkisiz hale getirilmesine yönelik stratejilerin geliştirilmesi açısından temel bir çerçeve sunmaktadır. Yapısal benzerlikleri doğrultusunda, HD ve Q'nun hidroliz, oksidasyon, eliminasyon ve nükleofilik yer değiştirme gibi benzer tepkime yolları izlediği görülmektedir. Bu bağlamda elde edilen bilgiler, her iki bileşiğin kimyasal reaktivitesinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır.

2.4.3. Kükürtlü Hardal Bileşiklerinin Toksisite Mekanizmaları, Toksik Etkileri ve Olası Tedavi Yaklaşımları

a. Toksisite Mekanizmaları

Oldukça yıkıcı ve sitotoksik özellikleri olan HD'nin toksisitesinin temelinde, hücre içi makromoleküllerle gerçekleştirdiği alkilasyon reaksiyonları yer almaktadır. Lipofilik yapısı sayesinde hücre zarını kolayca geçerek sitoplazmaya ulaşmaktadır. Hücre içindeki DNA, proteinler ve GSH'de dahil nükleofilik yapılar alkilasyonun başlıca hedefleridir (77, 91). Bununla birlikte Q'nun toksik etki mekanizmalarına ilişkin veriler sınırlı olup, mevcut bilgiler büyük ölçüde HD'ye yönelik çalışmalara dayanmaktadır. Ancak aynı kimyasal yapı sınıfına ait olmaları nedeniyle, HD'nin alkilasyon, oksidatif stres ve DNA hasarı gibi başlıca toksik etkilerinin Q'da dahil tüm kükürtlü hardal bileşikleri için de geçerli olduğu kabul edilmektedir. Bu bileşiklerin benzer biyolojik hedeflere etki ettikleri bildirilmektedir (75).

Glutatyon, γ-glutamil-sistein-glisin yapısında, hücre içi ortamda özellikle karaciğerde bulunan bir tripeptittir. Biyolojik aktivitesi büyük ölçüde sistein üzerindeki tiyol grubuna bağlıdır. Bu reaktif fonksiyonel grup sayesinde GSH, hücresel redoks homeostazının korunmasında başlıca antioksidan ajan olarak işlev görür. Oksidatif stres altında serbest radikaller de dahil tüm reaktif moleküllerin konjugasyon reaksiyonları aracılığı ile detoksifikasyonunda kilit bir düzenleyici rol üstlenmektedir (92).

Glutatyon, reaktif tiyol grubu aracılığıyla HD ile doğrudan konjugasyon reaksiyonlarına girer ve bu süreç sonunda GSH hızla tükenir. Aynı zamanda proteinlerdeki sülfhidril gruplarının alkilasyonu, bu moleküllerin yapısal ve işlevsel bütünlüğünü bozar. GSH tükenmesi ve protein hasarı, hücresel redoks dengesini sarsar ve antioksidan savunma sisteminin çökmesine yol açar. GSH düzeylerinde meydana gelen belirgin azalma**,** HD'nin hücre içi redoks dengesini bozmadaki temel etkilerinden biridir. Buna ek olarak, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon sentaz ve glutatyon-S-transferaz (GST) gibi GSH-bağımlı antioksidan enzimlerin aktif bölgelerinde bulunan tiyol grupları HD tarafından alkilasyona uğrar.

Bu durum, ilgili enzimlerin yapısal bütünlüğünün ve fonksiyonlarının bozulmasına yol açar. Reaktif oksijen türleri (ROS) bu koşullar altında hücre içinde kontrolsüz bir şekilde birikir. ROS birikimi, DNA, protein ve membran lipitlerine oksidatif hasar vererek hücresel işlevleri bozar. Ayrıca, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi diğer antioksidan enzimlerin de oksidatif stresin artışı ve dolaylı yapısal hasarlar nedeniyle aktiviteleri düşebilir. Antioksidan sistemlerin bu şekilde devre dışı kalması, oksidatif stresin hasarının artmasına ve zararlı etkilerinin yayılmasına zemin hazırlar (93-96).

Artan oksidatif stres hem hücre dışı ortamdan hem de endoplazmik retikulum gibi intraselüler depolardan sitoplazmaya kalsiyum girişini artırarak Ca^{2+} homeostazını bozar. Bu dengesizliğin oluşumunda, kalsiyum taşınımından sorumlu ATPaz enzimlerinin sülfhidril gruplarının HD tarafından alkilasyona uğraması kritik rol oynar**.** Sitozolde biriken kalsiyum, fosfolipaz A2'yi aktive ederek membran fosfolipitlerinden araşidonik asit salınımına neden olur. Bu süreç, hem inflamatuar yanıtın başlatılmasında görevli lipid mediyatörlerin üretimini artırır hem de hücre membranının yapısal bütünlüğünü zayıflatır. Ayrıca kalsiyum-kalmodulin kompleksi nitrik oksit sentazı aktive ederek nitrik oksiti artırır. Nitrik oksitin reaktif olan peroksinitrite dönüşümü nitrözatif stresi tetikler ve bu HD kaynaklı sitotoksik etkinin şiddetlenmesinde önemli bir ara basamak olarak kabul edilmektedir (97-100).

Kükürt hardalının bir diğer önemli etkisi de enerji metabolizmasının merkez organeli olan mitokondri üzerinedir. Mitokondriyal zarın geçirgenliğindeki artış ve yapısal bütünlüğündeki kayıp, HD'nin hücre içi organeller üzerindeki yıkıcı etkilerinden biridir. Aynı zamanda, HD'ye maruz kalımda mitokondriyal DNA alkilasyona uğrayarak işlevsel kayıplar ortaya çıkar. Bu bozulmalar, mitokondriden sitozole sitokrom C'nin salınmasına neden olur. Sitokrom C, intrinsik (mitokondriyal) apoptoz yolunun temel tetikleyicisidir ve apoptotik peptidaz aktive edici faktör-1 aracılığıyla kaspaz-9'un aktivasyonunu başlatır. Aktive olan kaspaz-9, yürütücü kaspazlardan kaspaz-3'ü etkinleştirerek hücrenin programlanmış ölüm sürecini başlatır. Buna ek olarak, HD'nin etkisiyle Fas ve benzeri ölüm reseptörlerinin uyarılması da söz konusudur. Bu yol, ekstrinsik (reseptör aracılı) apoptoz olarak tanımlanmaktadır. Reseptörlerin aktivasyonu, kaspaz-8 üzerinden başlatılır ve yine

kaspaz-3'ün aktivasyonu ile sonlanır. Böylece, HD hem mitokondriyal hem de membran kaynaklı apoptoz sinyal yolaklarını eşzamanlı olarak devreye sokarak hücre ölümüne neden olur (101-103).

Bifonksiyonel alkilleyici yapıya sahip olan HD, DNA yapısındaki belirli belirli bölgelerle çapraz bağlar ve çeşitli katım ürünleri oluşturmaktadır. Bu nedenle, DNA'nın yapısal bütünlüğünü bozarak replikasyon ve transkripsiyon gibi temel işlevlerin aksamasına yol açmaktadır. Bu etkilerin bir sonucu olarak, hücre döngüsü G1 fazında durur ve DNA onarım mekanizmaları aktive olur. Bu süreçte önemli bir rol üstlenen poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP), DNA hasarını tanımlayarak onarımı başlatmak üzere aktive olur. PARP enzimi, işlevini yerine getirebilmek için kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) kullanır. Genişleyen DNA hasarı durumunda PARP'ın aşırı aktivasyonu, NAD^+ rezervlerinin hızla tükenmesine neden olur. Bu da ATP üretimini sekteye uğratarak hücre enerji metabolizmasını bozar. Enerji dengesinin çökmesi, mitokondriyal hasarda anlatıldığı şekilde hem apoptotik hem de nekrotik hücre ölümü süreçlerini tetikleyebilir (101, 104-108).

Oksidatif stresin ilerleyen etkileri, hücre zarını oluşturan lipit yapılarının da hedef alınmasına neden olur. Bu süreçte HD'nin tetiklediği ROS birikimi, membran fosfolipitleri üzerinde yıkıcı peroksidatif hasarlara yol açar ve malondialdehit ve 4-hidroksi-2-nonenal gibi birçok reaktif aldehitin oluşmasına neden olur. Ayrıca lipit peroksitleri, zarın geçirgenliğini ve yapısal bütünlüğünü bozar. Bu durum, iyon dengesinin korunmasını engeller, hücre içi homeostazı bozar ve hücreyi nekrotik veya apoptotik sürece daha duyarlı hale getirir (95, 109).

İnflamasyon, HD'nin neden olduğu hücresel toksik etkilerin önemli ve erken faz yanıtlarından biridir. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, maruziyeti takiben çeşitli proinflamatuvar sitokinlerin salındığı gösterilmiştir. Başta tümör nekroz faktörü-α, interlökin-1α, interlökin-1β, interlökin-6 ve interlökin-8 olmak üzere birçok sitokin düzeyinde belirgin artış gözlenir. Bu sitokinler, inflamatuvar yanıtın başlatılması ve yaygınlaşmasında rol oynar. HD, ayrıca nükleer faktör kappa B sinyal yolaklarını aktive ederek inflamasyonla ilişkili gen ekspresyonlarını artırır (110). Bu süreç, siklooksijenaz-2, indüklenebilir nitrik oksit sentaz ve miyeloperoksidaz gibi

proinflamatuvar enzimlerin üretimini tetikler. Artan enzim ekspresyonu, oksidatif stresin ve dokusal hasarın ilerlemesine katkıda bulunur (101, 111-113).

Toksisite mekanizmaları başlığı altında HD üzerinden literatür verileri ile detaylandırılan toksisite mekanizmalarının, benzer yapısal ve reaktif özellikler taşıyan tüm kükürtlü hardal bileşikleri için de geçerli olması beklenmektedir. Bu bileşikler, DNA, protein ve enzimlerle doğrudan etkileşime girerek moleküler düzeyde yaygın yapısal ve işlevsel bozulmalara neden olurlar. Bu hasarlar, apoptoz ve nekroz gibi farklı hücre ölüm yollarını aynı anda tetikleyen kümülatif bir toksik yanıt oluşturur. Etki mekanizmaları spesifik reseptör etkileşimine dayanmaz; bunun yerine, doğrudan kimyasal reaktivite yoluyla hücre içi nükleofilik merkezlerle spontan olarak etkileşime girerler. Bu özgül olmayan hedefleme biçimi, kükürtlü hardal bileşiklerinin başta deri, solunum yolları, göz ve hematopoetik sistemler olmak üzere birçok organ sisteminde etkili olan multisistemik bir toksisite profili sergilemelerine neden olur. Gelişen hasar çoğu durumda geri dönüşsüzdür ve bu ajanları hem akut hem de geç dönem etkileri açısından yüksek riskli kimyasal savaş bileşikleri haline getirir (75, 78).

b. Toksik Etkileri ve Tedavi Yaklaşımları

Akut ve Kronik Toksisite

Kükürtlü hardal bileşiklerinin toksik etkileri, doğrudan öldürücülüklerinden ziyade, neden oldukları kalıcı doku hasarı ve uzun süreli sistemik etkiler nedeniyle önem arz etmektedir (114). Sinir ajanlarıyla karşılaştırıldığında, bu bileşiklerin akut letal toksisiteleri oldukça düşüktür (Tablo 2.6). Örneğin, I. Dünya Savaşı ve İran-Irak Savaşı sırasında meydana gelen HD maruziyeti sonucunda bildirilen ölüm oranları %4'ün altında kalmıştır. Bu veriler, HD'nin esas olarak ölümcül etkilerinden ziyade, letal olmayan ancak belirli maruziyet düzeylerinde ciddi doku hasarı ve sağlık sorunlarına yol açabilen bir toksisite profiline sahip olduğunu göstermektedir (115).

Tablo 2.6. Bazı sinir ajanları ve HD'nin insanlar için tahmin edilen toksik seviyeleri (116).

	Solunum LCt_{50} (mg/dk m^3)	**Deri teması LD_{50} (mg kg^{-1})**
VX	50	0,14
Soman	70	0,7
Sarin	100	24
HD	1500	100

LC_{50}: Medyan letal konsantrasyon; LD_{50}: Medyan letal doz

Kükürtlü hardal bileşikleri, göreceli olarak yüksek konsantrasyonlarda akut toksisite oluşturmasına rağmen, letal olmayan dozlarda dahi kalıcı ve multisistemik hasarlara yol açabilmektedir (78). Bu ajanlara bağlı gelişen en karakteristik akut etki ise, maruz kalınan dokularda bül oluşumudur (117, 118). Bu etki, bileşiklerin vezikan güçleri arasında karşılaştırmalı değerlendirmeye olanak tanımaktadır. Kükürtlü hardal bileşikleri arasında, en güçlü vezikan etkinin Q bileşiğine ait olduğu bildirilmektedir (17, 18, 81, 119). Yapılan bir çalışmada, Q'nun vezikan gücünün HD'ye kıyasla yaklaşık beş kat daha yüksek olduğu gösterilmiştir (120). Ayrıca yapılan bir *in vitro* çalışmada, Q'nun diğer analoglara kıyasla deri hücreleri üzerinde daha yüksek sitotoksisite oluşturduğu saptanmıştır (121). Erken dönem hayvan deneylerinden elde edilen bazı akut toksisite verileri Tablo 2.7'de özetlenmiştir. Bu veriler genel olarak, Q'nun HD'ye kıyasla daha toksik bir profil sergilediğini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, toksisite değerlerinin farklı deneysel koşullara ve kaynaklara bağlı olarak değişkenlik gösterebileceği dikkate alınmalıdır (116).

Tablo 2.7. HD ve Q için tahmini toksiste değerleri (116).

	HD		**Q**	
	Değer	**Uygulama Yöntemi**	**Değer**	**Uygulama Yöntemi**
LD_{50}	4000-7000 mg	Deri üzerine sıvı	200 mg	Deri üzerine sıvı-aerosol
LCt_{50}	750-1500 mg/dk m^3	Buhar	200 mg/dk m^3	Buhar
ICt_{50}	100-1500 mg/dk m^3	Buhar	50 mg/dk m^3	Buhar

LC_{50}: Medyan letal konsantrasyon; LD_{50}: Medyan letal doz; ICt_{50}: Medyan kapatise bozucu konsantrasyon

Klinik Toksisite

Kükürt hardalının birincil toksik etkileri hızlı gelişir ve büyük ölçüde geri dönüşümsüzdür. Kısa süreli bir asemptomatik latent dönem sonrasında ortaya çıkan toksisite hem akut hem de uzun süreli patofizyolojik etkilere neden olur (122). HD'nin maruz kalan kişideki akut toksik etkileri en çok göz, solunum yolları ve deride görülmekte olup, bu organlardaki etkiler diğer sistemik belirtilere kıyasla çok daha belirgindir. Bu nedenle, söz konusu üç organ, HD'nin primer hedef organları olarak kabul edilmektedir (77). Akut toksik etkiler genellikle farklı sürelerde ortaya çıkmaktadır (Tablo 2.8). Bu süreyi etkileyen başlıca faktörler arasında maruz kalınan doz, maruziyet yolu, çevresel sıcaklık ve nem, kişisel koruyucu donanım kullanımı ile bireysel fizyolojik farklılıklar yer almaktadır (123).

Tablo 2.8. HD'ye bağlı akut toksik etkilerin zamana bağlı gelişimi (123).

Maruziyetten Sonra Geçen Süre	Belirtiler ve Bulgular
30–60 dakika	Bulantı, kusma, gözlerde batma hissi görülebilir.
2–6 saat	Şiddetli göz yanması, lakrimasyon, blefarospazma bağlı fotofobi, burun akıntısı, hapşırık, boğaz ağrısı en belirgin belirtilerdendir.
6–24 saat	Deride sırasıyla eritem, vezikül ve ardından bül oluşumları görülür, afoni, ses kısıklığı, kuru öksürük gelişebilir.
24–48 saat	Büller belirginleşir, deride yoğun kaşıntı, prodüktif öksürük ve doku dökülmesi, göz etkileri en şiddetli düzeye ulaşır.
2–6 gün	Gözde kademeli iyileşme başlar; yanık alanlarda hiperpigmentasyon, sekonder bronkopnömoni gibi enfeksiyonlar gelişebilir.
6 gün–6 hafta	Göz toksisite semptomları tamamen düzelir (korneada pürüzlenme olabilir); büller yavaş iyileşir, solunum semptomları geriler fakat hafif öksürük ve ses kısıklığı 6 haftaya kadar sürebilir.

Kükürtlü hardal bileşiklerine karşı en duyarlı organlar göz ve deridir. Maruziyeti takiben ortaya çıkan spesifik ilk klinik belirtiler genellikle bu iki organda gözlemlenmektedir (Şekil 2.7)(124).

Şekil 2.7. HD maruziyeti sonrasında görülen tipik semptomlar **a.** Oküler semptomlar; bilateral konjonktivit, göz kapağı ödemi, blefarospazm ve fotofobi **b.** Dermal semptomlar; eritem, vezikül ve bül oluşumları (124).

Bununla birlikte, maruz kalım sonrasında göz, deri ve solunum sistemine ek olarak, gastrointestinal sistem, hematopoetik sistem, immün sistem, kardiyovasküler sistem ve santral sinir sistemi üzerinde de akut, kronik ve gecikmiş toksik etkiler de bildirilmiştir (77, 125) . HD maruziyetine bağlı organ ve sistem düzeyindeki genel toksik etkiler Tablo 2.9'da özetlenmiştir.

Tablo 2.9. HD maruziyeti sonucu gelişen akut, kronik ve gecikmiş klinik toksik etkiler (58, 77, 115, 123-128).

Organ / Sistem	**Akut Etkiler**	**Kronik Etkiler**	**Gecikmiş Etkiler**
Deri	Eritem Vezikül Bül oluşumu	Kuruluk Pigmentasyon	Hiperpigmentasyon Papüler döküntü Atrofik skar eritematöz
Göz	Yanma Batma hissi Lakrimasyon Blefarospazm Fotofobi Korneal neovaskülerizasyon Fotofobi Göz kapağı ödemi	Kronik konjonktivit, Korneada incelme Korneal opasite	Bulanık görme, Görme bozukluğu, Keratit Üveit
Solunum Sistemi	Boğaz ağrısı Burun akıntısı Öksürük ve hırıltı Bronşiyal lezyonlar	Astım, Bronşektazi KOAH	Öksürük Balgam çıkarma Dispne ve hemoptizi Bronkopnömoni
Gastrointestinal sistem	Mukozal nekroz Kanlı ishal Kusma Bulantı	Bulantı, Karın ağrısı Anoreksi	-

Tablo 2.1. (Devam) HD maruziyeti sonucu gelişen akut, kronik ve gecikmiş klinik toksik etkiler (58, 77, 115, 123-128).

Organ / Sistem	Akut Etkiler	Kronik Etkiler	Gecikmiş Etkiler
İmmün sistem	-	İmmünosupresyon Doğal öldürücü hücrelerin sayısında azalma	Doğal öldürücü hücrelerin sayısında azalma
Hematopoetik sistem	Lökositoz Kanama	Trombositopeni Anemi	Anemi
Sinir Sistemi	Konvülsiyon Hiperestezi Baş ağrısı	Nöropati Yorgunluk Parestezi	-

Klinik Tedavi Yaklaşımları

Kükürt hardalının özellikle akut maruziyeti sonrası gelişen toksisite tablosu hızlı ortaya çıkmakta ve geri döndürülmesi oldukça güç olmaktadır. Kısa süreli bir asemptomatik latent dönemi takiben gelişen bu toksisite hem akut hem de uzun süreli patofizyolojik etkilerle karakterizedir. Bu nedenle, klinik tedavi yaklaşımları ağırlıklı olarak destekleyici nitelikte olup, oluşan patolojik süreçleri hafifletmeyi ve iyileşme sürecini desteklemeyi hedeflemektedir (122). Günümüzde HD'ye karşı geliştirilmiş, onaylanmış spesifik bir antidot bulunmamaktadır (114). Ancak HD'nin toksik etkilerinde rol oynayan primer mekanizmaların; sitotoksisite, DNA hasarı, tiyol/antioksidan dengesinin bozulması, inflamasyon ve oksidatif stres olduğu göz önünde bulundurularak, bu süreçleri hedef alan yeni tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla yürütülen deneysel araştırmalar ve klinik çalışmalar, henüz onaylanmış bir standart antidotal tedaviye ulaşamamış olsa da çeşitli ajanların potansiyel etkilerini ortaya koymuştur. Şu ana kadar semptomatik ve destekleyici tedavide; bronkodilatörler, kortikosteroidler, immünosupresif ilaçlar, antibiyotikler, sekresyon süpürücü ajanlar, antioksidanlar, lipit peroksidasyon inhibitörleri, proteaz inhibitörleri ve antiinflamatuvar ilaçlar kullanılmıştır. Ayrıca, PARP inhibitörleri, makrolid grubu antibiyotikler, kalmodulin antagonistleri, kalsiyum şelatörleri ve antiinflamatuvar ilaçların çeşitli kombinasyonları da tedaviye yönelik potansiyel ajanlar arasında önerilmektedir (125).

Maruz kalım sonrasında kişinin tedavisinde öncelik, dekontaminasyonun hızlı bir şekilde sağlanmasıdır. Bu kapsamda kontamine giysilerin çıkarılması, cilt ve gözlerin bol su veya uygun solüsyonlarla yıkanması, ardından hastanın tıbbi merkeze transferi ilk basamakları oluşturur (126). Sistemik düzeyde, antidotal etki gösteren sodyum tiyosülfat (500 mg/kg) uygulanması önerilmektedir. Ayrıca sistein, E vitamini ve kortikosteroidler gibi ajanlar da destekleyici tedavide yer almaktadır (129). Deri lezyonlarında %0,2–0,3 kloramin-T çözeltisi antiseptik amaçla önerilmekte, gümüş sülfadiazin sekonder enfeksiyonların önlenmesinde kullanılmakta, kalamin losyonu ve topikal kortikosteroidler ise eritemi azaltmak amacıyla tercih edilmektedir (130-132). Göz temasında ise %1,5 sodyum bikarbonat veya %0,5 dikloramin-T ile göz yıkama, yapay gözyaşı, topikal antibiyotikler ve kortikosteroidler, akut oküler semptomların yönetiminde etkili ajanlardır (133, 134). Solunumsal etkilerde oksijen desteği, nemlendirilmiş hava uygulanması ve sekresyon viskozitesini azaltmak amacıyla hidrasyon sağlanmalıdır. Ayrıca N-asetilsistein, bronkodilatörler, antibiyotikler ve kortikosteroidler, solunum yolu hasarının yönetiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (135-137).

2.4.4. Toksikokinetik

Literatürde Q bileşiğine ilişkin toksikokinetik veriler oldukça sınırlı olup sunulan bulgular, Q ile benzer yapısal özelliklere sahip olan HD bileşiğine aittir. Bu nedenle tezin bu bölümünde HD ile ilgili araştırmalardan elde edilen literatür verilerinden yararlanılmıştır. Her iki bileşik de kükürtlü hardal bileşikleri grubunun üyesi olup vezikan ajanlar sınıfı içerisinde değerlendirilmektedir. Bu yapısal benzerlik, HD'nin absorbsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım süreçlerine ilişkin elde edilen bilgilerin Q için de büyük ölçüde geçerli olabileceğini desteklemektedir.

a. Absorbsiyon

Lipofilik yapısı sayesinde HD, başta deri, solunum yolları ve göz mukozası olmak üzere pek çok biyolojik bariyeri kolaylıkla geçebilen bir ajandır. Özellikle epidermisin lipit yapısı, ajan için hem bir depo görevi görür hem de sistemik geçişe

olanak tanır. HD'nin cilde uygulanmasını takiben emilim oranı, maddenin fiziksel hali (sıvı/buhar), uygulama şekli (oklüzyonlu/oklüzyonsuz), çevresel koşullar (sıcaklık, nem) ve anatomik özelliklere (deri kalınlığı, kıl yoğunluğu) bağlı olarak değişkenlik gösterir (78).

Ex vivo bir çalışmada sıvı HD'nin absorpsiyon hızı 71–294 µg/cm²/saat aralığında ölçülmüş (138) ve bu oranlar gönüllü insanlarda yapılan *in vivo* çalışmada ise 60–240 µg/cm²/saat olarak bulunmuştur (139). Maruziyet sonrası HD'nin yaklaşık %80'lik bir kısmının ortamdan buharlaştığı, geri kalan kısmının ise lokal dokuda kaldığı veya sistemik dolaşıma geçtiği tahmin edilmektedir. Oklüzyon altında uygulandığında ise buharlaşma minimal düzeyde kalır ve emilim %90'a kadar yükselebilir. Özellikle saç folikülleri içeren kafa derisi gibi ince epitelyal bölgeler, yüksek geçirgenlikleri nedeniyle ajan geçişi açısından kritik bölgeler olarak öne çıkar (140). Radyoaktif izleyicilerle yapılan çalışmalarda, HD maruziyetinden yalnızca dakikalar sonra toplam dozun büyük kısmının penetre olarak deride bulunduğu saptanmıştır (141).

Solunum sistemi de HD'nin organizmaya girişinde önemli bir rol oynamaktadır. Solunum yoluyla maruz kalındığında, HD nazal sistemin mukoza zarından %70–90 oranında emilir (141). HD'nin gastrointestinal sistem ya da oküler temasla emilimi de teorik olarak mümkündür ancak sistemik etkiler açısından bu yollar ikincil önemdedir. Buna rağmen bu giriş yollarında meydana gelen lokal hasar oldukça ciddi olabilir ve klinik açıdan önem taşır (142).

b. Dağılım

Lipofilik yapısı nedeniyle HD vücutta homojen olmayan bir dağılım göstermektedir. Yapılan çalışmalar, özellikle yağ dokusu ve beyin gibi lipit açısından zengin dokularda birikim eğiliminde olduğunu göstermiştir. Maruz kalımdan yedi gün sonra hayatını kaybeden bir kişinin otopsisinden elde edilen örneklerde, en yüksek HD konsantrasyonlarının yağ dokusu, subkutan doku ve beyinde bulunduğu rapor edilmiştir (143). Bu bulgular, sıçan modellerinde yapılan deneysel çalışmalarla da desteklenmiştir (144).

Kükürt hardalının vücuttaki dağılımı, farmakokinetik açıdan iki bölmeli model ile tanımlanacak olursa ilk olarak merkezi kompartmanda (kan ve iyi perfüze edilen organlar) hızla dağılmaktadır. Ardından periferik kompartmanlara (kas, yağ dokusu vb.) geçerek burada daha uzun süre kalır. HD için bildirilen başlangıç α-yarılanma süresi 5,56 dakika, terminal β-yarılanma süresi ise 3,59 saat olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, sabit durum dağılım hacminin 74,4 L/kg gibi yüksek bir değer göstermesi, ajanın büyük oranda plazma dışı kompartmanlara geçiş yaptığını ve bu dokularda birikim gösterdiğini ortaya koymaktadır (145). HD maruziyetinden otuz gün sonra yeni bül oluşumunun gözlemlenmesi de *stratum korneumda* birikerek bozulmadan kalan HD ile ilişkilendirilmiştir (126).

Bu veriler, kükürtlü hardal bileşiklerinin sadece maruz kalınan anda değil, uzun vadeli etkiler açısından da yönetilmesi gereken bir tehlike oluşturduğunu ortaya koymaktadır. Lipofilik dokularda uzun süre kalabilen bu bileşikler, tedavi protokollerinin sadece semptomlara değil, rezidüel ajanın uzaklaştırılmasına da odaklanmasını gerekli kılmaktadır. Özellikle dermal maruziyetlerde geç de olsa yeniden lezyon gelişme riski, klinik izlemin uzun süre devam etmesini zorunlu kılmaktadır.

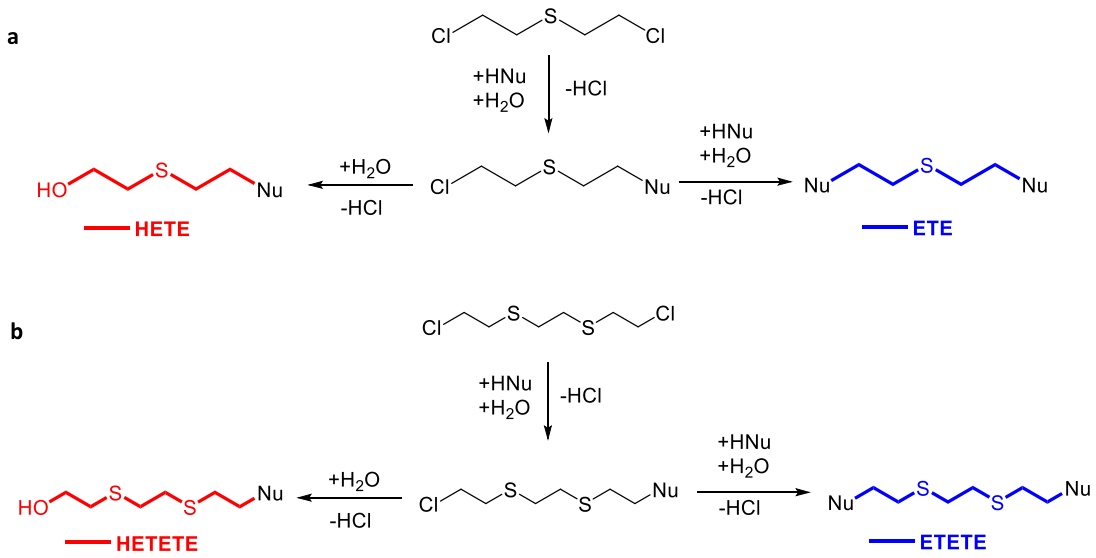
c. Metabolizma

Kükürtlü hardal bileşiklerinin toksisitesinin altında yatan mekanizma bu bileşiklerin fizyolojik koşullarda metabolizma reaksiyonları sonucunda, molekül içi halkalaşma yoluyla reaktif bir episülfonyum iyonu oluşturmalarına dayanmaktadır (34, 72, 73, 146). Bu episülfonyum iyonu yüksek elektrofilik özelliği sayesinde canlı sistemlerdeki DNA, protein, GSH, lipid ve özellikle su molekülleri dahil hemen her türden nükleofilik merkezle hızlı reaksiyonlara girme potansiyeline sahiptir. HD, oksidatif mekanizmalar, sulu ortamda gerçekleşen spontan hidroliz, GSH ile konjugasyon ve bu konjugatların ileri metabolizma süreçlerinin yanı sıra, canlı sistemlerde bulunan nükleofilik biyolojik makromoleküller ile doğrudan kovalent bağ oluşturarak alkilasyon reaksiyonlarına neden olmaktadır. HD'nin biyolojik sistemlerdeki etkileri, detoksifikasyon ve toksisite olmak üzere iki ana eksende

değerlendirilmektedir. Bu doğrultuda, GSH konjugasyonu, hidroliz ve oksidatif reaksiyonlar başlıca detoksifikasyon mekanizmalarını oluşturur. DNA ve proteinler üzerinde meydana gelen kovalent bağlanma ürünleri ise, HD'nin genotoksik ve sitotoksik etkilerinin temel belirleyicileri olarak kabul edilmektedir (138, 142, 147).

Bifonksiyonel alkilleyici yapısı, HD'yi biyolojik sistemlerde hem mono- hem de bifonksiyonel etkileşimlere yatkın hale getirmektedir. Bu özellik sayesinde, hedef biyolojik makromoleküller üzerinde ya tekli alkilasyonla sonuçlanan kovalent modifikasyonlar ya da iki farklı nükleofilik merkez arasında çapraz bağ (*cross-link*) oluşumu meydana gelebilir. İlk alkilasyon adımının ardından, reaktif klor atomlarından biri yerini bir nükleofile bırakırken, diğer klorun su molekülüyle yer değiştirmesi sonucunda hidroksietiltiyoetil (HETE) grubu içeren bir yapı ortaya çıkar. Bu yapı, hedef moleküle kovalent olarak bağlanmış HETE-bağıntılı kovalent katım ürünü oluşumu ile sonuçlanır. Ayrıca her iki elektrofilik merkez de birer nükleofil ile yer değiştirdiğinde, etiltiyoetil (ETE) köprüsü üzerinden iki nükleofilik merkez birbirine bağlanarak moleküller arası çapraz bağ oluşumu gerçekleşebilir (148-150).

İki farklı formasyon HD toksisite mekanizması açısından karakteristik kimyasal modifikasyonlar olarak kabul edilmektedir. Yapısal benzerlikleri göz önünde bulundurulduğunda, HD ve Q'nun benzer nükleofilik yer değiştirme tepkime yolları izlediği değerlendirilmektedir. Bu ortak reaktivite temeline dayanarak, benzer bir katılım mekanizmasının Q için de geçerli olabileceği öngörülmektedir. HD'ye kıyasla fazladan bir tiyoetil grubuna sahip olan Q'nun, hidroksietiltiyoetiltiyoetil (HETETE) grubu aracılığıyla tekli alkilasyon oluşturma kapasitesine sahip olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, etiltiyoetiltiyoetil (ETETE) köprüsü üzerinden iki nükleofilik merkezi birbirine bağlayarak çapraz bağ oluşumuna da olanak tanıyabileceği değerlendirilmektedir. Bu mekanizmalar, Şekil 2.8'de HD ve Q'nun nükleofillerle verdikleri reaksiyonlar üzerinden karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir.



Şekil 2.8. HD (a) ve Q (b) bileşiklerinin nükleofilik merkezlerle reaksiyonları sonucunda monoalkilasyon ve çapraz bağlanma ürünlerinin oluşumu.

Kükürt hardalının metabolizmasını aydınlatmaya yönelik yapılan bir çalışmada, radyoaktif izotop (^{35}S) ile işaretlenmiş HD intravenöz yolla fare, sıçan ve iki terminal evre kanser hastasına uygulanmıştır. İdrar, dışkı, solunum havası, kan ve safra örnekleri toplanmıştır. Yapılan gözlemlerde, kemirgenlerde radyoaktivitenin büyük bir bölümü ilk 24 saat içinde idrarla atılırken, insanlarda radyoaktivitenin daha uzun süre vücutta kaldığı ve idrarla atılımın daha yavaş gerçekleştiği gözlenmiştir. Kandaki radyoaktivite, uygulamadan sonraki ilk saat içerisinde hızla düşmüş, ardından sabit kalmıştır. Bu durum, HD'nin proteinler ve DNA gibi biyomoleküllere kalıcı olarak bağlandığını düşündürmektedir. Deneklerin idrar örneklerinde saptanan metabolitler arasında HD'nin hidroliz ve oksidasyon ürünleri, GSH konjugatları ve bu konjugatların oksidasyon ürünleri ile diğer biyomoleküllere bağlı türevleri en yüksek oranda bulunmuştur. Ayrıca inorganik sülfat, isetiyonik asit ve sülfoasetik asit gibi düşük oranlı biyotransformasyon ürünleri de tespit edilmiştir. Bu bulgular, HD'nin başlıca hidroliz ve GSH konjugasyonu yolakları aracılığıyla metabolize olduğunu göstermektedir (151). Tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, HD'nin hidroliz ve oksidasyon, GSH ile konjugasyon ve protein ile DNA gibi biyomoleküllere kovalent bağlanma yolakları üzerinden biyotransformasyona uğradığı sonucuna varılmıştır. Bu

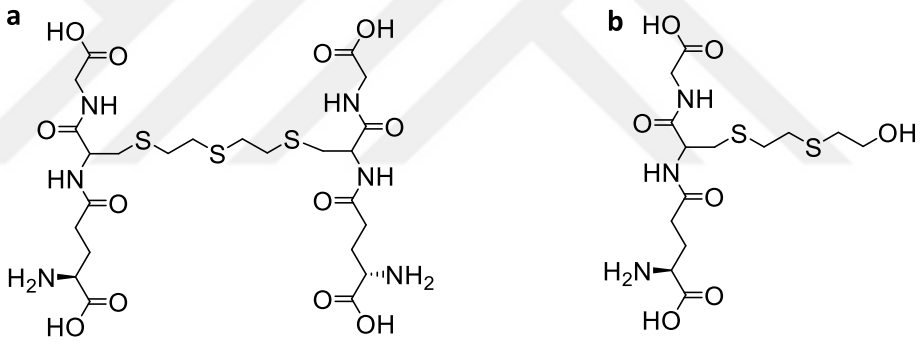
değerlendirmeler hem *in vitro* hem de *in vivo* yöntemlerle yapılan çeşitli çalışmaların bulgularıyla da desteklenmiştir (152-159).

- **Hidroliz-Oksidasyon**

Kükürt hardalının fizyolojik ortamda ilk karşılaştığı ve en çok bulunan nükleofil olan su molekülleri, episülfonyum iyonuna doğrudan nükleofilik saldırı gerçekleştirmektedir. Bu nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu sonucunda, HD'nin detoksifikasyonunda temel rol oynayan ve retrospektif biyobelirteç analizlerinde sıklıkla kullanılan TDG oluşur. TDG, HD maruziyetinin doğrulanmasında önemli bir ilk aşama metaboliti olarak kabul edilmektedir (160). Hayvan modelleriyle gerçekleştirilen toksikokinetik çalışmalarda, HD'nin intraperitoneal, intravenöz ve kutanöz uygulamalarını takiben sıçan idrarında TDG tespit edilmiştir. TDG'nin atılımı, uygulamayı takiben ilk 6 saat içinde maksimum seviyeye ulaşmakta, ardından hızla azalmaktadır. Bununla birlikte, TDG'nin idrarda sekiz güne kadar izlenebilir olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmalarda, TDG'nin spontan ya da enzimatik yollarla oksidasyona uğrayarak TDGO'ya dönüştüğü, ayrıca TDGO'nun idrarla atılım düzeylerinin TDG'ye kıyasla daha yüksek olduğu saptanmıştır (152, 153). HD maruziyetine uğrayan insanlardan alınan idrar örneklerinin analizi de TDG ve TDGO'nun idrar yoluyla atıldığını doğrulamaktadır (154, 156, 161, 162). Benzer şekilde, deneysel verilerle tam olarak desteklenmese de Q'nun da HD'ye benzer şekilde hidrolize uğrayarak idrarla atıldığı yönünde görüşler bulunmaktadır. Bu doğrultuda, Q'nun hidroliz ürünü olan BHETE'nin idrarda tespitine yönelik yöntem geliştirme çalışmaları da mevcuttur (163, 164). Buna ek olarak, HD su ile reaksiyona girmeden doğrudan oksidasyona uğrayarak HDO ve HDO_2 formlarına dönüşebilmektedir. HD'ye maruz bırakılan sıçanların plazmasında hem HDO hem de HDO_2 tespit edilmiştir (165). Benzer şekilde, kaza sonucu HD maruziyeti yaşayan bireylerin kan örneklerinde de HDO varlığı doğrulanmıştır (161).

- **GSH Konjugasyonu**

Toksikokinetik çalışmalar, HD'nin büyük ölçüde hidroliz, oksidasyon ve GSH ile konjugasyon yoluyla metabolize olduğunu ortaya koymuştur. Deneklerin idrar örneklerinde tespit edilen biyotransformasyon ürünlerinin büyük çoğunluğu GSH konjugatlarına ve bunların ileri metabolitlerine aittir (151-153). HD'nin monoglutatyonil ve bisglutatyonil konjugatları (Şekil 2.9) bazı *in vitro* çalışmalarda tanımlanmıştır (166, 167). Bu GSH konjugatlarının ileri metabolizması sonucu oluşan ve literatürde detaylı biçimde tanımlanmış üç ana metabolit şunlardır: 1,1'-sülfonilbis-[2-S-(N-asetilsisteinil)etan] (SBSNAE), 1,1'-sülfonilbis[2-(metilsülfinil)etan] (SBMSE) ve metilsülfinil-2-[2-(metiltiyo)etilsülfonil]etan (MSMTESE) (152, 153). Bununla birlikte HD'ye maruz kalan bireylerin idrar örneklerinde bu üç metabolite ek olarak 1-sülfonilbis(metiltiyo)etan da (SBMTE) tespit edilmiştir (154, 161).

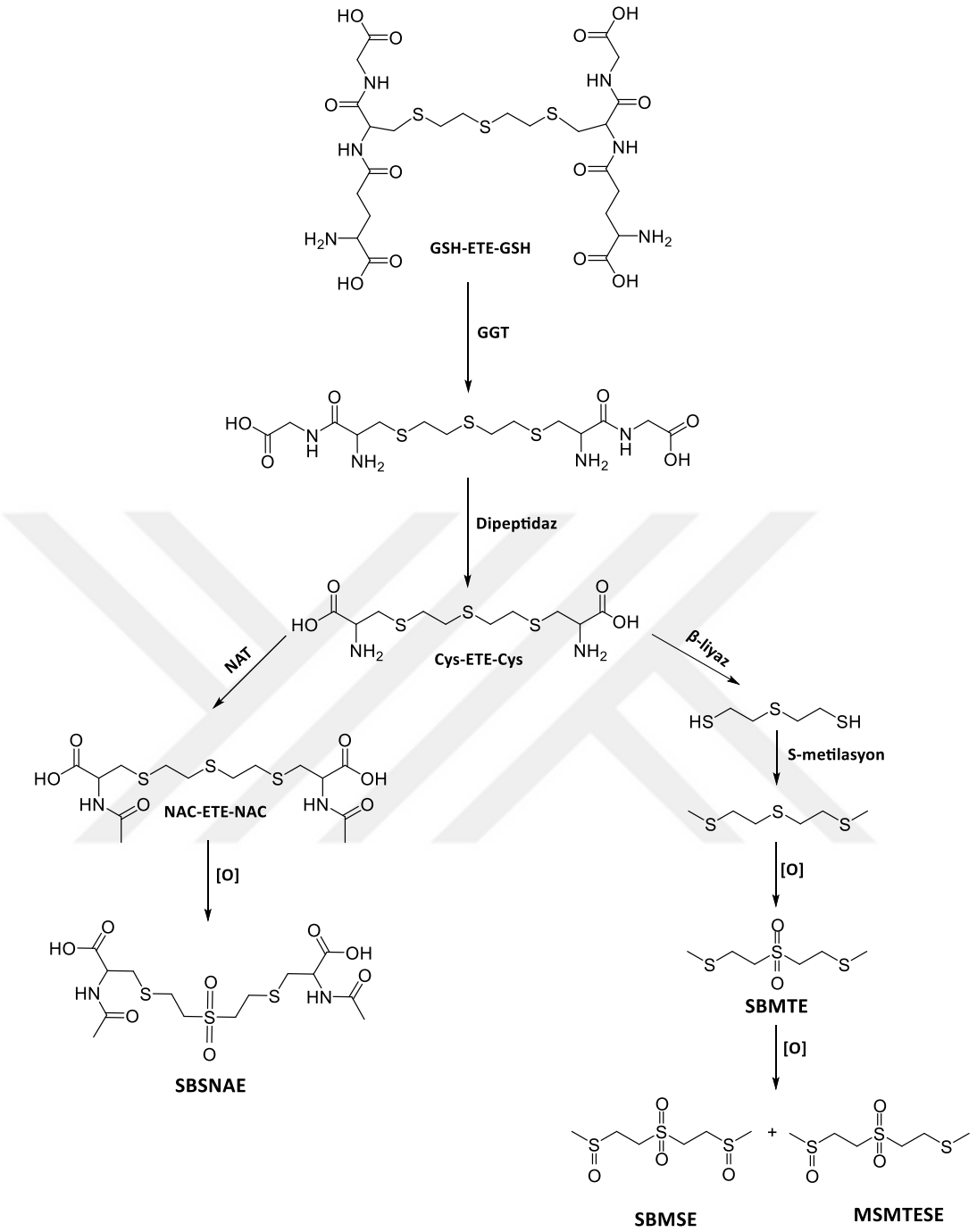


Şekil 2.9. HD'nin GSH konjugatları; a. HD bisglutatyonil konjugatı (GSH-ETE-GSH) b. HD monoglutatyonil konjugatı (HETE-GSH).

Vücutta en çok bulunan serbest nükleofillerden biri, reaktif bir tiyol grubuna sahip bir tripeptid olan GSH'dir (168, 169). GSH, HD gibi elektrofilik bileşikleri konjuge ederek vücuttan uzaklaştıran önemli bir antioksidan molekül olup, potansiyel alkilleyici ajanların detoksifikasyonunda fizyolojik açıdan kritik bir rol üstlenir. Cooper ve Hanigan, kükürtlü hardal bileşikleri gibi reaktif elektrofilik ajanların GSH konjugatlarının ileri metabolizmasını, merkaptürik asit yolu ve β-liyaz metabolizması üzerinden açıklamaktadır. Buna göre GSH konjugasyonu, GST enzimleri tarafından katalizlenen, elektrofilik substrat ile GSH'nin tiyol grubu arasında gerçekleşen nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu ile başlar. HD gibi bifonksiyonel elektrofilik

ajanlar, bu süreçte mono- ve bis(glutatyonil)-S konjugatlarına dönüşür. Oluşan GSH konjugatları, sırasıyla γ-glutamiltransferaz (GGT) tarafından glutamat grubunun uzaklaştırılması ile sisteinilglisin konjugatlarına ve ardından sisteinilglisin dipeptidazlar tarafından glisin biriminin ayrılmasıyla sistein-S-konjugatlara dönüştürülür. Bu aşamada sistein-S-konjugatlar, β-liyaz enzimleri aracılığıyla serbest tiyol içeren ara ürünlere parçalanır. Ortaya çıkan bu serbest tiyoller, S-adenozil metiyonin (SAM) kofaktörünün aracılık ettiği bir metilasyon tepkimesiyle S-metil tiyol türevlerine dönüşür. *"Thiomethyl shunt"* olarak adlandırılan bu yolak, sonraki aşamada sülfür oksidasyonu ile devam eder ve ürünler sırasıyla sülfoksite veya sülfon yapılarına oksitlenir. Öte yandan, bazı sistein-S-konjugatlar N-asetiltransferazlar (NAT) aracılığıyla NAC-S-konjugatlarına dönüştürülür. Bu merkaptürik asit türevleri de benzer şekilde oksidasyona uğrayarak sülfoksit ve sülfon türevlerine dönüşebilir (170).

Kükürt hardalı ve Q gibi bisfonksiyonel elektrofilik ajanlarla GSH arasında gerçekleşen reaksiyonlar sonucunda, hem mono-konjugatlar hem de her iki elektrofil grubun katılımıyla oluşan bis-konjugatlar meydana gelebilmektedir. Bu konjugatlar, GSH yolakları üzerinden merkaptürik asit metabolizmasına yönlendirilir ve ileri aşamalarda hem β-liyaz aracılı yıkıma hem de oksidatif modifikasyonlara uğrar (170). Bu durum metabolizma sonucunda ortaya çıkan metabolitlerin hem çeşitliliğini hem de sayısını artırır. Yukarıda verilen bilgilerden uyarlanarak hazırlanan HD'nin GSH konjugatlarının metabolik dönüşüm şeması Şekil 2.10'da sunulmuştur.



Şekil 2.10. HD'nin GSH konjugasyonu sonrası gerçekleşen merkaptürik asit ve β-liyaz yollarını içeren metabolik dönüşüm şeması.

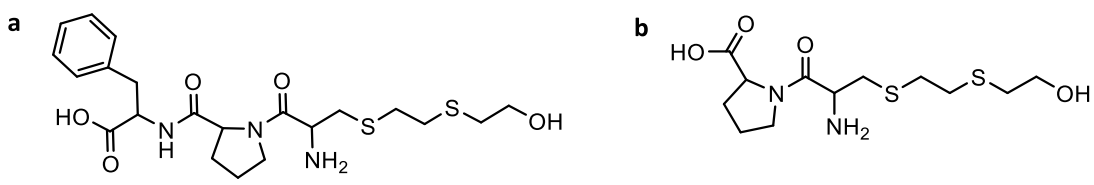
- **Proteinlere Kovalent Bağlanma**

Kükürt hardalının özellikle kan proteinleri ile oluşturduğu spesifik kovalent bağlanma ürünleri, gelişmiş analitik teknikler kullanılarak detaylı biçimde incelenmiş ve yapısal olarak karakterize edilmiştir. Bu kovalent modifikasyonlar, çoğunlukla

protein yapısındaki amino asitlerin nükleofilik fonksiyonel gruplarının, HD'nin elektrofilik merkezleri ile reaksiyona girmesi sonucu ortaya çıkmaktadır. En başta Cys olmak üzere, HD'nin kovalent olarak hedeflediği amino asitler arasında, protein dizisi içinde konumlanan aspartik asit, glutamik asit, histidin, lizin, metiyonin ve triptofan gibi reaktif fonksiyonel gruplar içeren amino asitler ile proteinin N-terminal amino grubu yer almaktadır (171). Bu amino asitler, tiyol, hidroksil, karboksil, amin ve imidazol halkası gibi elektron zengini yan zincir fonksiyonel gruplar içerdiğinden, HD ile kovalent bağ oluşumuna yüksek oranda yatkındır. Bu bağlanma süreci genellikle HD'nin spontan olarak oluşturduğu episülfonyum iyonları aracılığıyla gerçekleşir. Episülfonyum iyonları, elektrofilik merkez taşıyan geçici ara ürünler olup, kısa yarı ömürlerine rağmen protein üzerindeki yüksek nükleofilik bölgelere seçici ve hızlı bir şekilde bağlanarak alkilasyon tepkimesini başlatırlar (43).

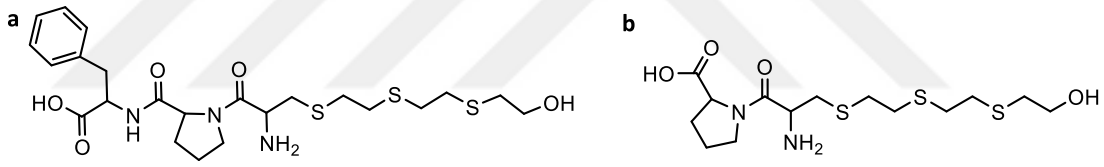
Albüminin aminoasit diziliminin otuz dördüncü sırasındaki sisteinin (Cys34) serbest tiyol grubu, protein yapılarında bulunan diğer nükleofilik fonksiyonel gruplara kıyasla daha yüksek reaktiviteye sahip olduğundan, HD ile meydana gelen kovalent modifikasyonlar açısından en baskın ve karakteristik hedef noktayı oluşturmaktadır (85, 172-176).

İnsan serum albümini (HSA), yapısında bulunan ve disülfür köprüsü içermeyen bu reaktif merkez sayesinde, HD ile kovalent bağlanmaya son derece yatkın bir proteindir. Cys34 pozisyonunda gerçekleşen alkilasyon sonucunda, HD molekülünden HETE grubu kovalent olarak bağlanmaktadır. Sonrasında albüminin proteolitik parçalanması ile özgün kısa peptit yapılarına ayrışmaktadır. Literatürde en sık tanımlanan Cys34 türevi ürünler arasında HETE-sisteinfenilalanin (HETE-CP) ve HETE- sisteinprolinfenilalanin (HETE-CPF) peptitleri (Şekil 2.11) yer almakta olup bu yapıların hem deneysel sistemlerde hem de gerçek HD maruziyeti vakalarında yüksek özgüllük ve kararlılıkla tespit edilebildiği gösterilmiştir (85, 172-176).



Şekil 2.11. HD'nin albümin katım ürünleri **a.** HETE-CPF **b.** HETE-CP.

Blum ve ark. yaptıkları bir çalışmada, Q ile HSA arasında gerçekleşen kovalent bağlanmayı detaylı olarak incelemişlerdir. Bu çalışmada Q'nun da tıpkı HD gibi Cys34 pozisyonundaki serbest tiyol grubu ile kovalent bağ oluşturduğu ve bu bağlanma sonucunda HETETE-Cys34 katım ürünlerinin meydana geldiği gösterilmiştir. Hem HD hem de Q albüminin proteolitik parçalanması sonrası, CP ve CPF peptit dizileri üzerinden alkillenmiş biyobelirteçler vermektedir. HD için tanımlanan HETE-CP ve HETE-CPF yapılarına karşılık, Q maruziyetinde HETETE-CP ve HETETE-CPF katım ürünleri elde edilmiştir (Şekil 2.12). Bu benzerlikler, Cys34'ün her iki ajan açısından da ortak ve tercih edilen bir hedef olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak HD ve Q'nun Cys34 ile rekabet ettirildiği eş koşullu deneylerde Q'nun daha yüksek reaktiviteye sahip olduğu ve HD'ye kıyasla yaklaşık %33 oranında daha fazla katım ürünü oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir (39). Bu bulgular, literatürde farklı araştırmalarla da desteklenmiş olup Q'nun, HD ile benzer şekilde HSA'daki nükleofilik merkezlere yüksek afiniteyle kovalent bağlanabildiği gösterilmiştir. (40-43, 177).

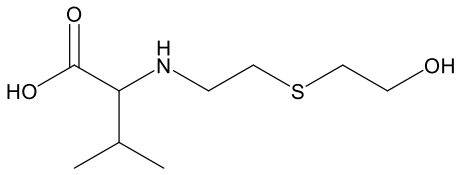


Şekil 2.12. Q'nun albümin katım ürünleri **a.** HETETE-CPF **b.** HETETE-CP.

Albümin gibi, hemoglobin de yapısında HD'nin kovalent olarak bağlanabileceği birçok nükleofilik hedef grup barındırmaktadır. Ancak hemoglobinin hücre içi bir protein olması, HD'nin veya episülfonyum iyonlarının eritrosit zarını geçerek bu hedeflere ulaşmasını zorlaştırmaktadır. Bu durum, hemoglobinle doğrudan reaksiyon kinetiğini sınırlayabilir. Bununla birlikte, hemoglobinin katım ürünlerinin yaklaşık 120 gün süren uzun biyolojik yarı ömrü, bir kez gerçekleşen alkilasyonun sistemde uzun süre stabil kalmasına olanak tanımaktadır. Bu durum geç dönem maruziyetlerin retrospektif biyolojik doğrulamasında hemoglobin ile ilişkili alkilasyon ürünlerini değerli biyobelirteçler haline getirmektedir (166, 178).

Kükürt hardalı, hemoglobin yapısında yer alan bazı nükleofilik amino asitlerle kovalent bağ oluşturarak kalıcı modifikasyonlara neden olabilmektedir. Bu bağlanma

potansiyeli taşıyan başlıca hedefler arasında valin, histidin ve glutamik asit yer almaktadır (179, 180). Bu amino asitler içerisinde, özellikle hemoglobinin α- ve β-zincirlerinin N-terminalinde yer alan valin, serbest α-amin grubu içermesi nedeniyle HD ile kovalent bağlanma açısından en belirgin hedef noktayı oluşturmaktadır. HD ile reaksiyon sonrası oluşan HETE-valin yapısı (Şekil 2.13) hem *in vivo* deneysel modellerde hem de gerçek maruziyet vakalarına ait biyolojik örneklerde güvenilir şekilde tanımlanmıştır. Bu tespitte, HD'ye bağlı modifiye globin moleküllerinin proteolitik parçalanması sonrası ortaya çıkan kısa peptitlerin kütle spektrometrik yöntemlerle analizi kritik rol oynamaktadır. Valin alkilasyonu sonucu oluşan bu spesifik yapı, hemoglobin temelli biyobelirteçler arasında yüksek özgüllüğü ve uzun biyolojik stabilitesi nedeniyle retrospektif maruziyet analizlerinde önemli bir analitik hedef olarak değerlendirilmektedir (161, 166, 179-185). Ayrıca, N-alkillenmiş N-terminal valin yapılarının, modifiye Edman prosedürü kullanılarak hemoglobinden özgül biçimde koparılabilmesi, bu katım ürününün analitik olarak seçici ve güvenilir biçimde tespit edilmesini mümkün kılmakta olup hemoglobin temelli biyobelirteçleri teknik açıdan da avantajlı hale getirmektedir (184).

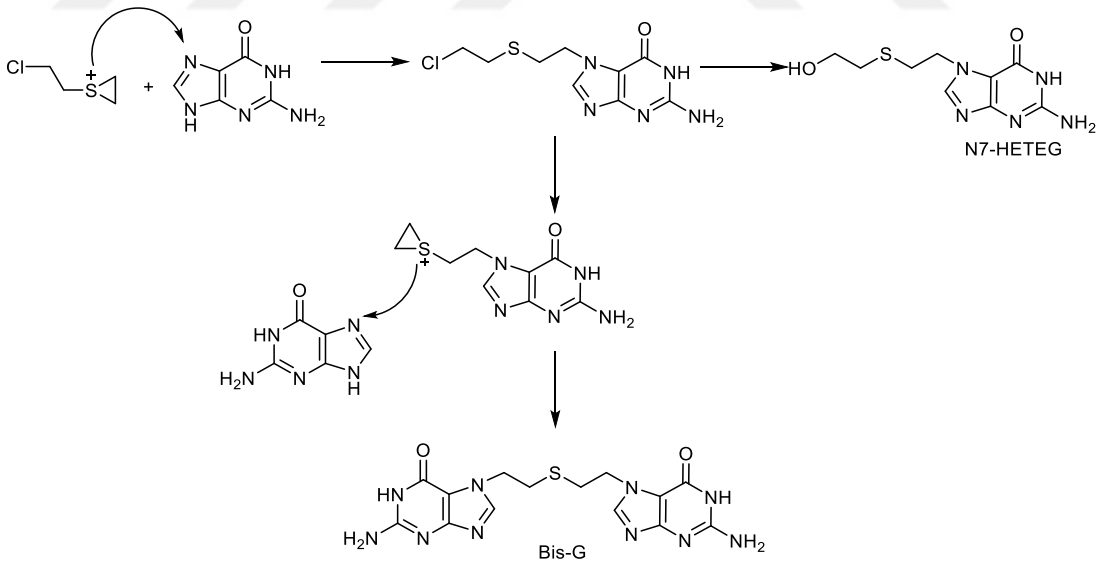


Şekil 2.13. HD'nin globin katım ürünü N-HETE-Valinin kimyasal yapısı.

- **DNA'ya Kovalent Bağlanma**

Hücre içi makromoleküller arasında, kükürtlü hardal bileşikleri ile kovalent katım ürünleri oluşturma açısından en hassas yapı DNA'dır. Bu bileşiklerin genel toksik etkilerinin, esas olarak DNA hasarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Söz konusu hasar, episülfonyum iyonları aracılığıyla DNA'daki nükleofilik merkezlerin, özellikle azot ve oksijen atomlarının doğrudan hedef alınmasıyla meydana gelir. DNA'nın yapısında bulunan pürin bazlarından guanin ve adenin başlıca hedeflerdir. Guanin ve adenin, yapılarında taşıdıkları çeşitli nükleofilik merkezler aracılığıyla elektrofilik ajanlara karşı yüksek reaktivite göstermektedir. Guanin'in N7 ve O6 pozisyonları ile

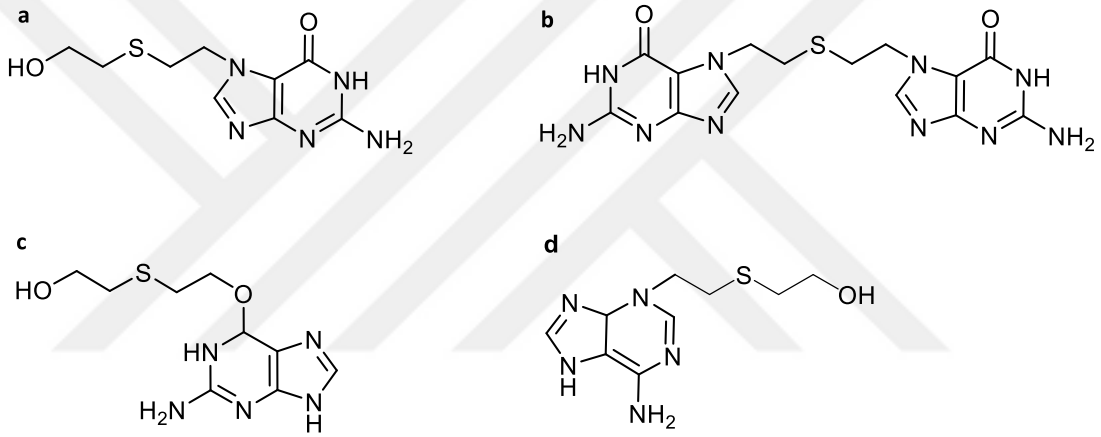
adenin'in N3 pozisyonu, seçici alkilasyonun başlıca hedef bölgeleri olarak öne çıkmaktadır. Bu etkileşimler sonucunda oluşan kovalent katım ürünleri yalnızca mono alkilasyon ile sınırlı kalmamaktadır. Aynı zamanda DNA'nın ikili sarmal bütünlüğünü tehdit eden iplikler arası ve iplik içi çapraz bağların oluşmasına da neden olmaktadır. Bu tür bağlar DNA replikasyonu ve transkripsiyon gibi temel hücresel süreçleri belirgin biçimde aksatır. Şekil 2.14'te gösterildiği üzere, HD'nin DNA'daki guanin bazıyla etkileşimi, bu bazın N7 pozisyonundaki nükleofilik azot atomu üzerinden gerçekleşen reaksiyonu ile başlamaktadır. HD'nin kloretil zincirlerinden biri molekül içi siklizasyona uğrayarak reaktif bir episülfonyum iyonu oluşturur. Bu elektrofilik ara ürün, guanin ile reaksiyona girerek N7-kloroetiltiyoetilguanin ara ürününü meydana getirir. Oluşan bu ara ürün, ortam koşullarına bağlı olarak iki şekilde katım ürünlerine dönüşebilir. Su varlığında klor atomunun yerini hidroksil grubunun almasıyla hidrolize uğrar ve N7-hidroksietil guanin katım ürününe dönüşür. Diğer olasılıkta ise, HD'nin ikinci kloretil zinciri de benzer şekilde siklizasyona uğrayarak yeni bir episülfonyum iyonu oluşturur ve başka bir guanin kalıntısıyla reaksiyona girerek çapraz bağlı DNA katım ürünü olan bis(etiltiyoetil)-N7-guanini (Bis-G) meydana getirir (97, 142).



Şekil 2.14. DNA'nın guain üzerinden HD ile alkilasyon mekanizması.

Kükürt hardalına bağlı DNA katım ürünlerinin oluşumları, *in vivo* ve *in vitro* deneysel modellerin yanı sıra, HD'ye maruz kalan bireylerden elde edilen biyolojik örnekler aracılığıyla da kapsamlı biçimde tanımlanmıştır. Bu bulgular, HD'nin etkisiyle

dört ana DNA katım ürününün oluştuğunu ortaya koymuştur (161, 186-189). Bu ürünler arasında en yüksek oranda tespit edilen guanin'in N7 pozisyonuna bağlanan N7-HETEG olup toplam DNA katım ürünlerinin yaklaşık %61'ini oluşturmaktadır. İkinci sırada, guanin bazları arasında çapraz bağlanma sonucu oluşan Bis-G yer almakta ve %17 oranında tespit edilmektedir. Bunu %16 oran ile, adeninin N3 pozisyonuna bağlanan N3-(hidroksietiltiyoetil)adenin (N3-HETEA) izlemektedir. Çok düşük oranda (%0,1) oluşan O6-(hidroksietiltiyoetil)guanin (O6-HETEG) ise, DNA onarım sistemleri tarafından giderilemeyen kalıcı bir lezyon meydana getirmesi nedeniyle toksikolojik açıdan özel öneme sahiptir (97, 190-192). Bu dört ana katım ürününün kimyasal yapıları Şekil 2.15'te verilmiştir.



Şekil 2.15. HD maruziyeti sonrası DNA bazlarıyla oluşan başlıca katım ürünlerinin yapıları: a. N7-HETEG b. Bis-G c. O6-HETEG d. N3-HETEA.

Eliminasyon

Toksikokinetik çalışmalar, HD'nin vücuttan eliminasyonunun büyük oranda renal yolla gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Özellikle maruziyeti takiben yapılan analizlerde, HD'nin atılımının yaklaşık %80'lik kısmının böbrekler aracılığıyla idrarla uzaklaştırıldığı belirlenmiştir (141, 145). Buna karşın, fekal atılım son derece sınırlı düzeyde olup %3'ün altında kalmaktadır (145). HD'nin metabolizması sonucu oluşan hidroliz ve oksidasyon ürünlerinin yanı sıra, GSH ile konjugasyon yoluyla meydana gelen metabolitler, bu bileşiklerin biyotransformasyon sürecindeki önemli ara ürünlerdir. Bu konjugatların ileri metabolizmasıyla oluşan β-liyaz ve merkaptürik asit yolu ürünleri hem deneysel hayvan modellerinde hem de HD'ye maruz kalmış

bireylerin idrar örneklerinde saptanmış başlıca atılım ürünleri arasında yer almaktadır. Bunlara ek olarak, HD'nin DNA bazlarıyla oluşturduğu alkilasyon ürünleri de hem *in vivo* çalışmalarda hem de maruziyete uğramış bireylerin idrarlarında tanımlanan diğer önemli atılım bileşenlerini oluşturmaktadır (161, 193, 194) .

2.4.5. Kükürtlü Hardal Bileşiklerine Maruz Kalımın Biyolojik Örneklerde Doğrulanması

Kimyasal savaş ajanlarına bağlı maruziyetlerin doğrulanmasında biyolojik örnekler en güvenilir kanıt kaynaklarıdır. Kan, idrar, saç ve doku gibi örnekler hem erken hem de retrospektif maruziyetin değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır. Hedef organizmaya ait olmaları, bu örnekleri çevresel kontaminasyon ve degradasyon gibi dış etkenlerden bağımsız hale getirir. Böylece temasın üzerinden uzun süre geçmiş olsa dahi maruziyet doğrudan saptanabilir. Elde edilen veriler, maruziyetin kapsamını belirlemenin yanı sıra, tıbbi müdahaleleri yönlendirmek ve gerektiğinde adli süreçlerde delil sunmak amacıyla kullanılır. Bu yönüyle biyomedikal analizler, kimyasal silahların yasaklanmasına yönelik uluslararası düzenlemelerin teknik temellerinden birini oluşturur (33).

Metabolizmada biyotransformasyon sonucu oluşan oksidasyon ve hidroliz ürünleri, GSH konjugatlarının ileri metabolizmasıyla ortaya çıkan metabolitleri, DNA ve proteinler ile oluşturduğu kovalent katım ürünleri, HD maruziyetini tanımlayan en önemli biyobelirteçlerdir. Bu grupta yer alan HDO, HD'nin doğrudan oksidasyonu sonucu oluşur ve oksidatif metabolizmayı yansıtmakla birlikte nadir gözlenen bir metabolittir (195). Hidroliz ürünü TDG ve onun oksidatif türevi TDGO, maruziyet sonrası idrarda yüksek miktarda ve hızla atılan majör metabolitlerdir. Bu bileşikler analitik olarak kolay tespit edilebilir olmaları nedeniyle erken tanı açısından avantaj sağlamaktadır. Ancak sağlıklı bireylerin idrarında da düşük düzeylerde bulunabilmeleri özgüllüklerini sınırlandırmaktadır. Buna karşılık, GSH konjugatlarının ileri metabolizması sonucunda oluşan SBSNAE, SBMSE, MSMTESE ve SBMTE, yalnızca HD maruziyetine bağlı yapılar olup maruziyetin daha güvenilir şekilde izlenmesine olanak tanımaktadır (38, 184, 195, 196).

Kükürt hardalının DNA ve proteinlerle oluşturduğu kovalent katım ürünleri, hidroliz ürünleri ve GSH türevlerine kıyasla biyolojik sistemde daha uzun süre kalırlar. Yalnızca maruziyet sonrası organizmada oluşmaları, bu yapıları analitik olarak yüksek seçiciliğe sahip biyobelirteçler haline getirir. DNA katım ürünleri olan N7-HETEG, Bis-G ve N3-HETEA invaziv yöntemlerle kan veya doku örneklerinden tespit edilebilir. Ancak DNA onarım mekanizmaları aracılığıyla alkilasyona uğramış bazlar DNA omurgasından uzaklaştırılır ve idrar yoluyla atılır. Bu nedenle hücre içi kalıcılıkları sınırlı olsa da idrarda daha uzun süre tespit edilebilir. Hemoglobinin N-terminal valini ile albüminin Cys-34 bölgesine bağlanan protein katım ürünleri ise retrospektif analizler açısından önemli avantaj sağlar. Özellikle albüminin bağlanma ürünleri olan HETE-CP ve HETE-CPF ile hemoglobine ait HETE-Val katım ürünleri, maruziyete özgü yapılar olarak adli ve toksikolojik değerlendirmelerde güvenilir kanıt niteliğindedir (36-38, 184, 196).

Bu yapıların biyolojik sistemde izlenebilirlik süresi, sahip oldukları fizikokimyasal özelliklerin yanı sıra, maruz kalınan doz, maruziyet yolu ve bireysel metabolik farklılıklara bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. HD'ye maruz kalan bireylerin kan ve idrar örneklerinin incelendiği bir çalışmada, hidroliz ürünleri genellikle ilk bir hafta içinde, GSH konjugatları ise yaklaşık on güne kadar tespit edilebilmiştir. DNA katım ürünleri kanda iki hafta, idrarda ise yaklaşık bir ay boyunca izlenebilmiştir. Albümin katım ürünleri bir aya kadar, hemoglobin katım ürünleri ise üç aya kadar biyolojik örneklerde tespit edilebilir durumda kalmıştır (161, 174).

Kükürt hardalı maruziyetinin biyolojik örneklerde doğrulanmasında, en güvenilir analitik yaklaşımlardan biri sıvı kromatografi-kütle/kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemidir. HD'nin metabolitleri çoğunlukla düşük konsantrasyonlarda, iyonik ve hidrofilik formda bulunduğundan, bu teknik yüksek duyarlılık ve seçicilik gerektiren analizlerde öne çıkmaktadır. Ayrıca, yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi (HRMS) sistemleriyle birlikte kullanıldığında, bilinmeyen veya yapısal olarak benzer metabolitlerin doğru kütle tayini ile tanımlanması mümkün hale gelmektedir. LC-MS/MS teknikleri, kısa analiz süreleri ve yüksek örnek işleme kapasiteleri sayesinde, özellikle toplu maruziyet durumlarında hızlı biyobelirteç

doğrulaması yapılmasına olanak tanır. HD'nin DNA, protein ve GSH ile oluşturduğu kovalent bağlanma ürünlerinin özgül olarak tespit edilebilmesi, bu yöntemleri toksikolojik ve adli doğrulama amacıyla vazgeçilmez hale getirmektedir (159).

2.4.6. Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometrisi Yöntemleri

Kimyasal Silahlar Sözleşmesi ile ilişkili bileşiklerin analizi, yüksek seçicilik, hassasiyet ve özgünlük gerektiren bir süreçtir. Bu bileşikler çoğunlukla düşük derişimlerde, karmaşık matrisler içinde yer aldığından, geleneksel analiz yöntemlerinin sınırlamaları ön plana çıkmaktadır. Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC-MS), hem ayırma hem de tanımlama yeteneklerini bir araya getirerek kimyasal silahların, bozunma ürünlerinin ve biyolojik bağlanma ürünlerinin belirlenmesinde güçlü bir araç haline gelmiştir (197).

LC-MS başlangıçta sınırlı erişimli bir teknoloji iken günümüzde toksikoloji, farmasötik ve adli bilimlerde yaygın kullanılan olgun bir teknik haline gelmiştir. Elektrospray iyonizasyon (ESI) ve atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (APCI) gibi modern iyonlaştırma teknikleri, sıvı örneklerdeki bileşiklerin gaz fazına geçişini mümkün kılarak uygulama alanlarını genişletmiştir (197-199).

Kimyasal Silahlar Sözleşmesi ile ilişkili kimyasal maddelerin analizinde, LC-MS'in kullanımı yalnızca hedef bileşiğin tanımlanmasına değil, aynı zamanda toksik etkilerin biyokimyasal izlerinin (örneğin, protein veya katım ürünleri) tespitine de olanak tanır. Bu durum, özellikle maruziyetin retrospektif doğrulanması açısından büyük önem arz etmektedir. Ayrıca, LC-MS temelli yöntemler, Kimyasal Silahlar Sözleşmesi ile ilişkili kimyasalların analizlerini gerçekleştiren laboratuvarlar tarafından sıklıkla tercih edilen analiz yaklaşımları arasındadır (197, 200, 201).

a. Sıvı Kromatografinin Temel İlkeleri

Sıvı kromatografi (LC), analitlerin bir sıvı hareketli faz içerisinde taşınarak, sabit fazla olan farklı etkileşimleri temelinde ayrılmasını sağlayan bir ayırma tekniğidir. Bu yöntem, özellikle uçucu olmayan, termal olarak kararsız veya yüksek polariteye sahip bileşiklerin ayrılmasında tercih edilir. Ayırma işlemi sırasında, örnek

bileşenleri hareketli faz ile taşınırken, sabit fazla olan hidrofobik, elektrostatik ya da polar etkileşimlerine göre farklı hızlarda kolon boyunca ilerlerler. Bu fark, bileşenlerin birbirinden ayrılmasını sağlar (202, 203).

Kromatografi, farklı ayırma mekanizmalarına göre sınıflandırılır. Adsorpsiyon kromatografisi, analitlerin sabit faz yüzeyine tutunmasına dayanır. Dağılım (*partition*) kromatografisi, analitlerin hareketli ve sabit fazlar arasında çözünürlük farklarına göre dağılmasını temel alır. İyon değişim kromatografisi, yüklü analitlerin zıt yüklü sabit faz grupları ile iyonik etkileşimlerine dayanır. Moleküler eleme (*size exclusion*), moleküllerin büyüklüklerine göre sabit faz porlarından geçebilme yetenekleriyle ayrılması esasına dayalı ayırma yapar (204, 205).

En yaygın kullanılan modlardan biri ters faz kromatografi olup, apolar sabit faz (genellikle C18 silika) ve polar hareketli faz sistemine dayanır. Bu yöntemde, apolar bileşikler sabit fazla daha güçlü etkileşime girdiği için kolon üzerinde daha uzun süre tutulur ve daha geç elüsyon gösterir. Buna karşılık, normal faz kromatografi, polar sabit faz ve apolar hareketli faz içeren sistemlerde kullanılır ve özellikle maddenin polaritesine dayalı ayrımlarda tercih edilir (206).

Modern LC sistemlerinde, hareketli faz genellikle su, metanol, asetonitril gibi uçucu ve kütle spektrometrisi (MS) ile uyumlu çözücülerden oluşur. Hareketli fazın pH'ı ve iyonik gücü, analitlerin iyonizasyon durumunu ve dolayısıyla ayırma etkinliğini önemli ölçüde etkileyebilir. Bu nedenle, FA, amonyum format gibi uçucu tampon sistemleri sıklıkla tercih edilmektedir (200).

Son yıllarda yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) ve ultra yüksek performanslı likit kromatografi (UHPLC) gibi gelişmiş varyantlar sayesinde, daha yüksek çözünürlük, daha kısa analiz süreleri ve daha az çözücü kullanımı mümkün hale gelmiştir. Ayrıca düşük hacimli, yüksek basınca dayanıklı kolonlar kullanılarak nano seviyede analizler gerçekleştirilebilmektedir (207, 208). LC'nin bu esnek yapısı, onu özellikle kimyasal savaş ajanlarının çevresel ve biyomedikal örneklerde analizi için vazgeçilmez bir teknik haline getirmiştir. Karmaşık matrislerdeki hedef bileşiklerin seçici ayrımı ve MS ile doğrudan bağlantı kurulabilmesi, LC'nin bu konudaki önemini artırmaktadır (200).

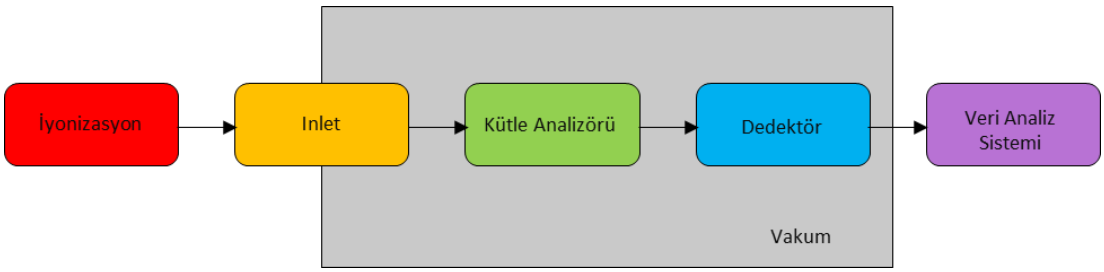
b. Kütle Spektrometrisinin Temel İlkeleri ve Cihaz Yapısı

Kütle spektrometrisi, iyonlaştırılmış bileşiklerin kütle/yük (m/z) oranlarını ölçerek bileşenlerin nitel ve nicel analizini sağlar. Bu teknik, bileşiklerin yapısal karakterizasyonu, moleküler kütle tayini ve izotop dağılımı gibi bilgileri yüksek doğrulukla sunmaktadır (209).

Sıvı kromatografi-kütle spektrometrisi sistemlerinde, kromatografik olarak ayrımı saülanan analitler iyonlaştırıldıktan sonra kütle analizöründe ayrılır ve dedektör tarafından ölçülür. Atmosferik basınç altında çalışan iyonlaştırma kaynakları, LC-MS sistemlerinin biyolojik ve çevresel örneklerde kullanılabilirliğini artırmıştır. Bu sistemlerde, ESI ve APCI, iyon üretimi için en yaygın kullanılan tekniklerdir. Bu iyon kaynakları, LC sisteminin çıkışına doğrudan bağlanarak çözeltideki iyonların gaz fazına aktarılmasını sağlar (199, 209, 210).

Kütle spektrumları, x-ekseni boyunca m/z oranını, y-ekseni boyunca ise iyon sinyalinin bağıl yoğunluğunu gösterir. Her pik, belirli bir iyon türünü temsil ederken, pikin konumu moleküler yapıyı, yüksekliği ise bolluğu yansıtır. Bu spektral yapı hem tanımlayıcı hem de kantitatif analizde kritik bilgi sağlamaktadır (209).

Bir kütle spektrometresinin temel yapısında yer alam bileşenler, Şekil 2.16'da olarak gösterilmiştir. Şekilde iyonizasyon alt sistemi vakum bölgesinin dışında yer alacak şekilde gösterilmiştir. Ancak bazı MS konfigürasyonlarında iyonizasyon işlemi vakum bölgesinin içinde de gerçekleşebilir (200).



Şekil 2.16. Bir kütle spektrometresi sisteminin şeması.

c. Kütle Spektrometresi ile ilgili temel kavramlar

Kütle Spektrometrik Bilgi: Bir kütle spektrumundaki her bir pik konumu ve yoğunluğu (alanı veya yüksekliği) temelde oldukça özgün bilgiler içerir. Pik konumu, ilgili iyonun m/z oranını gösterirken pik yoğunluğu ise, bu iyonun bağıl bolluğuna ilişkin nicel bir ölçüm sunar (209).

Spektral Yoğunluk: Bir kütle spektrumundaki bir tepenin yoğunluğu, analiz edilen örnekteki belirli bir bileşiğin kesin miktarını yansıtmaz. Belirli bir bileşiğe ait iyonların tespit edilen miktarı, cihazdan cihaza değişebilir. Hatta aynı cihazda farklı ayarlarla veya örnekte bulunan diğer bileşiklerin varlığına bağlı olarak etkilenebilecek çok sayıda parametreye bağlıdır. Bu nedenle, ölçülen iyon bolluğu yalnızca analit konsantrasyonunun bağıl bir göstergesidir ve mutlak miktar tayini yapılabilmesi için, öncelikle standart maddelerle kalibrasyon yapılması gerekir (200).

Çözünürlük: Kütle çözünürlüğü ya da ayırt etme gücü, genellikle pikin maksimum noktasındaki m/z değerinin, aynı pikin yarı maksimum yüksekliğindeki genişliğine (FWHM: *full width at half maximum*) oranı alınarak hesaplanır (211).

$$R_{FWHM} = \frac{\mathrm{m}}{\Delta m}$$

Burada R_{FWHM} çözünürlük değerini, m pik maksimumuna karşılık gelen m/z oranını, Δm ise yarı maksimum pik genişliğini ifade eder. Çözünürlük, bir kütle analizörünün benzer kütleye sahip iki ayrı piki başarıyla ayırt edip edemeyeceğini belirlemek açısından kritik öneme sahiptir.

Kütle Doğruluğu ve Hata: İyonların kütlesinin doğru şekilde ölçebilmesi için bir kütle spektrometresinin düzenli olarak kütle kalibrasyonu yapılmalıdır; aksi takdirde zamanla kütle sapmaları *(mass drift)* meydana gelir. Kalibre edilmiş bir sistemde dahi, spektral olarak belirlenen m/z değeri ile teorik kütle değeri arasında küçük farklar oluşabilir. Bu fark, iyonun bilinen atomik bileşiminden hesaplanan gerçek kütlesi, yük durumu (iyonlaşma tipi) ve cihazın spektral ölçümüne dayanan hesaplamaları göz önünde bulundurularak tanımlanır ve kütle hatası *(mass error)* olarak adlandırılır. Bu hata, şu şekilde hesaplanabilir:

$$\Delta m = m_{deneysel} - m_{teorik}$$

Burada $m_{deneysel}$ spektral ölçümden elde edilen kütleyi, m_{teorik} ise bilinen iyon bileşimine göre hesaplanan gerçek kütleyi ifade eder. Kütle hatası genellikle milyonda bir hata (ppm) cinsinden ifade edilir ve aşağıdaki formül ile hesaplanır (212).

$$\Delta m = 10^6 x \frac{m_{deneysel} - m_{teorik}}{m_{teorik}}$$

Kütle hatası sıfıra yaklaştıkça, iyonun doğru kimyasal bileşimle eşleşme ihtimali o kadar yükselir. Hata çok küçükse, yalnızca bir tek iyon formülü geçerli olabilir. Ancak bu düzeyde doğruluk, yalnızca çok yüksek performanslı kütle analizörlerinde ve genellikle küçük moleküller (<1000 Dalton) için mümkündür (213).

İzotopik Dağılım: Çoğu kimyasal element, doğada iki veya daha fazla kararlı izotop halinde bulunur. Bu izotoplar doğada eşit bollukta değildir ve izotopik oranlar, her elemente özgü karakteristik bir özelliktir. Bir elementin izotopları, aynı sayıda protona ancak farklı sayıda nötrona sahip atom çekirdeklerinden oluşur. Özellikle hafif elementler için, en düşük kütleli kararlı izotop genellikle en bol bulunan izotoptur. Her elementin izotopları, doğada kendine özgü bir doğal bolluk oranı ile bulunur. Bir molekülde bulunan herhangi bir elementin atomu için, o elementin herhangi bir kararlı izotop şeklinde yer alma olasılığı vardır. Bu nedenle, analiz edilen bir bileşiğin çok sayıda molekülü olduğunda, bu moleküller birbirinden farklı izotop kombinasyonlarına sahip olur ve bu varyantlara izotopolog denir. Her bir izotopolog, bir elementin farklı izotoplarının oluşturduğu kombinasyonları yansıtır ve bu varyantlar kütle spektrumunda farklı kütlelerde görünür. İzotopologların bollukları, olasılıksal bir dağılımı takip eder ve bu dağılım, izotopik yapı hakkında değerli bilgiler sunar. Dolayısıyla, kütle çözünürlüğündeki artış, bir kimyasal savaş ajanının kütle spektrumunda tanımlanması ve karakterizasyonuna yönelik analitik güveni artırır (214).

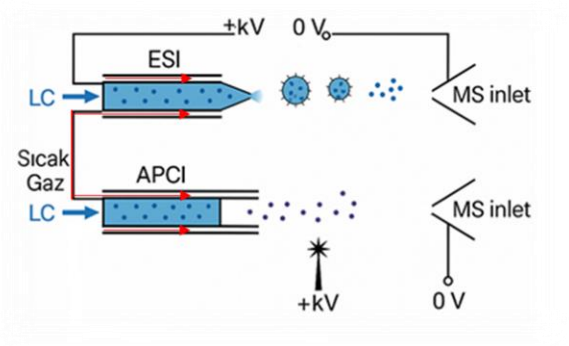
d. Kütle spektrometrelerinde kullanılan iyonlaşma teknikleri

Kütle spektrometrelerinde yer alan iyon kaynağı, hareketli faz içerisinde çözünmüş analit moleküllerini gaz fazına geçirerek iyonlara dönüştürür. İyon

kaynağının etkinliği, analiz edilecek bileşiğin kimyasal doğasına ve hareketli fazın bileşimine bağlıdır. LC-MS sistemlerinde en yaygın kullanılan iyonizasyon teknikleri, ESI ve APCI tekniğidir (215).

Polar yapıda, iyonik karakterde ve yüksek molekül ağırlığına sahip peptitler, proteinler ile bunların katım ürünlerinin sıvı fazda çözünmüş formlarının düşük enerjili koşullarda iyonlaştırılması için ESI, yaygın olarak tercih edilen bir iyonizasyon tekniğidir. Bu yöntemde, sıvı örnekler kapiller çıkışa tipik olarak 2.5–5 kV arasında bir elektrik potansiyeli uygulanarak püskürtülür ve yüksek alan etkisiyle ucu sivrilen bir koni (*Taylor* konisi**)** oluşturulur. Bu koniden çıkan yüklenmiş damlacıklar, taşıyıcı gaz ve ısı yardımıyla solventlerinin buharlaşması sonucu giderek küçülür. Yük yoğunluğunun artmasıyla birlikte damlacık, benzer yüklü tanecikler arasındaki elektrostatik itme kuvvetlerinin etkisiyle bir elektrostatik patlama *(Coulombic explosion)* geçirerek parçalanır ve böylece iyonların gaz fazına geçişi sağlanır. ESI ile elde edilen başlıca iyon türleri $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ ve $[M–H]^-$ şeklindedir. Yumuşak iyonizasyon karakteri nedeniyle, özellikle yapısal bütünlüğün korunması gereken biyomoleküllerin LC–MS sistemlerinde analizi için ideal bir tekniktir (210, 215).

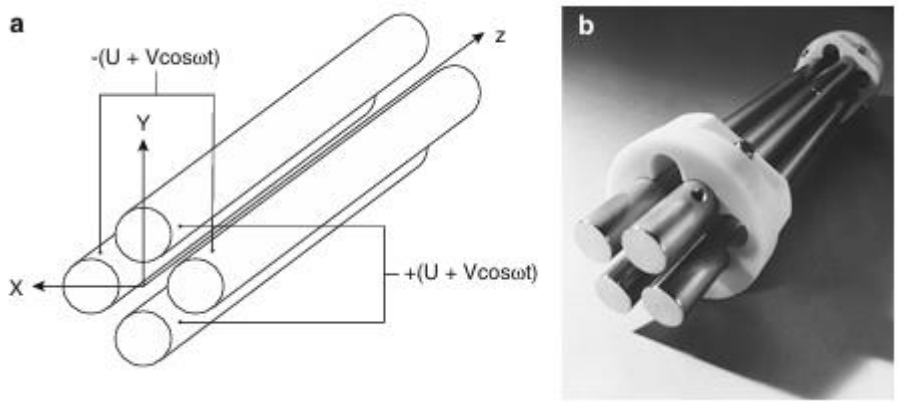
Daha uçucu ve orta polariteye sahip moleküllerin iyonlaştırılmasında, ESI'a kıyasla daha uygun bir alternatif sunan teknik, APCI'dır. Bu yöntemde hareketli faz faz, bir nebulizer yardımıyla ısıtılarak buharlaştırılır ve örnek gaz fazına aktarılır. Ardından, korona deşarj bölgesinde üretilen öncül iyonlar aracılığıyla gaz fazında iyon-molekül reaksiyonları gerçekleşir. Bu reaksiyonlar sonucunda analit molekülleri proton transferi mekanizmasıyla iyonlaşır ve tipik olarak $[M+H]^+$, $[M+solvent+H]^+$ gibi iyon türleri elde edilir. APCI, iyonlaşmaya uygun özellikler gösteren küçük ve orta boyutlu organik bileşiklerin analizi için yaygın olarak kullanılan bir iyon kaynak teknolojisidir (216). Hem ESI hem de APCI teknikleri yumuşak iyonizasyon yöntemleri olup, bir analiz sürecinde uygun iyon kaynağı seçimi; analitin polaritesi, uçuculuğu ve termal kararlılığına bağlı olarak belirlenir (199). Bu iki iyonlaşma tekniğine ait temel prensipler ve iyon üretim mekanizmaları Şekil 2.17'de şematik olarak gösterilmiştir (200).



Şekil 2.17. ESI ve APCI iyon kaynaklarında iyonlaşma mekanizmasına ilişkin şematik gösterim (200).

e. Kütle Analizörleri

Günümüzde LC–MS sistemlerinde en yaygın olarak kullanılan kütle analizörleri, kuadrupol ve iyon tuzağı (*ion trap*) tipi sistemlerdir. Bu analizörler, iyonların m/z oranına göre ayrılmasını sağlayarak temel kütle tayininde kullanılır. Kuadrupol analizörler, dört paralel metal çubuktan oluşan bir sistem üzerinden iyonların m/z oranlarına göre ayrılmasını sağlamaktadır. Bu sistemde çubuk çiftlerine uygulanan doğru akım ve alternatif akım potansiyelleri ile iyonlar üzerinde dinamik bir elektrostatik alan oluşturulur. Sadece belirli bir m/z oranına sahip iyonlar, bu alan içinde kararlı bir yörünge izleyerek analizörden geçebilirken, diğerleri kararsız hale gelerek dışlanmaktadır. Bu özellik sayesinde kuadrupol sistemler, iyonları filtreleme yeteneğine sahip olup bu yönüyle "kütle filtresi" olarak da adlandırılır. Tarama modunda doğru akım ve alternatif akım voltajları senkronize biçimde değiştirilerek farklı m/z aralıkları seçici biçimde iletilebilir. Kompakt yapısı, yüksek kararlılığı ve düşük maliyeti ile kuadrupol analizörler, özellikle hedefli analizler ve tandem MS uygulamaları için tercih edilmektedir (217). Bir kuadrupol analizörünün temsili şematik çizimi ile ticari olarak kullanılan gerçek bir kuadropol analizörünün yapısı Şekil 2.18'de gösterilmiştir.

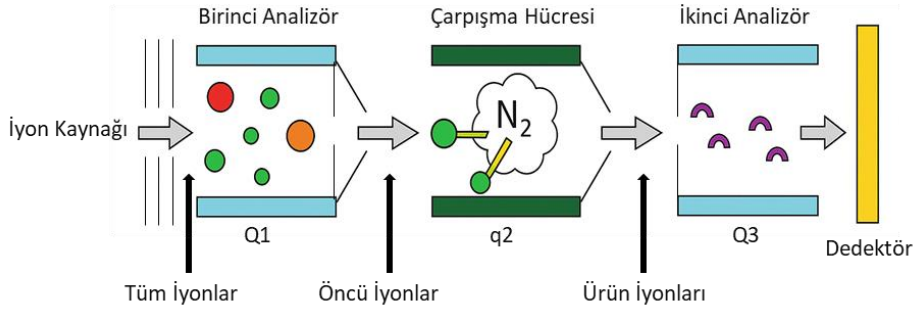


Şekil 2.18. Lineer kuadrupol kütle analizörünün yapısı (217). **(a)** Lineer kuadrupol analizörün şematik temsili. **(b)** Gerçek bir kuadrupol kütle analizörünün yapısını gösteren fotoğraf.

Ancak, standart LC–MS analizlerinde sınırlı miktarda fragman iyonu oluşması, sadece temel MS verileri ile analit yapısının net şekilde tanımlanmasını güçleştirir. Bu nedenle, üçlü kuadrupol kütle spektrometreleri gibi tandem kütle analizörleri (MS/MS) yaygın olarak tercih edilmektedir. Bu sistemlerde, seçilen öncül iyonlar, çarpışma ile indüklenen ayrışma (CID) mekanizmasıyla fragmanlara ayrılır ve bu sayede hedef bileşiğe özgü yapısal bilgiler elde edilebilir (218). Özellikle üçlü kuadrupol (QqQ) sistemler, düşük tespit sınırları ile iz düzeyindeki analitlerin seçici ve hassas tayininde büyük avantaj sağlamaktadır. Kuadrupol analizörlerin yüksek kararlılığı, nispeten düşük maliyeti ve geniş uygulama alanı sayesinde bu sistemler, Kimyasal Silahlar Sözleşmesi kapsamındaki uygulamalarda etkin biçimde kullanılmaktadır (197, 200).

f. Üçlü Kuadrupol Kütle Spektrometresi

Üçlü kuadrupol kütle spektrometresi, tekli kuadrupol sistemlerin geliştirilmiş bir versiyonudur. Bu sistemler, Şekil 2.19'da gösterildiği gibi Q1, q2 ve Q3 olarak adlandırılan, ardışık olarak yerleştirilmiş üç analizör içerir.



Şekil 2.19. Bir QqQ analizörün şematik gösterimi**.**

Bu analizörlerden Q1, belirli bir m/z oranına ayarlanmış olup, hedef öncül iyonları seçmekle görevlidir. q2, genellikle argon veya azot gibi inert gazların kullanıldığı, seçilen iyonların çarpıştırıldığı ve iç enerjilerinin artırılarak parçalandığı çarpışma hücresidir. Bu süreç, çarpışmaya bağlı ayrıştırma ya da çarpışmaya bağlı aktif ayrışma olarak adlandırılır. q2 hücresi, bazı sistemlerde kuadrupol yerine hekzapol ya da oktopol yapıda olabilir. Q3 ise oluşan ürün iyonlarını (fragmentleri) filtreleyerek dedektöre yönlendirir ve bu sayede kütle spektrumu elde edilir. Bu adım, öncül iyonun yapısal karakterizasyonuna olanak tanır (218).

Üçlü kuadrapol sistemler hem nitel hem de kantitatif analizlerde yüksek duyarlılık ve seçicilik sunar (219). Düşük arka plan sinyali ve geniş bir dinamik aralık sunarak iz düzey bileşiklerin yüksek hassasiyetle ve güvenilir şekilde kantitatif analizini mümkün kılar (220).

g. Üçlü Kuadrupolün Temel Çalışma Modları

Ürün İyon Taraması *(Product Ion Scan)*: Bu modda, Q1 belirli bir m/z oranına sahip öncül iyonu seçer. Seçilen iyon, q2 çarpışma hücresinde inert gaz ile çarpıştırılarak parçalanır. Ardından Q3, öncül iyonun parçalanmasından oluşan tüm ürün iyonlarını tarayarak bir kütle spektrumu oluşturur. Bu tarama ile, moleküler yapı hakkında ayrıntılı bilgi elde edilir (218).

Öncül İyon Taraması *(Precursor Ion Scan)*: Belirli bir ürün iyonuna yol açabilecek tüm öncül iyonları tanımlamak amacıyla uygulanır. Q3 sabitlenerek hedef ürün iyon seçilir. Q1 ise tarama yaparak bu ürünü oluşturan tüm öncülleri belirler. Bu

mod, özellikle belirli parçalanma paternleri sergileyen bileşiklerin seçici tespiti için kullanılır (218).

Nötr Kayıp Taraması *(Neutral Loss Scan)*: Bu modda Q1 ve Q3 analizörleri eşzamanlı olarak tarama yapar; ancak Q3, Q1'e göre sabit bir m/z farkı ile ayarlanır. Böylece, belirli bir nötr fragman (örneğin H_2O veya NH_3) kaybeden iyonlar tespit edilebilir. Bu yöntem, ortak nötr kayıplar üzerinden tanımlama yapmaya olanak tanır (218).

Seçilmiş/Çoklu Reaksiyon İzleme (SRM/ MRM): SRM modunda Q1 ve Q3 analizörleri belirli bir m/z oranına karşılık gelen sabit bir radyo frekansına ayarlanır. Sistem yalnızca hedef öncül iyon numunede mevcutsa ve seçilen ürün iyonuna fragmantasyona uğruyorsa sinyal verir. MRM modunda ise QqQ, birden fazla öncül iyon veya bunlara karşılık gelen birden fazla ürün iyonunu izleyebilir. Bu, özellikle birden fazla hedef analitin eş zamanlı analizinde büyük avantaj sağlar. SRM/MRM yöntem geliştirme aşamasında, her hedef analit için öncelikle tekil, güvenilir standart maddelerle tarama yapılır. Q1'de seçilen öncül iyonun, Q3'te gözlenen karakteristik ürün iyonuna karşılık gelip gelmediği kontrol edilir. Yüksek analitik hassasiyet sağlamak amacıyla, en belirgin ve seçici ürün iyonlarının (geçişlerin) seçilmesi önemlidir. Ancak, en bol bulunan iyonlar genellikle özgül değildir. Bu durumda, daha özgül ama daha az yoğun ürün iyonları tercih edilerek, seçicilik artırılır (218).

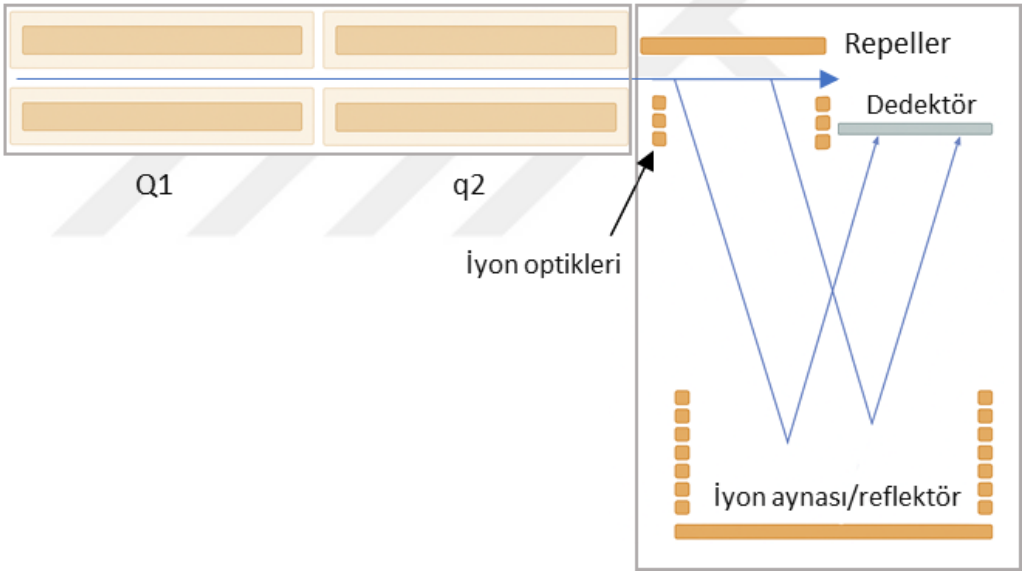
h. Kuadrupol-Zaman-Uçuşlu Kütle Spektrometrisi (Q-TOF-MS)

Üçlü kuadrupol kütle spektrometreleri yüksek duyarlılık ve seçicilik sunsa da bazı sınırlamalara sahiptir. Bunlardan ilki, Q1 ve Q3 analizörlerinin m/z aralığını sınırlı hızda taraması nedeniyle geniş spektral kapsamın elde edilememesidir. İkincisi ise, Q3'ün düşük çözünürlük ve sınırlı kütle doğruluğu sunmasıdır. Bu kısıtları aşmak amacıyla, Q3 yerine zaman-uçuşlu (TOF) analizör içeren Q-TOF sistemler geliştirilmiştir (200).

Zaman-uçuşlu kütle analizörleri, iyonların aynı başlangıç enerjisiyle ivmelendirildikten sonra, vakum altında aldıkları yolun sürelerine göre ayrılmasını sağlar. Kinetik enerji, $E_k = ½mv^2$ denklemine göre tanımlanır ve tüm iyonlar aynı

kinetik enerjiye sahip olduğundan, hafif iyonlar daha hızlı hareket ederken ağır iyonlar daha yavaş ilerler. Bu zaman farkı, iyonların m/z oranına göre ayrılmasına olanak tanır (217). QTOF sistemlerinde iyonlar, kuadrupolden belirli zaman aralıklarıyla darbe (pulse) şeklinde TOF tüpüne yönlendirilir ve bir potansiyel farkı ile ivmelendirilir. Dedektöre ulaşma süreleri, iyonların başlangıç zamanlarına göre kaydedilir ve elde edilen zaman dağılımı, kütle spektrumuna dönüştürülür (200).

İyonlar Q-TOF sistemlerinde, kuadrupolden TOF analizörüne ortogonal yönde aktarılır. Bu ortogonal geometri, eksenel enerji dağılımını azaltarak zaman çözünürlüğünü iyileştirir. Çözünürlüğü artırmak için reflektör (iyon aynası) kullanılır. Bu yapı, farklı hızlardaki iyonların uçuş yollarını uzatarak aynı m/z'ye sahip iyonların dedektöre eşzamanlı ulaşmasını sağlar ve piki daraltarak çözünürlüğü artırır (211). Şekil 2.20, QTOF kütle analizörünün şematik görünümünü göstermektedir.



Şekil 2.20. QTOF kütle analizörünün şematik görünümü (200).

Üçlü kuadrapol sistemler, kantitatif analizde hassasiyet ve tekrarlanabilirlik sağlarken; Q-TOF sistemler, yüksek çözünürlük ve kütle doğruluğu sayesinde yapısal tanımlama, izotop profili çıkarma ve bilinmeyen maddelerin analizinde ön plana çıkar (200). Q-TOF sistemleri ile elde edilen spektrumlar, yüksek kütle doğruluğu ile molekül formülü tayini ve yapısal aydınlatmaya olanak tanır (221). MS'e dayalı bu yüksek çözünürlüklü sistemler, kimyasal savaş ajanlarının metabolitlerinin

tanımlanması ve biyobelirteç tespiti gibi toksikolojik uygulamalarda da sık kullanılır (200).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal maddeler aşağıda listelenmiştir. Bunlar dışında çalışmalarda kullanılan Q, laboratuvar ortamında sentezlenmiştir. Q-GSH ve Q-Cys konjugatları, Q'nun GSH ve Cys ile reaksiyonundan elde edilmiştir. Q'nun DNA katım ürünleri ise calf tyhmus DNA (ctDNA)'nın Q'ya in vitro maruziyetinden elde edilmiştir.

Kimyasal Madde	**Marka**
1,2-Bis(2-hidroksietiltiyo)etan (BHETE)	Sigma-Aldrich
Tiyonil klorür ($SOCl_2$)	Sigma-Aldrich
L-Glutatyon (indirgenmiş, GSH)	Sigma-Aldrich
L-Sistein hidroklorür (Cys·HCl)	Sigma-Aldrich
Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$)	Sigma-Aldrich
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma-Aldrich
Sodyum fosfat monobazik monohidrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	Sigma-Aldrich
Sodyum fosfat dibazik dihidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$)	Sigma-Aldrich
Susuz etanol (EtOH)	Sigma-Aldrich
Sodyum sülfat (Na_2SO_4)	Merck
Sodyum klorür (NaCl)	Merck
Sodyum klorür (NaCl)	Merck
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Hidroklorik asit (HCl)	Merck
Formik asit (FA)	Merck
Diklorometan (DCM, GC-MS saflıkta)	Merck
Metanol (MeOH, LC–MS saflıkta)	Supelco
Asetonitril (ACN, LC–MS de saflıkta)	Supelco
Ultra saf su (LC–MS saflıkta)	Supelco
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose	Biowest
Dulbecco'nun Fosfat Tamponlu Serum Fizyolojik Çözeltisi (DPBS)	Biowest

Tripsin EDTA çözeltisi	Biowest
Fötal Sığır Serumu (FBS)	Biowest
Penisilin-Streptomisin karışımı (1% v/v, 50 U/mL & 50 µg/mL)	Biowest
DNA izolasyon kiti (QIAamp DNA Mini Kit)	Qiagen
DNA sodium salt from calf thymus (ctDNA)	Sigma-Aldrich

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Donanımlar

Bu tez çalışmasında gerçekleştirilen analizler, başlıca iki LC–MS sistemi ile yürütülmüştür. Bunlardan ilki, Nexera 2 UHPLC ve LCMS-8060 triple quad kütle spektrometresinden oluşan Shimadzu LC–MS/MS sistemidir. Bu sistemde kullanılan UHPLC modülü, aynı zamanda PDA (photodiode array) dedektör ve fraksiyon toplama ünitesinden (FRC) oluşmaktadır.

İkinci sistem ise, Agilent 1290 Infinity II UHPLC ile 6550 iFunnel Accurate-Mass Q–TOF/MS dedektörünü içeren bir LC–Q–TOF/MS platformudur. Bu cihazda iyonizasyon işlemi, Agilent Jet Stream elektrospray iyon kaynağı ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmalarda kullanılan diğer laboratuvar cihazları ve donanımlar aşağıda listelenmiştir.

Cihaz	**Donanım/ Marka/ Model**
Termomikser	Eppendorf
Santrifüj	Hettich
Mikrosantrifüj	Hettich Mikro 22R
CO_2 inkübatörü	Heraeus
Qubit 4 Florometre	Invitrogen, Thermo Fisher Sci.
Otomatik pipetler (10 µL, 20 µL, 200 µL, 1 mL, 5 mL, 10 mL)	Eppendorf
Azotlu Solvent Uçurma Sistemi	Horizon
Buzdolabı	Meling, Arçelik
Derin dondurucu (-20 °C/ -80°C)	Meling, Revco
Biyogüvenlik kabini	Holten Lamin Air

Çeker ocak	Metisafe
Işık mikroskobu	Leica
Su banyosu	Memmert
Otomatik hücre sayım cihazı	Nanoentek / Eve
Ultrasonik banyo	Isolab
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	Isolab
pH metre	Mettler Toledo
Vakumlu evaporatör	Buchi R300
Analitik terazi	Precisa XB 220 A SCS

3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

Malzeme	**Marka**
PTFE membran filtre (0.2 µm)	Millex
LC kolonu (ACE 5 C18, 5 µm, 4.6×250 mm)	ACE
LC kolonu (Purospher STAR RP-18e, 2 µm, 2.1×100 mm)	Merck
LC kolonu (Zorbax Eclipse Plus C18, 1.8 µm, 50×2.1 mm)	Agilent
Pipet uçları (çeşitli boyutlarda)	Isolab
Santrifüj tüpleri (15 mL, 50 mL)	Isolab
Hücre kültürü flaskları (75 cm^2)	Greiner
Enjektör (1 mL)	Sigma-Aldrich
Vidalı kapaklı vial (2 mL, 4 mL, 12 mL, 22 mL, 40 mL)	Agilent
Vial insert	Agilent
Pastör pipeti	Isolab
Steril pipetler (5 mL, 10 mL)	Greiner Bio-One
Cam mezür (500 mL, 1 L)	Isolab
pH kâğıdı	Isolab
Cam beher (50 mL, 100 mL, 250 mL)	Isolab
Mikrosantrifüj tüpü	Eppendorf

3.4. Analizlerde Kullanılan Yazılımlar

Yazılım	Marka/ Sürüm
MassHunter (Data Acquisition & Qualitative Analysis)	Agilent/ B.10.00
LabSolutions LCMS yazılımı (Data Acquisition & Qualitative Analysis)	Shimadzu (5.97)
ChemDraw Professional	Perkin Elmer Informatics (v.19.0.1.28)

3.5. Çözeltilerin Hazırlanması

3.5.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

Hücrelerin çoğaltılması ve pasajlanması amacıyla kullanılan tam besiyeri, 500 mL DMEM besiyeri içerisine son konsantrasyon %10 olacak şekilde 50 mL FBS ve %1 olacak şekilde 5 mL penisilin-streptomisin çözeltisi eklenerek hazırlanmıştır. Homojen şekilde karıştırıldıktan sonra kullanılmadığı süre içinde 2-8 °C'de buzdolabında tutulmuştur.

3.5.2. %0,1 FA Çözeltisinin Hazırlanması

Bir miktar LC-MS saflıkta ultra saf su üzerine 1 mL saf formik asit eklenmiş, ardından hacim 1 L'ye tamamlanarak %0,1 (v/v) formik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Hacim tamamlandıktan sonra çözelti homojen hale gelene kadar karıştırılmış ve bir süre ultrasonik banyoda degaze edilmiştir.

3.5.3. %0,1 FA İçeren ACN Çözeltisinin Hazırlanması

Bir miktar LC-MS saflıkta ACN üzerine 1 mL saf formik asit eklenmiş, ardından hacim 1 L'ye tamamlanarak %0,1 (v/v) formik asit içeren ACN çözeltisi hazırlanmıştır. Hacim tamamlandıktan sonra çözelti homojen hale gelene kadar karıştırılmış ve bir süre ultrasonik banyoda degaze edilmiştir.

3.5.4. %70 (v/v) EtOH Çözeltisinin Hazırlanması

%70 (v/v) etanol çözeltisi, 35 mL mutlak etanol üzerine 15 mL saf su eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti, bir dakika boyunca vortekslenerek homojen hale getirilmiştir.

3.5.5. %50 (v/v) MeOH Çözeltisinin Hazırlanması

%50 (v/v) MeOH çözeltisi, 5 mL LC-MS saflıkta metanol üzerine 5 mL LC-MS saflıkta ultra saf su eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti, bir dakika boyunca vortekslenerek karıştırılmıştır.

3.5.6. 0,1 M NaOH Çözeltisinin Hazırlanması

0,1 M NaOH çözeltisi, 0,040 g NaOH'nin 10 mL saf su içinde hazırlanmıştır.

3.5.7. 4 M NaCl Çözeltisinin Hazırlanması

4 M NaCl çözeltisi, 234 mg NaCl'nin 1 mL saf su içinde çözülerek hazırlanmıştır.

3.5.8. Doymuş $NaHCO_3$ Çözeltisinin Hazırlanması

Doymuş sodyum bikarbonat çözeltisi, oda sıcaklığında saf suda $NaHCO_3$ maksimum çözünürlüğüne ulaşacak şekilde hazırlanmıştır (30 mL saf suda yaklaşık 2,85 gram). Bu amaçla, beher içine 30 mL saf su alınarak üzerine yavaşça sodyum bikarbonat ilave edilmiş ve sürekli manyetik karıştırma altında çözünme tamamlanana kadar ekleme sürdürülmüştür. Çözünmeyen katı formda madde dibe çökmeye başladığında sistem doygun hale geldiği kabul edilmiş, karışım oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Kullanım öncesi çözeltide partikül içeriği filtre edilerek berrak faz kullanılmıştır.

3.5.9. Q Çözeltilerinin Hazırlanması

İn vitro deneylerde kullanılmak üzere, EtOH içerisinde 400 mM ve DMSO içerisinde 50 mM olmak üzere iki ana stok çözelti hazırlanmıştır. DNA maruziyet

deneyleri doğrudan 400 mM'lik çözeltiden gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü uygulamalarında kullanılan dozlar ise, 50 mM'lik ana stok ve bu stoktan hazırlanan ara stok çözeltilerle elde edilmiştir. Hazırlama prosedürleri aşağıda verilmiştir:

400 mM Q çözeltisi: 43,84 mg sesquimustard (Q), 500 µL etanol içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

50 mM Q çözeltisi: 21,92 mg Q, 2 mL DMSO içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

20 mM Q çözeltisi: 50 mM stok çözeltiden 400 µL alınarak, hacim DMSO ile 1 mL'ye tamamlanmıştır.

10 mM Q çözeltisi: 50 mM stok çözeltiden 200 µL alınarak, hacim DMSO ile 1 mL'ye tamamlanmıştır.

5 mM Q çözeltisi: 50 mM stok çözeltiden 100 µL alınarak, hacim DMSO ile 1 mL'ye tamamlanmıştır.

Uygulama çözeltileri aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

250 µM Q çözeltisi: 50 mM çözeltiden 15 µL alınarak, hacim DPBS ile 3 mL'ye tamamlanmıştır.

100 µM Q çözeltisi: 20 mM çözeltiden 15 µL alınarak, hacim DPBS ile 3 mL'ye tamamlanmıştır.

50 µM Q çözeltisi: 10 mM çözeltiden 15 µL alınarak, hacim DPBS ile 3 mL'ye tamamlanmıştır.

25 µM Q çözeltisi: 5 mM çözeltiden 15 µL alınarak, hacim DPBS ile 3 mL'ye tamamlanmıştır.

3.5.10. 50 mM Fosfat Tamponunun (pH 7,00) Hazırlanması

Öncelikle 50 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ çözeltisi hazırlamak için 6,90 mg madde tartılmış ve 10 mL ultra saf su içerisinde çözülmüştür. 50 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ çözeltisi için ise 8,90 mg madde tartılarak yine 10.00 mL ultra saf su içinde çözülmüştür. Hazırlanan bu iki stok çözelti kullanılarak pH=7'de fosfat tamponu elde edilmiştir. Bunun için, 3,9 mL 50 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ çözeltisi ile 6,1 mL 50 mM $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$

çözeltisi uygun bir kap içerisinde karıştırılmış ve homojen hale getirilmiştir. Çözeltinin pH'ı ölçülerek gerekli görülmesi halinde HCl ya da NaOH ile pH ayarlaması yapılmıştır.

3.5.11. ctDNA Çözeltisinin Hazırlanması

5 mg ctDNA, 5 mL 50 mM fosfat tamponu (pH 7) içerisinde çözülerek 1 mg/mL konsantrasyonunda bir stok çözelti hazırlanmıştır. Bu çözelti, deneysel işlemlerden bir gün önce hazırlanmış olup 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.6. Yöntemler

3.6.1. Deneylerde Kullanılacak Q'nun sentezi

Bu tez çalışmasında kullanılan Q bileşiği, özetle BHETE'nin DCM ortamında $SOCl_2$ ile reaksiyonuna dayanan bir sentez prosedürü ile elde edilmiştir. (68). Elde edilen ürünün moleküler yapısı ve saflığı 1H- ve 13C-nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ile doğrulanmış olup, bileşiğin saflığının %99'un üzerinde olduğu tespit edilmiştir. NMR sonuçları EK-1'de verilmiştir.

3.6.2. GSH ve Cys'nin Q ile Doğrudan Konjugasyon Reaksiyonları

Seskimustard bileşiğinin GSH ve Cys ile konjugatları, bu bileşiklerin doğrudan reaksiyona sokulmasıyla elde edilmiştir. İlk olarak, 0,2 mmol (61,46 mg) GSH, 10 mL doymuş $NaHCO_3$ çözeltisinde çözülmüştür. Ardından, 0,1 mmol (21,92 mg) Q, 10 mL ACN içerisinde çözülerek hazırlanmış olan çözeltisi, GSH çözeltisine damla damla eklenmiştir. Reaksiyon ortamının pH'ı 8–9 aralığında tutulmuş, pH düşüşü gözlendiğinde, 0,1 M NaOH ile gerekli ayarlama yapılmıştır. Reaksiyon, oda sıcaklığında manyetik karıştırma eşliğinde yürütülmüş ve ilerleyişi GC–MS/dFPD sistemi ile izlenmiştir. Q'nun tamamen tüketilmesiyle tamamlanan reaksiyonun ardından, karışım üç kez 15 mL DCM ile ekstrakte edilerek reaksiyona girmeyen Q ve olası bozunma ürünleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen sulu faz, vakum altında buharlaştırılarak beyaz renkli katı hâlde nihai ürün izole edilmiştir.

Sistein ile Q arasındaki reaksiyon ise, GSH ile uygulanan protokolün tamamen aynısı kullanılarak ve eşdeğer mol oranlarında gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyon

prosedürleri, Bielmann ve ark. tarafından tanımlanan yöntem esas alınarak uyarlanmıştır (222).

Elde edilen ürünlerin, %0,1 FA içeren çözelti içerisinde 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan örnekleri, öncelikle LC-HRMS yöntemiyle analiz edilerek reaksiyonlar sonucunda oluşan tüm konjugatlar tanımlanmıştır. Tanımlanan bu ürünler LC–PDA–FRC sistemi kullanılarak ile fraksiyonlarına ayrılmış ve her bir konjugatın saf formu izole edilmiştir. İzole edilen bu fraksiyonlar, LC-HRMS analizinde yapısal karakterizasyon çalışmalarında ve LC–MS/MS analizlerinde MRM geçişlerinin optimizasyonunda referans madde olarak kullanılmıştır.

3.6.3. ctDNA ile Q Katım Ürünlerinin *İn Vitro* Oluşturulması

DNA katım ürünlerinin karakterizasyonu ve yapısal analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla, ctDNA örnekleri Q bileşiğine in vitro olarak maruz bırakılmış ve bu işlem sonucunda oluşan DNA katım ürünlerinin oluşumu incelenmiştir.

Maruziyetten bir gün önce hazırlanan ctDNA çözeltisinden 1 mL alınarak üzerine susuz EtOH içerisinde çözülmüş 400 mM Q çözeltisinden 5 µL alınarak, son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde ilave edilmiştir. Karışım, 37 °C'de bir termomikserde 6 saat süreyle inkübe edilmiştir. Bu işlem sırasında EtOH'in nihai konsantrasyonu %0,5'i aşmamıştır.

İnkübasyonun ardından DNA'nın çöktürülmesi amacıyla, karışıma 2,5 mL soğuk susuz EtOH ve 10 µL 4 M NaCl çözeltisi ilave edilmiştir. Oluşan DNA pelletleri ayrıldıktan sonra, %70 (v/v) EtOH ile üç kez yıkanarak Q ve olası bozunma ürünlerinden arındırılmıştır. Elde edilen DNA pelletleri, 1 mL deiyonize su içerisinde çözülerek nötr koşullarda hidroliz amacıyla 90 °C'de 20 dakika süreyle ısıtılmıştır. Oda sıcaklığına soğutulan çözelti, 14.000 rpm'de 20 dakika süreyle 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant, 1 mL LC-MS saflıkta MeOH ile karıştırılmış ve 0,2 µm PTFE membran filtreden geçirilerek analizlere hazır hale getirilmiştir.

Maruziyet sonrasında oluşan DNA katım ürünleri, öncelikle LC-HRMS yöntemiyle analiz edilerek maruziyet sonucunda oluşan tüm katım ürünleri

tanımlanmıştır. Tanımlanan bu katım ürünleri, LC–PDA–FRC sistemi kullanılarak fraksiyonlarına ayrılmış ve her bir yapı saf olarak izole edilmiştir. İzole edilen fraksiyonlar, LC-HRMS analizlerinde yapısal karakterizasyon çalışmalarında ve LC–MS/MS analizlerinde MRM geçişlerinin optimizasyonunda referans standart olarak kullanılmıştır.

Bu deneysel işlem prosedürleri, daha önce literatürde yayımlanmış çalışmalara dayalı olarak geliştirilmiştir (188, 223).

3.6.4. Hücre Kültürü

Bu tez çalışmasında, insan epidermal keratinositlerinden türetilmiş ölümsüzleştirilmiş hücre hattı (HaCaT) kullanılmıştır. HaCaT hücreleri, bazal epidermal keratinositlere olan güçlü morfolojik ve fonksiyonel benzerlikleri nedeniyle deriyle temas eden vezikan ajanların toksik etkilerini *in vitro* koşullarda modellemek için uygun bir model sunmaktadır. Q ve HD gibi vezikan ajanlar için deri doğrudan hedef organ olduğundan, deneysel çalışmalarda bu dermal maruziyetin modellenmesi amacıyla HaCaT hücre hattı tercih edilmektedir.

HaCaT hücreleri, %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) antibiyotik karışımı (50 U/mL penisilin ve 50 mg/mL streptomisin) içeren DMEM ile zenginleştirilmiş besiyerinde kültürlenmiştir. Hücreler steril koşullarda pasajlanarak 75 cm^2 yüzey alanına sahip kültür flasklarına ekilmiş ve %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş atmosferde, 37 °C'de bulunan bir CO_2 inkübatöründe inkübe edilmiştir. Kültür ortamı düzenli aralıklarla yenilenmiş, hücre yoğunluğu mikroskop altında izlenerek deneyler başlamadan önce yeterli çoğalma düzeyine ulaşmaları sağlanmıştır.

3.6.5. Hücrelere Q Uygulanması

Her bir 75 cm^2 yüzey alanına sahip hücre kültürü flaskına 4×10^6 HaCaT hücresi ekilmiş ve hücrelerin yüzeye tutunmalarını sağlamak amacıyla 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler, DPBS içerisinde hazırlanmış Q çözeltileri ile muamele edilmiştir. Uygulama gruplarında Q'nun son konsantrasyonları 25, 50, 100 ve 250 µM olacak şekilde

ayarlanmış, tüm çözeltilerde DMSO'nun nihai konsantrasyonu %0,5 (v/v) olacak şekilde sabitlenmiştir. Kontrol grubuna yalnızca %0,5 (v/v) DMSO içeren DPBS çözeltisi uygulanmıştır. Q uygulaması sırasında hücreler oda sıcaklığında 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir.

Bu uygulama, Q maruziyetine bağlı olarak oluşabilecek GSH ve Cys konjugatlarının hem hücre içi hem de hücre dışı ortamlarda doz ve zamana bağlı olarak izlenmesini amaçlamaktadır. Bu amaçla, belirlenen zaman noktalarında DPBS, besiyeri ve hücre örnekleri alınarak analiz öncesi saklanmıştır.

İnkübasyonun sonunda hücrelerin maruz kaldığı DPBS çözeltisinden 250 µL örnek alınarak "0. dakika" örneği olarak kaydedilmiş ve –80 °C'de saklanmıştır. Ardından hücreler DPBS ile iki kez yıkanmış, her bir flaska taze besiyeri ilave edilmiştir. Daha sonra hücreler 37 °C'de, %5 CO_2 içeren nemlendirilmiş inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Taze ortam eklendikten sonra sırasıyla 10 dakika, 1 saat, 3 saat ve 6 saat zaman noktalarında her birinden 250 µL örnek alınmış ve –80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Altı saatlik inkübasyonun sonunda, besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler %0,25'lik tripsin çözeltisi ile yüzeyden ayrılmıştır. Hücre süspansiyonu santrifüj tüplerine alınarak 1000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre pelletleri 1 mL DPBS içerisinde süspanse edilerek 500 rpm'de 5 dakika süreyle tekrar santrifüj edilmiş, ardından üst faz uzaklaştırılmıştır. Bu işlemler, Q'ya maruz kalan hücrelerden DNA katım ürünlerinin analizine yönelik olarak DNA izolasyonu yapılabilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hücre pelletleri –80 °C'de DNA izolasyonuna kadar saklanmıştır.

Ayrıca, yalnızca 30 dakika süreyle Q'ya maruz bırakılan ayrı bir uygulama grubu oluşturulmuştur. Bu grupta, hücreler belirtilen konsantrasyonlardaki Q çözeltileriyle oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra aynı santrifüj ve saklama adımlarına tabi tutulmuştur. Bu grup, kısa süreli maruziyet koşullarında hücre içi GSH ve Cys konjugatlarının oluşumunu değerlendirmek amacıyla tasarlanmıştır.

Tüm uygulamalar her bir konsantrasyon için üç bağımsız tekrar şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.6.6. GSH ve Cys Konjugatlarının Analizi İçin Numune Hazırlığı

Hücre kültürü deneylerinde elde edilen tüm örnekler, LC–MS/MS sistemi ile analiz edilmiştir. Analize hazırlık amacıyla, hem hücre dışı (DPBS ve besiyeri) hem de hücre içi (hücre pelletleri) örnekler için aşağıda belirtilen numune hazırlama işlemleri uygulanmıştır.

DPBS ve besiyerinden elde edilen sıvı örnekler, toplandıktan sonra –80 °C'de analiz öncesine kadar saklanmıştır. LC–MS/MS analizinden önce bu örnekler çözdürülmüş, ardından 10.000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatlice ayrılarak alınmış, 0,2 µm gözenek çapına sahip PTFE membran filtrelerden geçirilmiş ve %0,1 FA ile bire bir oranında seyreltilmiştir. Hazırlanan örnekler LC–MS/MS analizine tabi tutulmuştur.

Hücre pelletlerinden lizat hazırlanması amacıyla, –80 °C'de saklanan hücrelerin üzerine doğrudan 500 µL soğuk MeOH ilave edilmiş ve örnekler 5 dakika süreyle vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında yaklaşık 15 dakika bekletildikten sonra karışım, 10.000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatlice ayrılarak alınmış, azot atmosferi altında tamamen buharlaştırılarak kurutulmuştur. Kalıntı, 100 µL %0,1 FA içerisinde yeniden çözündürülmüş ve 0,2 µm PTFE filtreden geçirilerek LC–MS/MS analizine hazır hale getirilmiştir.

3.6.7. Hücrelerden DNA İzolasyonu

Q uygulamasına maruz bırakılan HaCaT hücrelerinden, DNA üzerindeki olası katım ürünlerinin yapısal analizi amacıyla genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon işlemi, QIAamp DNA Mini Kit kullanılarak, üretici firma tarafından kültür hücreleri için önerilen protokol esas alınarak uygulanmıştır.

–80 °C'de saklanan hücre pelletleri doğrudan 1,5 mL mikrosantrifüj tüplerine alınmış, üzerine 20 µL Proteinaz K çözeltisi ve 200 µL fosfat tamponlu salin (PBS) ilave edilmiştir. Ardından 200 µL Buffer AL eklenmiş ve karışım 15 saniye boyunca vortexlenerek homojen hâle getirilmiştir. Tüpler 56 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında karışıma 200 µL %96–100 etanol ilave edilerek tekrar vortexlenmiştir. Elde edilen lizat, QIAamp spin kolona aktarılmış ve 8000 rpm (6000 ×

g) hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Kolon sırasıyla 500 µL Buffer AW1 ve 500 µL Buffer AW2 ile yıkanmış, her yıkama adımı sonrası santrifüj edilmiştir. Kolon yeni bir temiz tüpe aktarılmış ve kalan yıkama tamponlarının tamamen uzaklaştırılması amacıyla 14.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

DNA elüsyonu için kolon üzerine 200 µL deiyonize su ilave edilmiş, 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra santrifüj edilerek DNA, toplama tüpüne elüe edilmiştir. Böylece izolasyon işlemi tamamlanmıştır.

İzole edilen genomik DNA'nın miktar ve saflığı, Qubit 4 Fluorometre ile belirlenmiştir.

Elde edilen DNA örnekleri 200 µL deiyonize su içerisinde çözülmüş ve 90 °C'de 20 dakika hidrolize edilmiştir. Hidroliz sonrası çözelti, 14.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant dikkatlice alınarak 200 µL MeOH ile karıştırılmış ve 0,2 µm PTFE membran filtreden geçirilmiştir. Elde edilen filtrat 40 °C'de azot atmosferi altında buharlaştırılarak kurutulmuş, kalıntı 50 µL MeOH–su (50:50, v/v) karışımı içerisinde yeniden çözündürülerek LC–MS/MS analizine hazır hâle getirilmiştir. Aynı protokol tüm deney gruplarına uygulanmıştır.

3.6.8. HPLC–UV–PDA ile Fraksiyonel Saflaştırma İşlemleri

Seskimustardın GSH ve Cys reaksiyonu sonucu oluşan konjugatların ve DNA katım ürünlerinin LC-HRMS ve LC-MS/MS analizlerinde kullanılmak üzere, tanımlanan her bir konjugat ve katım ürünü HPLC–PDA–FRC sistemi kullanılarak fraksiyonlarına ayrılmış ve saf formları izole edilmiştir.

Glutatyon ve Cys konjugatlarının ayrımında C18 ters faz kolonu (ACE, 5 µm, 4.6 × 250 mm) kullanılmış, hareketli faz A olarak %0,1 FA içeren su, hareketli faz B olarak ise %0,1 FA içeren ACN tercih edilmiştir. Akış hızı 1 mL/dk olarak ayarlanmış ve Tablo 3.1'de verilen gradient elüsyon programı uygulanmıştır. Kolon sıcaklığı 60 °C'de sabit tutulmuş, toplam analiz süresi 4,9 dakikalık yeniden dengeleme süresi dahil 55 dakika olarak belirlenmiştir. Fraksiyonlar detektörde 190–320 nm dalga boyunda izlenerek yaklaşık 2 mL hacminde toplanmıştır.

Tablo 3.1. GSH ve Cys konjugatlarının HPLC-PDA-FRC ayrımı için uygulanan analizler için gradient elüsyon koşulları.

Zaman (dk)	%A	%B
0	100	0
10	95	5
30	80	20
45	70	30
50	70	30
50,1	100	0

DNA katım ürünlerinin HPLC–PDA-FRC sistemindeki kromatografik ayrımı da aynı kolon ile gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz A olarak ultra saf su, hareketli faz B olarak MeOH kullanılmış, akış hızı 1 mL/dk olarak ayarlanmıştır. Uygulanan gradient elüsyon programı Tablo 3.2'de verilmiştir. Toplam analiz süresi 4,9 dakikalık yeniden dengeleme süresi dahil 60 dakika olarak belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı 40 °C'de sabit tutlmuş, DNA katım ürünleri detektörde 190–320 nm aralığında izlenmiş ve yaklaşık 2 mL hacminde fraksiyonlar halinde toplanmıştır.

Tablo 3.2. DNA katım ürünlerinin HPLC–PDA-FRC ayrımı için uygulanan analizler için gradient elüsyon koşulları.

Zaman (dk)	%A	%B
0	100	0
10	95	5
20	80	20
45	70	30
55	70	30
55,1	100	0

Elde edilen tüm fraksiyonlar LC–HRMS ile yapısal doğrulama, moleküler karakterizasyon ve LC–MS/MS sistemlerinde MRM geçişlerinin optimize edilmesinde referans olarak kullanılmıştır.

3.6.9. LC-HRMS Analizleri

Seskimustardın GSH ve Cys ile oluşturduğu konjugatlar ve DNA ile meydana getirdiği katım ürünlerinin yapısal karakterizasyonu ve yapısal tanımlama analizleri

LC–HRMS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Analizler LC-Q-TOF/MS cihazı kullanılarak yürütülmüş, cihaz her analiz öncesinde üretici firmanın standart kalibrasyon çözeltisi ile günlük olarak kalibre edilmiştir. Analizler sırasında cihaz operasyonları *MassHunter Data Acquisition* yazılımı aracılığı ile gerçekleştirilirken veri analizinde *MassHunter Qualitative Analysis* yazılımı kullanılmıştır. Tüm analizler için optimize edilmiş operasyonel kütle spektrometresi parametreleri Tablo 3.3'te özetlenmiştir.

Tablo 3.3. Q-TOF/MS için optimize edilmiş operasyonel parametreler.

Parametre	Değer
İyonizasyon modu	Pozitif (+) ESI
Cihaz Modu	2 GHz (*extended dynamic range*)
Çözünürlük	~15.000 (for m/z 322.048132)
Kütle aralığı	100-1000 m/z
Kurutma gazı akışı	12 L/min
Nebülizatör basıncı	35 psig
Sheath gaz sıcaklığı	300 °C
Sheath gaz akışı	12 L/min
Kapiler voltajı	3500 V
Fragmentor voltajı	80 V
Nozzle voltajı	800 V
Oktopol 1 RF voltajı	750 V
Tarama Hızı	0.5 spectra/sec (MS), 5 spectra/sec (MS/MS)
Çarpışma Enerjileri (CE)	0-40 V
İzolasyon genişliği	1,3 m/z
Referans iyonlar	121,0509 m/z (Purine), 922,0098 m/z (HP-921)

Veri değerlendirmesi Kimyasal Silahların Yasaklanması Örgütü tarafından belirlenen kriterlere göre yapılmıştır. Bu kapsamda, kütle doğruluğu *full* MS modunda ±2,5 ppm ve *targeted* MS/MS modunda ±5 ppm aralığında kalan iyonlar değerlendirmeye alınmıştır. İzotopik dağılımda ise bağıl bolluğu %1'in üzerinde kalan iyonlar teorik olarak belirlenen izotopik modeller ile karşılaştırılmıştır. Glutatyon ve Cys konjugatları ile DNA katım ürünlerine özgü kromatografik koşullar ise 3.11.1 ve 3.11.2 alt başlıklarında ayrıntılı olarak verilmiştir.

3.6.10. GSH ve Cys Konjugatlarının LC-HRMS Analizlerinde Kullanılan Kromatografik Koşullar

Bu analizlerde kromatografik ayrım *Purospher STAR RP-18 end-capped* C18 kolonu (2 µm, 2.1 × 100 mm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz A olarak %0,1 FA içeren ultra saf su, hareketli faz B olarak %0,1 FA içeren ACN kullanılmıştır. Akış hızı 0,4 mL/dk, enjeksiyon hacmi 1 µL, kolon sıcaklığı 50°C olarak ayarlanmıştır. Uygulanan gradient elüsyon programı Tablo 3.4'de verilmiştir. Toplam analiz süresi 1,99 dakikalık yeniden dengeleme süresi dahil 11 dakika olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.4. GSH ve Cys konjugatlarının LC-HRMS analizlerinde uygulanan gradient elüsyon programı.

Zaman (dk)	%A	%B
0	95	5
2	90	10
3	90	10
4	80	20
5	80	20
6	65	35
7	65	35
8	30	70
9	30	70
9,01	95	5

3.6.11. DNA Katım Ürünlerinin LC-HRMS Analizlerinde Kullanılan Kromatografik Koşullar

DNA katım ürünlerinin analizlerinde de kromatografik ayrım *Purospher STAR RP-18 end-capped* C18 kolonu (2 µm, 2.1 × 100 mm) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz A olarak ultra saf su, mobil faz B olarak MeOH tercih edilmiştir. Akış hızı 0,5 mL/dk, enjeksiyon hacmi 1 µL, kolon sıcaklığı 40 °C olarak ayarlanmış ve

uygulanan gradyan programı Tablo 3.5'de sunulmuştur. Toplam analiz süresi 2,99 dakikalık yeniden dengeleme süresi dahil 15 dakika olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.5. DNA katım ürünlerinin LC-HRMS analizlerinde uygulanan gradient elüsyon programı.

Zaman (dk)	%A	%B
0	95	5
10	65	35
12	65	35
12,01	95	5

3.6.12. LC–MS/MS Analizleri

HaCat hücre kültüründe, Q maruziyeti sonrasında hücre içinde ve besiyerinden oluşan GSH ve Cys konjugatları ile hücresel DNA'da meydana gelen katım ürünlerinin kalitatif analizleri LC–MS/MS sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler, bir ısıtmalı ESI iyon kaynağında, pozitif iyonizasyon modunda ve MRM tarama modunda yürütülmüştür. *Unit* kütle çözünürlüğünde gerçekleştirilen ölçümlerde, her bir hedef konjugat için önceden optimize edilmiş MRM geçişleri izlenmiştir. İyonizasyon parametreleri de Tablo 3.6'da verilen değerlere ayarlanmıştır.

Tablo 3.6. LC–MS/MS iyonizasyon parametreleri.

Parametre	Değer
Nebülizasyon *(nebulizing gas)* akışı	3 L/dk
Isıtma gazı *(heating gas)* akışı	10 L/dk
Kurutma gazı *(drying gas)* akışı	10 L/dk
Arayüz *(interface)* sıcaklığı	300 °C
Desolvasyon hattı *(desolvation line)* sıcaklığı	525 °C
Isıtma bloğu *(heat block)* sıcaklığı	400 °C
DL sıcaklığı	250 °C

Cihaz operasyonları ve verilerin değerlendirilmesi *LabSolutions* yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veri değerlendirmesi, Kimyasal Silahların Yasaklanması Örgütü tarafından belirlenen kriterlere göre yapılmıştır. Bu kapsamda, sinyal/gürültü oranı 3'ten büyük olan ve alıkonma süresi, referans maddeye ait alıkonma süresi ile karşılaştırıldığında ±0,2 saniye tolerans aralığı içinde kalan pikler değerlendirmeye alınmıştır. MRM optimizasyonu sırasında, her bir analit için en yoğun iki iyon geçişi tanımlayıcı iyonlar olarak seçilmiştir. Değerlendirmede referans maddede yer alan tanımlayıcı iyonların numunelerde de tespit edilmesi temel alınmıştır. Ayrıca Her bir konjugata özgü kromatografik koşullar ve MRM optimizasyon parametreleri ise 3.12.1 ve 3.12.2 alt başlıklarında ayrıntılı olarak verilmiştir.

3.6.13. GSH ve Cys Konjugatlarının LC-MS/MS Analizlerinde Kullanılan Kromatografik Koşullar ve Optimize Edilmiş MRM Parametreleri

GSH ve Cys konjugatlarının LC–MS/MS analizinde kullanılan kromatografik koşullar, 3.11.1 bölümünde LC–HRMS için tanımlanan koşullarla aynıdır. MRM geçişlerinin optimizasyonunda, ürün iyon spektrumları dikkate alınarak her bir analit için en uygun iki ürün iyonu seçilmiş; bu geçişler için çarpışma enerjisi (CE), voltaj değerleri ve *dwell time* parametreleri optimize edilmiştir. İlgili geçiş parametreleri Tablo 3.7'de sunulmuştur.

Tablo 3.7. GSH ve Cys konjugatları için optimize edilmiş MRM parametreleri.

Analit	MRM Geçişi (m/z)	Q1 (V)	CE (V)	Q3 (V)	Dwell Time (ms)
HETETE–Cys	286 → 120	–14	–21	–23	54
	286 → 148	–14	–21	–23	54
Cys–ETETE–Cys	389 → 120	–19	–27	–20	82
	389 → 148	–19	–19	–10	82
HETETE–GSH	472 → 105	–13	–33	–10	52
	472 → 177	–13	–20	–18	52
GSH–ETETE–GSH	761 → 503	–22	–47	–32	52
	761 → 632	–22	–29	–23	52

3.6.14. DNA Katım Ürünlerinin LC-MS/MS Analizlerinde Kullanılan Kromatografik Koşullar

DNA katım ürünlerinin LC-MS/MS analizlerinde kromatografik ayrım, bir Zorbax Eclipse Plus C18 (50 × 2.1 mm, 1.8 µm) kolonda gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz A olarak ultra saf su, hareketli faz B olarak MeOH kullanılmıştır. Akış hızı 0,4 mL/dk, enjeksiyon hacmi 1 µL, kolon sıcaklığı 40°C olarak ayarlanmıştır. Uygulanan gradient elüsyon programı Tablo 3.8'de verilmiştir. Toplam analiz süresi 1,49 dakikalık yeniden dengeleme süresi dahil 5 dakika olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.8. DNA katım ürünlerinin LC-MS/MS analizlerinde kullanılan gradient elüsyon programı.

Zaman (dk)	%A	%B
0	95	5
3	65	35
3,5	65	35
3,51	95	5

Analitlerin MRM optimizasyonunda, ürün iyon spektrumlarından en yoğun ve özgül iki iyon belirlenmiş, her bir geçiş için CE, voltaj ayarları ve dwell time gibi parametreler optimize edilmiştir. DNA katım ürünlerine ait optimize edilmiş MRM parametreleri ise Tablo 3.9'da sunulmuştur.

Tablo 3.9. DNA katım ürünleri için optimize edilmiş MRM parametreleri

Analit	MRM Geçişi (m/z)	Q1 (V)	CE (V)	Q3 (V)	Dwell Time (ms)
HETETE-Ade	300→105	-16	-18	-21	247
	300→137	-16	-18	-29	247
HETETE-Gua	316→105	-15	-21	-21	247
	316→137	-15	-16	-14	247
Gua-ETETE-Gua	449→210	-13	-31	-22	247
	449→298	-13	-21	-14	247

3.6.15. Atıkların Kontrolü ve Güvenlik Önlemleri

Seskimustard, oda sıcaklığında oldukça düşük uçuculuğa sahip katı formda bir bileşiktir. Alkali çözeltiler ile hidrolize uğrayarak ve oksitleyici maddelerle oksitlenerek toksik olmayan bozunma ürünlerine dönüştürülebilmektedir. Bu nedenle, uygun güvenlik koşulları sağlandığında, iyi performans gösteren bir kimyasal güvenlik kabini içerisinde güvenli bir şekilde sentezlenebilmektedir. Sentezin hem kimyasal güvenlik kabini hem de sızdırmaz kapalı sistemler içerisinde gerçekleştirilmesi, araştırmacının hem solunum yoluyla maruziyetine karşı hem de olası dökülme ve saçılmalara karşı korunmasını sağlamaktadır. Buna ek olarak, sentez işlemini gerçekleştirecek araştırmacı tarafından uygun kişisel koruyucu donanım kullanılması sağlanmıştır.

Sentez işlemini yürütecek araştırmacılar tarafından aşağıda belirtilen güvenlik koşullarının eksiksiz şekilde yerine getirilmesi zorunlu tutulmuştur:

- Tüm sentez basamakları kimyasal güvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. Tüm sentez işlemleri kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan hiçbir malzeme dekontaminasyon işlemi tamamlanmadan kabin dışına çıkarılmamıştır.
- Sentezde kullanılan tek kullanımlık ekipmanlar ile reaksiyon sonucunda oluşan atıklar, %10'luk potasyum etoksit çözeltisi ile dekontamine edildikten sonra, ilgili kimyasal atık prosedürlerine uygun şekilde bertaraf edilmiştir.
- Kontaminasyon riski taşıyan yüzeyler, önce %5'lik sodyum hipoklorit çözeltisi ile, ardından deterjanlı sıcak su ile silinerek dekontaminasyonu sağlanmıştır.
- Sentezlenen saf Q bileşiği, vidalı kapaklı vial içerisine alınarak, kırılmaya karşı dayanıklı ve sızdırmaz kapaklı ikinci bir kap içinde -20 °C'de muhafaza edilmiştir.
- Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak Q çözeltileri, ön çalışmalarda belirlenmiş olan düşük konsantrasyon aralıklarında hazırlanmış ve kullanılmıştır.
- Hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilen tüm uygulamalar, biyogüvenlik kabini içerisinde yürütülmüş; söz konusu işlemlerin tamamında yukarıda ayrıntıları verilen güvenlik önlemlerinin her biri titizlikle uygulanmıştır.

4. BULGULAR

Bu bölümde, Q bileşiğinin biyolojik hedeflerle oluşturduğu konjugat ve katım ürünlerine ilişkin bulgular sunulacaktır. Yapısal karakterizasyon çalışmaları, iki ayrı deneysel modelde gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, Q'nun GSH ve Cys ile doğrudan kimyasal reaksiyonları sonucu oluşan konjugasyon ürünleri ile Q'ya maruz bırakılmış ctDNA örneklerinden elde edilen DNA katım ürünleri, LC-HRMS ile detaylı biçimde karakterize edilmiştir.

İkinci olarak, HaCaT hücre kültürü modeli kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* Q maruziyeti sonucunda, yapısal karakterizasyonu yapılmış konjugasyon ve katım ürünlerinin biyolojik ortamda oluşumu değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, hücre kültürü ortamında oluşan GSH ve Cys konjugatlarının zaman ve doz bağımlı kinetiği ile analitik izlenebilirliği, DNA katım ürünlerinin ise doz bağımlı oluşumu LC-MS/MS yöntemi ile incelenmiştir.

Elde edilen bulgular, GSH ve Cys konjugatları ile DNA katım ürünleri olmak üzere iki ana grupta ele alınmakta, her bir gruba ilişkin LC-HRMS ve LC-MS/MS analiz sonuçları, aşağıda sunulmaktadır.

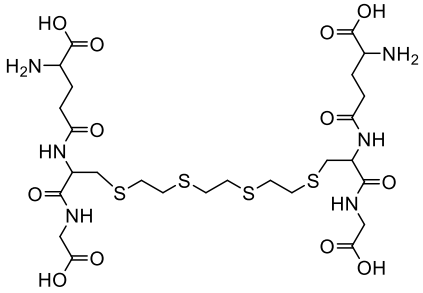
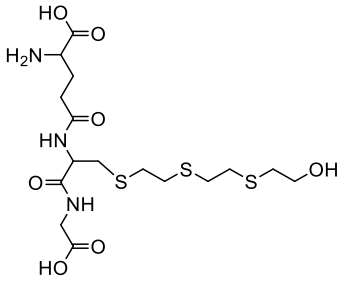
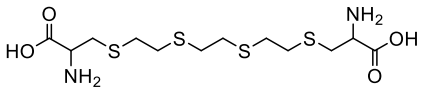
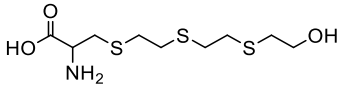
4.1. Q'nun GSH ve Cys ile Reaksiyon Ürünlerinin LC-HRMS ile Tanımlanmasına İlişkin Bulgular

Seskimustardın GSH ve Cys ile doğrudan reaksiyonu sonucunda oluşan konjugatların tanımlanması ve yapısal karakterizasyonunun gerçekleştirilmesi amacıyla, reaksiyon ürünleri hedeflenmemiş bir yaklaşımla LC-HRMS cihazında *full* MS modunda analiz edilmiştir. Teorik olarak öngörülen konjugatlara ait tek protonlanmış moleküler iyonlara ($[M+H]^+$) karşılık gelen monoizotopik kütleler, toplam iyon kromatogramından (TIC) ekstrakte edilerek değerlendirilmiştir. Ekstrakte edilmiş iyon kromatogramlarında (EIC), olası kombinasyonlar arasından dört farklı konjugat yapısı tespit edilmiştir. Bunlar sırasıyla; m/z 761,1973'e karşılık gelen bisglutatyonil etiltiyoetiltiyoetil konjugatı (GSH-ETETE-GSH), m/z 472,1240'a karşılık gelen monoglutatyonil hidroksietiltiyoetiltiyoetil konjugatı (HETETE-GSH), m/z 389,0692'a karşılık gelen bissisteinil etiltiyoetiltiyoetil konjugatı (Cys-ETETE-Cys) ve

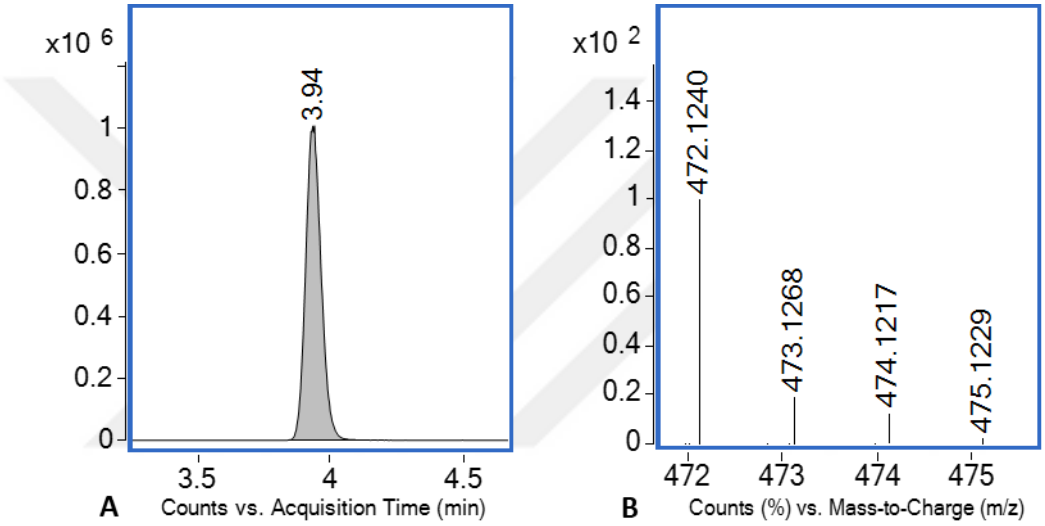
m/z 286,0600'a karşılık gelen monosisteinil hidroksietiltiyoetiltiyoetil konjugatı (HETETE-Cys) olarak tanımlanmıştır.

Tanımlanan bu konjugatlara ait $[M+H]^+$ iyonlarının teorik ve deneysel monoizotopik kütleleri, ilgili kütle hataları ile birlikte moleküler yapıları ve elementel bileşimleri Tablo 4.1'de karşılaştırmalı olarak sunulmaktadır.

Tablo 4.1. Q'nun GSH ve Cys ile oluşturduğu konjugatlara ait moleküler yapılar, elementel bileşimler, teorik ve deneysel $[M+H]^+$ monoizotopik kütle değerleri ile kütle hataları.

Moleküler Yapı	Elementel Bileşim	Teorik Kütle	Deneysel Kütle	Δm (ppm)
 **GSH-ETETE-GSH**	$C_{26}H_{45}N_6O_{12}S_4$	761,1973	761,1973	0,09
 **HETETE-GSH**	$C_{16}H_{30}N_3O_7S_3$	472,1240	472,1240	-0,1
 **Cys-ETETE-Cys**	$C_{12}H_{25}N_2O_4S_4$	389,0692	389,0692	-0,01
 **HETETE-Cys**	$C_9H_{20}NO_3S_3$	286,0600	286,0600	0,14

Seskimustardın GSH ve Cys konjugatlarına ait $[M+H]^+$ iyonlarının monoizotopik kütleleri, maksimum 0,14 ppm olan düşük kütle hataları ile ölçülmüştür. Ayrıca, teorik olarak hesaplanan izotopik piklerin tamamı deneysel spektrumlarda tespit edilmiştir. Konjugatlara ait izotopik dağılımlar, teorik dağılımlarla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş olup ilgili veriler HETETE-GSH için Tablo 4.2'de, GSH-ETETE-GSH için Tablo 4.3'te, HETETE-Cys için Tablo 4.4'te ve Cys-ETETE-Cys için 4.5'te sunulmuştur. $[M+H]^+$ iyonlarına ait EIC ve kütle spektrumları ise Şekil 4.1- 4.4'te yer almaktadır.



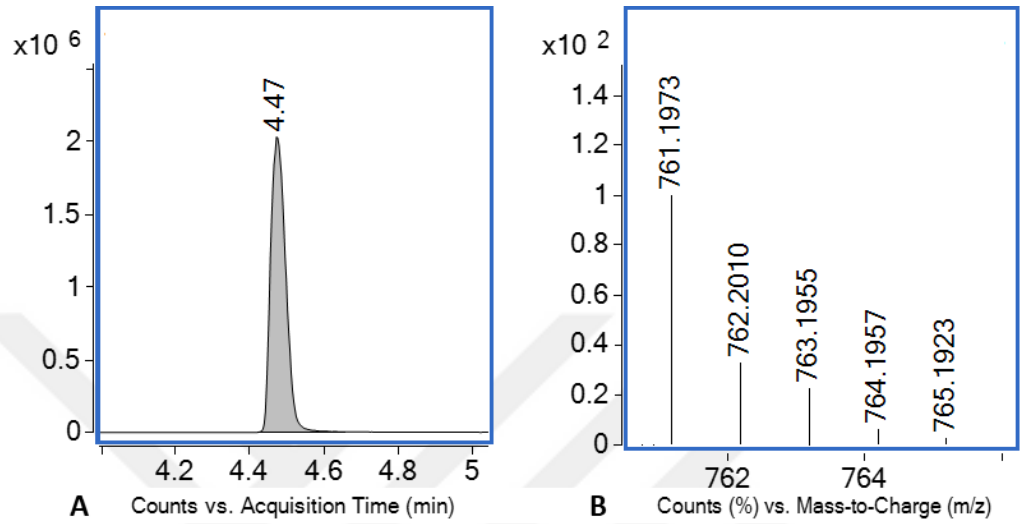
Şekil 4.1. HETETE-GSH'ye ait m/z 472,1240 için EIC (A) ve bu yapıya ait LC-HRMS spektrumunda gözlenen izotopik pik dağılımı (B).

Tablo 4.2. HETETE-GSH'ye ait monoizotopik iyon ve izotopik bileşenlerine ilişkin teorik ve deneysel m/z değerleri, bağıl bolluk yüzdeleri ve kütle hataları.

Teorik Kütle	Deneysel Kütle	%Bağıl Bolluk (Teorik)	%Bağıl Bolluk (Deneysel)	Δm (ppm)
472,1240	472,1240	100	100	-0,1
472,1267	473,1268	21,38	19	0,19
474,1218	474,1217	17,04	12,49	-0,17
475,1238	475,1229	3,21	2,06	-1,93

HETETE-GSH konjugatına ait monoizotopik $[M+H]^+$ iyonunun teorik ve deneysel m/z değeri 472,1240 olarak belirlenmiştir. Bu yapıya ait izotopik dağılımda, m/z 473,1268, 474,1217 ve 475,1229 değerlerine karşılık gelen izotop pikleri deneysel spektrumda gözlenmiştir. Söz konusu piklerin bağıl yoğunlukları sırasıyla %19, %12,49

ve %2,06 olarak ölçülmüş; bu değerler teorik bağıl bolluklarla karşılaştırıldığında kütle sapmaları sırasıyla 0,19 ppm, -0,17 ppm ve -1,93 ppm olarak hesaplanmıştır. Aynı izotoplara ait bağıl bolluk yüzdeleri üzerinden hesaplanan farklar ise sırasıyla %2,38, %4,55 ve %1,15 olarak belirlenmiştir.



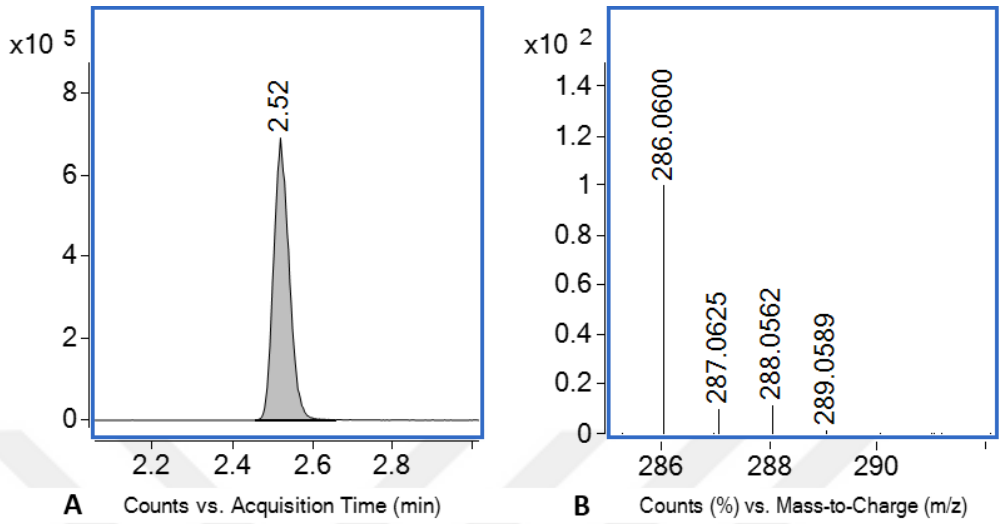
Şekil 4.2. GSH-ETETE-GSH'ye ait m/z 761,1973 için EIC (A) ve bu yapıya ait LC-HRMS spektrumunda gözlenen izotopik pik dağılımı (B).

Tablo 4.3. GSH-ETETE-GSH'ye ait monoizotopik iyon ve izotopik bileşenlerine ilişkin teorik ve deneysel m/z değerleri, bağıl bolluk yüzdeleri ve kütle hataları.

Teorik Kütle	Deneysel Kütle	%Bağıl Bolluk (Teorik)	%Bağıl Bolluk (Deneysel)	Δm (ppm)
761,1973	761,1973	100	100	0,09
762,1999	762,2010	34,45	32,65	1,43
763,1960	763,1955	26,13	22,73	-0,59
764,1975	764,1957	7,5	6,15	-2,44
765,1949	765,1923	2,89	2,33	3,40

GSH-ETETE-GSH konjugatına ait monoizotopik $[M+H]^+$ iyonunun teorik ve deneysel m/z değeri 761,1973 olarak belirlenmiştir. Bu yapıya ait izotopik dağılımda, m/z 762,2010, 763,1955, 764,1957 ve 765,1923 değerlerine karşılık gelen izotop pikleri deneysel spektrumda gözlenmiştir. İlgili izotopların bağıl yoğunlukları sırasıyla %32,65; %22,73; %6,15 ve %2,33 olarak ölçülmüştür. Bu değerlere karşılık gelen kütle sapmaları sırasıyla 1,43 ppm, -0,59 ppm, -2,44 ppm ve 3,40 ppm olarak

hesaplanmıştır. Aynı izotoplara ait bağıl bolluk yüzdeleri üzerinden hesaplanan farklar ise sırasıyla %1,18, %3,4, %1,35 ve %0,56 olarak belirlenmiştir.

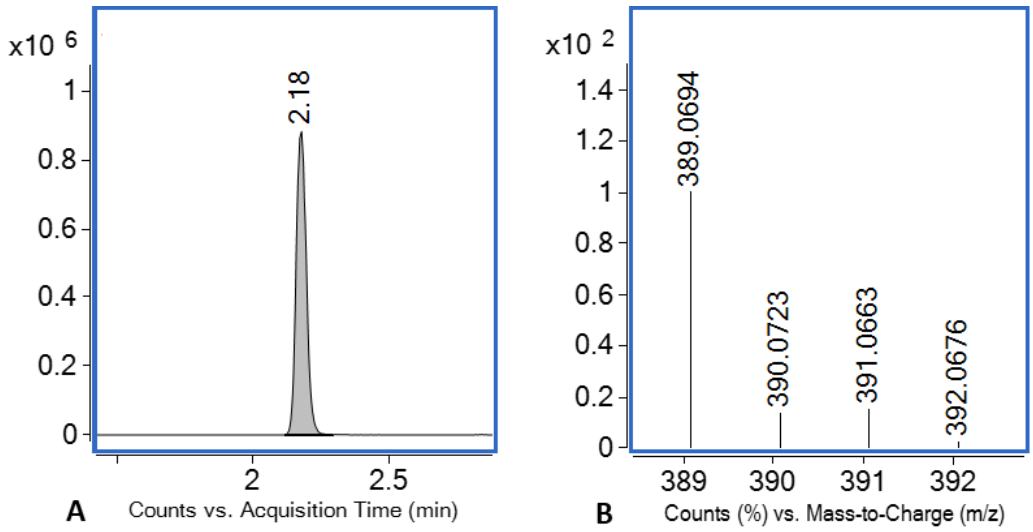


Şekil 4.3. HETETE-Cys'ye ait m/z 286,0600 için EIC (A) ve bu yapıya ait LC-HRMS spektrumunda gözlenen izotopik pik dağılımı (B).

Tablo 4.4. HETETE-Cys'ye ait monoizotopik iyon ve izotopik bileşenlerine ilişkin teorik ve deneysel m/z değerleri, bağıl bolluk yüzdeleri ve kütle hataları.

Teorik Kütle	Deneysel Kütle	%Bağıl Bolluk (Teorik)	%Bağıl Bolluk (Deneysel)	Δm (ppm)
286,0600	286,0600	100	100	0,14
287,0625	287,0625	12,81	10,07	-0,01
288,0566	288,0562	14,8	11,54	-1,52
289,0590	289,0589	1,72	1,34	-0,35

HETETE-Cys konjugatına ait monoizotopik $[M+H]^+$ iyonunun teorik ve deneysel m/z değeri 286,0600 olarak belirlenmiştir. Bu yapıya ait izotopik dağılımda, m/z 287,0625, 288,0562 ve 289,0589 değerlerine karşılık gelen izotop pikleri deneysel spektrumda gözlenmiştir. İlgili izotopların bağıl yoğunlukları sırasıyla %10,07; %11,54 ve %1,34 olarak ölçülmüştür. Bu değerlere karşılık gelen kütle sapmaları sırasıyla -0,01 ppm, -1,52 ppm ve -0,35 ppm olarak hesaplanmıştır. Aynı izotoplara ait bağıl bolluk yüzdeleri üzerinden hesaplanan farklar ise sırasıyla %2,74; %3,26 ve %0,38 olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Cys-ETETE-Cys'ye ait m/z 286,0600 için EIC (A) ve bu yapıya ait LC-HRMS spektrumunda gözlenen izotopik pik dağılımı (B).

Tablo 4.5. Cys-ETETE-Cys'ye ait monoizotopik iyon ve izotopik bileşenlerine ilişkin teorik ve deneysel m/z değerleri, bağıl bolluk yüzdeleri ve kütle hataları.

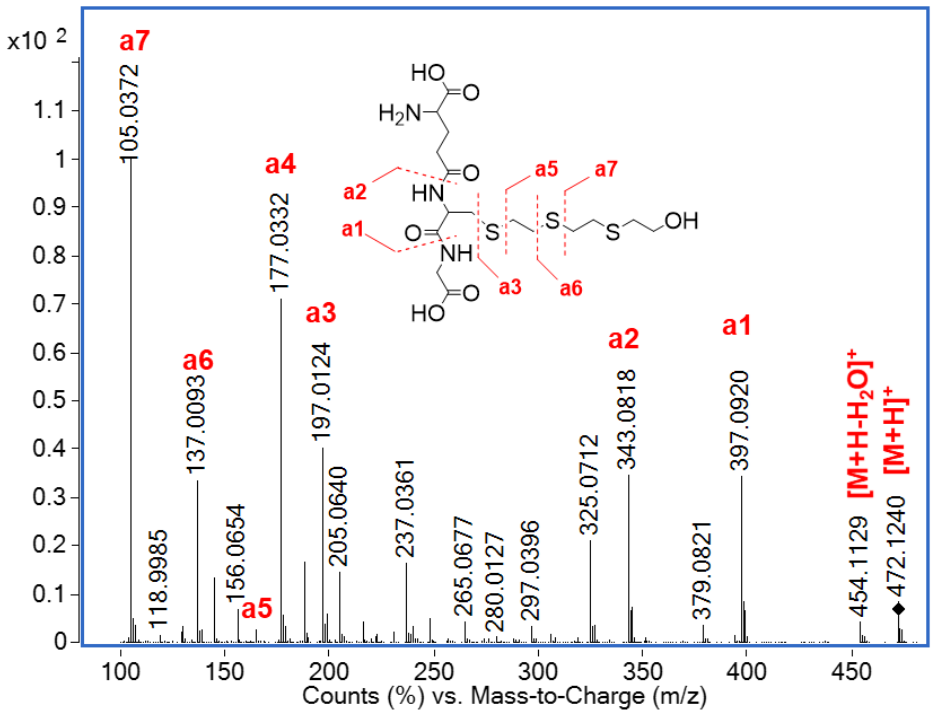
Teorik Kütle	Deneysel Kütle	%Bağıl Bolluk (Teorik)	%Bağıl Bolluk (Deneysel)	Δm (ppm)
389,0692	389,0692	100	100	-0,01
390,0716	390,0717	17,31	14,23	0,27
391,0659	391,0661	20,13	15,25	0,45
392,0681	392,674	3,17	2,04	-1,76

Cys-ETETE-Cys konjugatına ait monoizotopik $[M+H]^+$ iyonunun teorik ve deneysel m/z değeri 389,0692 olarak belirlenmiştir. Bu yapıya ait izotopik dağılımda, m/z 390,0717, 391,0661 ve 392,0674 değerlerine karşılık gelen izotop pikleri deneysel spektrumda gözlenmiştir. İlgili izotopların bağıl yoğunlukları sırasıyla %14,23, %15,25 ve %2,04 olarak ölçülmüş; bu değerlere karşılık gelen kütle sapmaları sırasıyla 0,34 ppm, 0,45 ppm ve -1,76 ppm olarak hesaplanmıştır. Aynı izotoplara ait bağıl bolluk yüzdeleri üzerinden hesaplanan farklar ise sırasıyla %3,08, %4,88 ve %1,13 olarak belirlenmiştir.

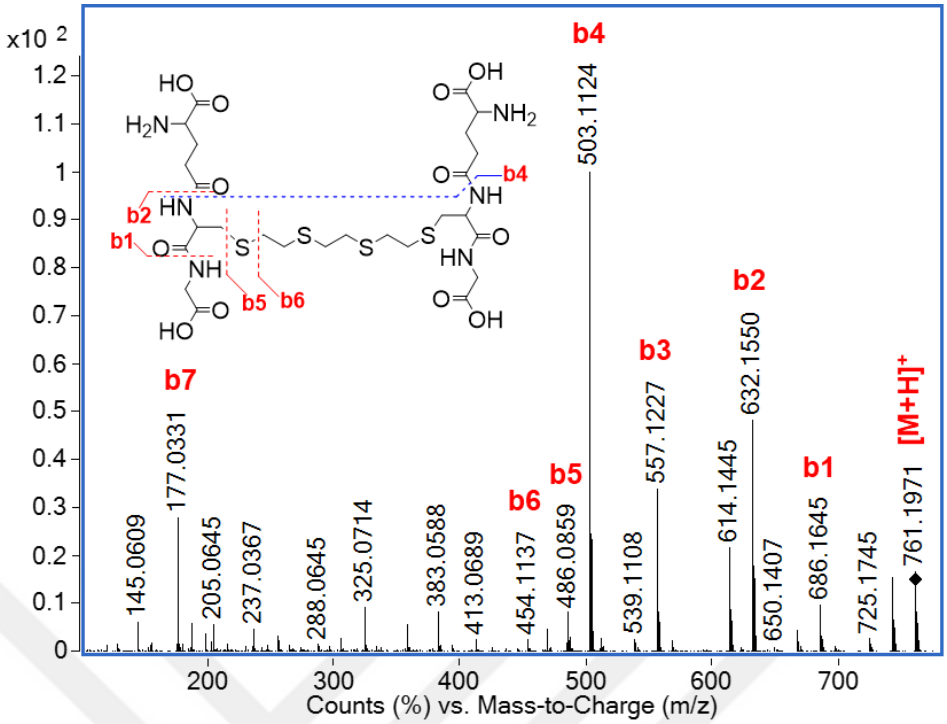
Ayrıca, her bir konjugat için elde edilen EIC'lerde hedef m/z değerlerine karşılık gelen tek, simetrik ve keskin piklerin bulunması, analitlerin yüksek saflıkta olduğunu ve izobarik girişimlerden arındırılmış bir şekilde tayin edildiklerini göstermektedir.

Full MS modunda tanımlanan konjugatların yapısal karakterizasyonunu desteklemek amacıyla çalışmanın bir diğer aşamasında, bu moleküllerin fragmantasyon profilleri hedeflenmiş MS/MS (*targeted* MS/MS) analizleri ile değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, Q'nun GSH ve Cys ile doğrudan kimyasal reaksiyonları sonucunda oluşan konjugasyon ürünleri, LC-HRMS sisteminde *targeted* MS/MS modunda analiz edilmiştir. Önceki *full* MS taramalarında elde edilen öncü iyonların m/z değerleri ve alıkonma süreleri dikkate alınarak bir dahil etme listesi (*inclusion list*) oluşturulmuştur. Her öncü iyon yalnızca belirlenen alıkonma süresi aralığında seçici olarak taranmıştır. Bu yaklaşım, arka plan iyonlarının interferansını en aza indirerek yöntemin seçiciliğini ve analitik duyarlılığını artırmıştır. Elde edilen yüksek çözünürlüklü ürün iyon spektrumları *(Product Ion Spectra, PIS)* üzerinden parçalanma yolları yorumlanmış ve elde edilen fragman iyonları yardımıyla konjugatların yapılarına ilişkin ayrıntılı bilgiler elde edilmiştir.

Şekil 4.5'te GSH-ETETE-GSH'ye ait ve Şekil 4.6'da HETETE-GSH'ye ait PIS'ler, sırasıyla 30 ve 20 elektronvolt (eV) CE kullanılarak elde edilmiştir. Her iki spektrumda da karakteristik fragman iyonlar etiketlenmiş ve ilgili molekül yapıları üzerinde olası parçalanma yolları gösterilmiştir.



Şekil 4.5. HETETE-GSH'ye ait PIS.



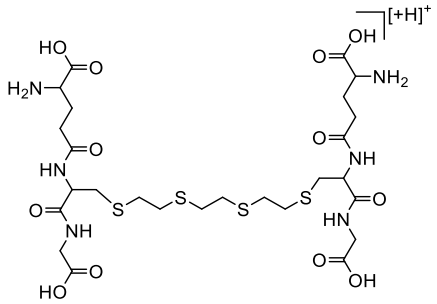
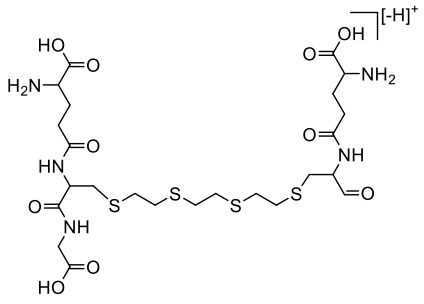
Şekil 4.6. GSH-ETETE-GSH'ye ait PIS.

Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da gösterildiği gibi, a1 ve b1 iyonları nötral glisin kaybından kaynaklanan iyonlara karşılık gelirken, a2 ve b2 iyonları nötral piroglutamik asit kaybından kaynaklanmaktadır. Ayrıca a3 ve b5 iyonları $[M+H]^{+}$'dan bir glutamik asit-alanin-glisin (glu-ala-glc) parçasının nötral kaybı sonucu oluşan iyona karşılık gelirken, a5 (m/z 165.1403) ve b6 iyonları GSH'nin nötral kaybı sonucu oluşan iyona karşılık gelmektedir. Her iki konjugat da sisteinilglisinden kaynaklanan spesifik bir parçalanma ürün iyonu gösterir ve spektrumlarda a4 ve b7 olarak etiketlenmiştir. Ayrıca, GSH-ETETE-GSH birden fazla nötral kayıp sergilemektedir. b4 iyonu iki piroglutamik asidin nötral kaybından, b3 iyonu ise bir glisin ve bir piroglutamik asidin nötral kaybından kaynaklanan iyonlardır.

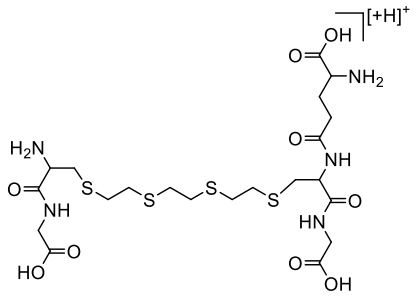
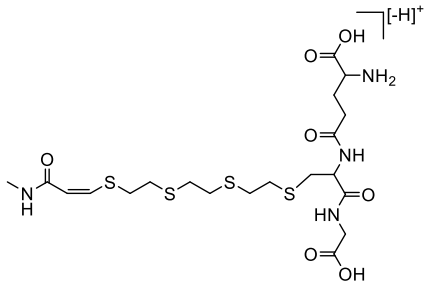
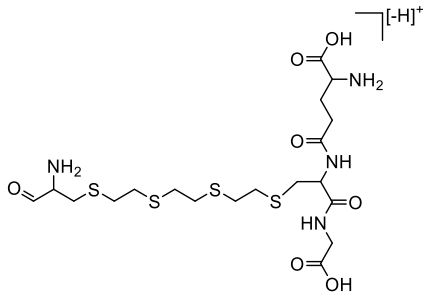
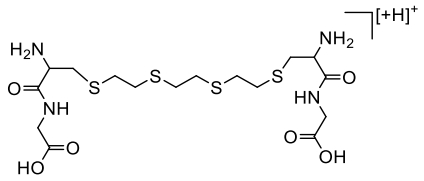
Bunlara ek olarak, Şekil 4.6'da HETETE-GSH'ye ait ürün iyon spektrumunda yer alan a3, a5, a6 ve a7 iyonları molekülün tiyolakil zinciriyle ilişkilidir. a3 iyonu, sistein yapısındaki sülfür atomunu da içeren HETETE-S bölümüne karşılık gelmektedir. a5 iyonu HETETE kısmını temsil etmektedir. a6 iyonu bitişik sülfür atomu ile birlikte HETE-S yapısına, a7 iyonu ise HETE yapısına karşılık gelmektedir.

Tablo 4.6 ve Tablo 4.7, sırasıyla GSH-ETETE-GSH ve HETETE-GSH konjugatlarına ait ürün iyonlarının yapılarına ilişkin ayrıntılı bilgileri içermektedir. Her bir ürün iyonu için kimyasal yapılar, elementel bileşimler, deneysel olarak ölçülen ve teorik olarak hesaplanan m/z değerleri ile bu değerler arasındaki hataları tablo üzerinde sunulmuştur. Ayrıca moleküler iyonlar $[M+H]^+$ ve ilgili nötral kayıplar sonucunda meydana gelen parçalanma ürünleri tablo üzerinde ayrı ayrı gösterilmiştir. Ayrıca nötral kayıplar sonucunda oluşan ürün iyonları, spektrumlarda gözlenen karakteristik kırılma noktaları ile uyumlu olarak tabloya dahil edilmiştir.

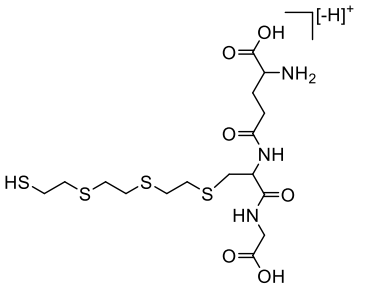
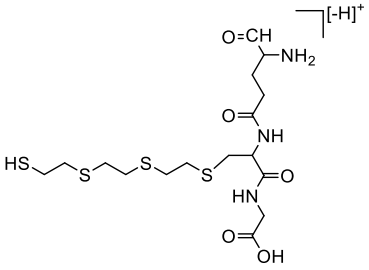
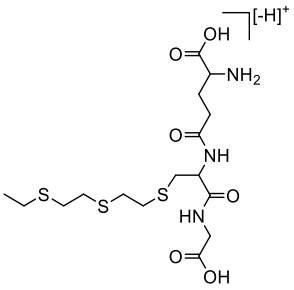
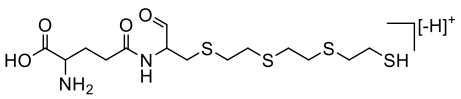
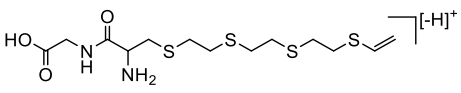
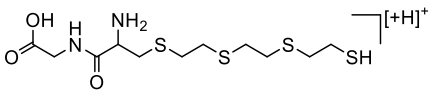
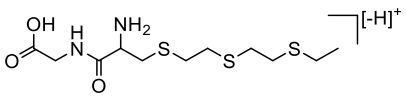
Tablo 4.6. GSH-ETETE-GSH'ye ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları.

Moleküler Yapı	Elementel Bileşim	Teorik Kütle	Deneysel Kütle	Δm (ppm)
 **$[M+H]^+$**	$C_{26}H_{45}N_6O_{12}S_4$	761,1973	761,1971	-0,25
$[M+H-H_2O]^+$	$C_{26}H_{43}N_6O_{11}S_4$	743,1867	743,1867	-0,01
$[M+H-2H_2O]^+$	$C_{26}H_{41}N_6O_{10}S_4$	725,1762	725,1745	-2,28
 **b1**	$C_{24}H_{40}N_5O_{10}S_4$	686,1653	686,1645	-1,06
$[b1-H_2O]^+$	$C_{24}H_{38}N_5O_9S_4$	668,1547	668,1536	-1,65

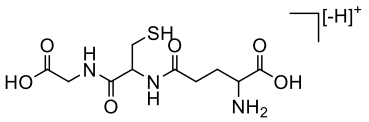
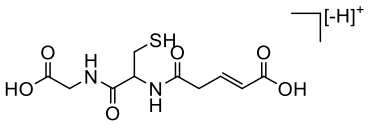
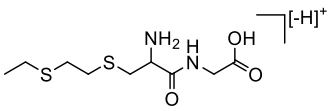
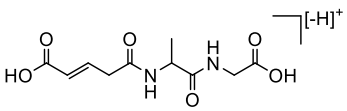
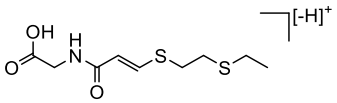
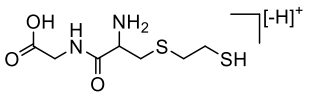
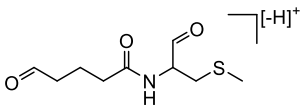
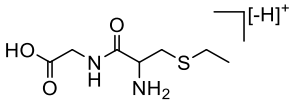
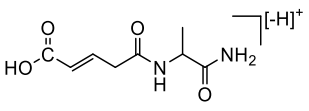
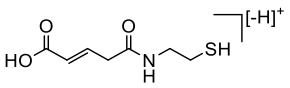
Tablo 4.6. (Devam) GSH-ETETE-GSH'ye ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları.

Moleküler Yapı	Elementel Bileşim	Teorik Kütle	Deneysel Kütle	Δm (ppm)
	$C_{21}H_{38}N_5O_9S_4$	632,1547	632,1550	0,43
[b2-H_2O]$^+$	$C_{21}H_{36}N_5O_8S_4$	614,1441	614,1445	0,63
	$C_{20}H_{33}N_4O_7S_4$	569,1227	569,1221	-1,07
 **b3**	$C_{19}H_{33}N_4O_7S_4$	557,1227	557,1227	0,03
[b3-H_2O]$^+$	$C_{19}H_{31}N_4O_6S_4$	539,1121	539,1108	-2,34
 **b4**	$C_{16}H_{31}N_4O_6S_4$	503,1121	503,1124	0,69

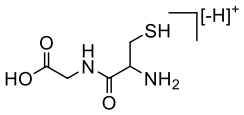
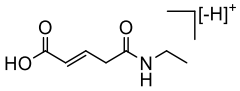
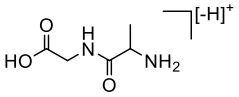
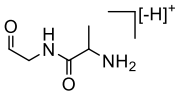
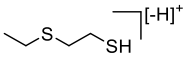
Tablo 4.6. (Devam) GSH-ETETE-GSH'ye ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları.

Moleküler Yapı	Elementel Bileşim	Teorik Kütle	Deneysel Kütle	Δm (ppm)
 **b5**	$C_{16}H_{28}N_3O_6S_4$	486,0855	486,0859	0,78
	$C_{16}H_{28}N_3O_5S_4$	470,0906	470,0911	1,06
 **b6**	$C_{16}H_{28}N_3O_5S_3$	454,1135	454,1137	0,49
	$C_{14}H_{25}N_2O_4S_4$	413,0692	413,0689	-0,65
	$C_{13}H_{23}N_2O_3S_4$	383,0586	383,0588	0,44
	$C_{11}H_{23}N_2O_3S_4$	359,0586	359,0593	1,91
	$C_{11}H_{21}N_2O_3S_3$	325,0709	325,0714	1,60

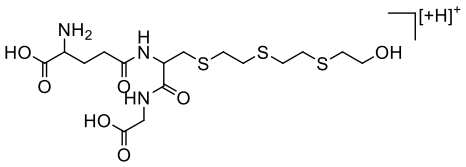
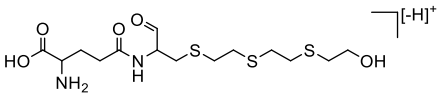
Tablo 4.6. (Devam) GSH-ETETE-GSH'ye ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları.

Moleküler Yapı	Elementel Bileşim	Teorik Kütle	Deneysel Kütle	Δm (ppm)
	$C_{10}H_{16}N_3O_6S$	306,0754	306,0756	0,55
	$C_{10}H_{13}N_2O_6S$	289,0489	289,0487	-0,74
	$C_9H_{17}N_2O_3S_2$	265,0675	265,0688	4,73
	$C_{10}H_{13}N_2O_6$	257,0768	257,0772	1,65
	$C_9H_{14}NO_3S_2$	248,0410	248,0409	-0,22
	$C_7H_{13}N_2O_3S_2$	237,0362	237,0367	2,00
	$C_9H_{14}NO_3S$	216,0689	216,0680	-3,92
	$C_7H_{13}N_2O_3S$	205,0641	205,0645	1,66
	$C_8H_{11}N_2O_4$	199,0713	199,0710	-1,53
	$C_7H_{10}NO_3S$	188,0376	188,0379	1,48

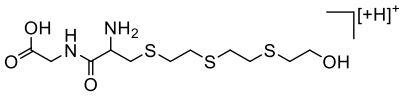
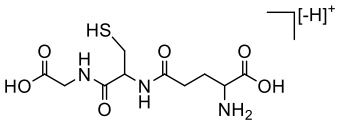
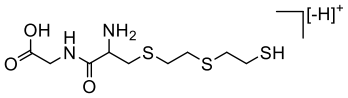
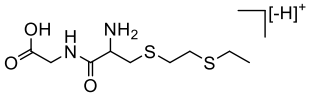
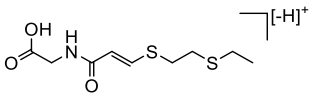
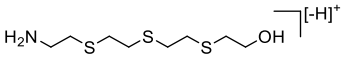
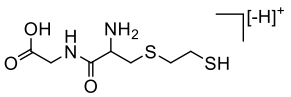
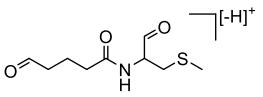
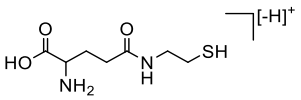
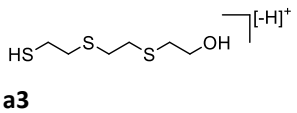
Tablo 4.6. (Devam) GSH-ETETE-GSH'ye ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları.

Moleküler Yapı	Elementel Bileşim	Teorik Kütle	Deneysel Kütle	Δm (ppm)
 **b7**	$C_5H_9N_2O_3S$	177,0328	177,0331	1,67
	$C_7H_{10}NO_3$	156,0655	156,0661	3,59
	$C_5H_9N_2O_3$	145,0608	145,0609	0,90
	$C_5H_9N_2O_2$	129,0659	129,0657	-0,89
	$C_4H_9S_2$	121,0140	121,0142	1,88

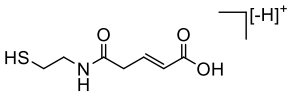
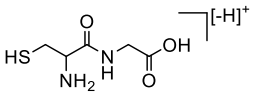
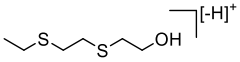
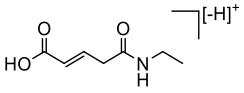
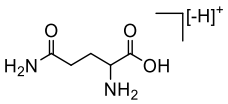
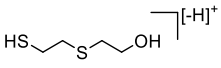
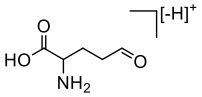
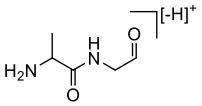
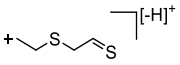
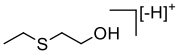
Tablo 4.7. HETETE-GSH'ye ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları.

Moleküler Yapı	Elementel Bileşim	Teorik Kütle	Deneysel Kütle	Δm (ppm)
 **$[M+H]^+$**	$C_{16}H_{30}N_3O_7S_3$	472,1240	472,1240	-0,19
$[M+H-H_2O]^+$	$C_{16}H_{28}N_3O_6S_3$	454,1135	454,1129	-1,35
 **a1**	$C_{14}H_{25}N_2O_5S_3$	397,0920	397,0920	-0,03
$[a1-H_2O]^+$	$C_{14}H_{23}N_2O_4S_3$	379,0815	379,0821	1,72

Tablo 4.7.(Devam) HETETE-GSH'ye ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları.

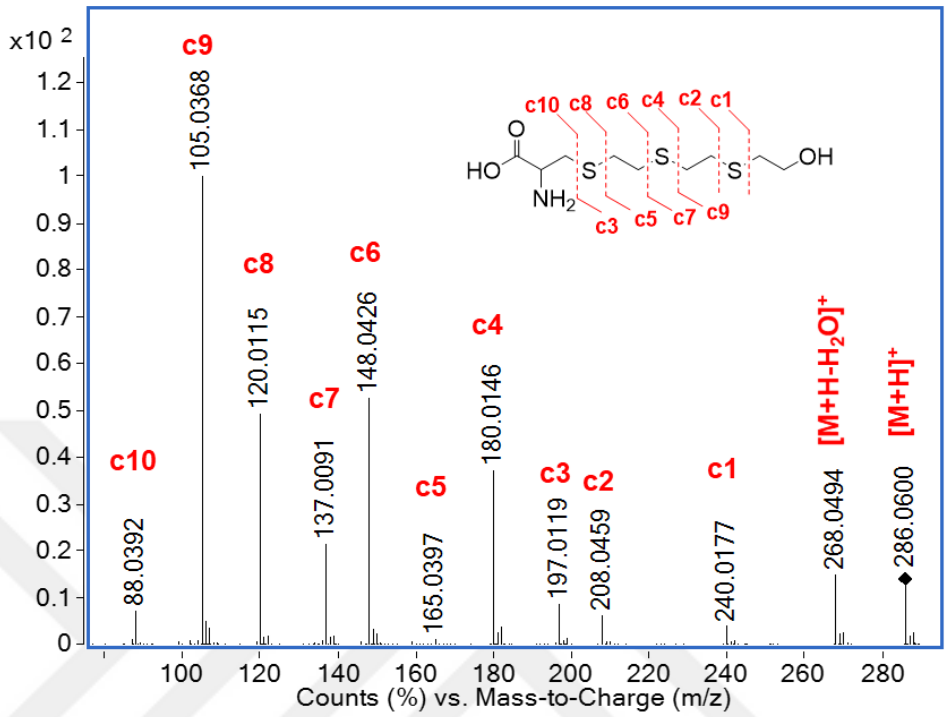
Moleküler Yapı	Elementel Bileşim	Teorik Kütle	Deneysel Kütle	Δm (ppm)
 **a2**	$C_{11}H_{23}N_2O_4S_3$	343,0815	343,0818	1,13
$[a2\text{-}H_2O]^+$	$C_{11}H_{21}N_2O_3S_3$	325,0709	325,0712	0,94
	$C_{10}H_{16}N_3O_6S$	306,0754	306,0749	-1,88
	$C_9H_{17}N_2O_3S_3$	297,0396	297,0396	0,12
	$C_9H_{17}N_2O_3S_2$	265,0675	265,0677	0,57
	$C_8H_{14}N_3O_4S$	248,0410	248,0406	-1,27
	$C_8H_{18}NOS_3$	240,0545	240,0548	1,44
	$C_7H_{13}N_2O_3S_2$	237,0362	237,0361	-0,40
	$C_9H_{14}NO_3S$	216,0689	216,0684	-2,31
	$C_7H_{13}N_2O_3S$	205,0641	205,0640	-0,77
 **a3**	$C_6H_{13}OS_3$	197,0123	197,0124	0,35

Tablo 4.7. (Devam) HETETE-GSH'ye ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları.

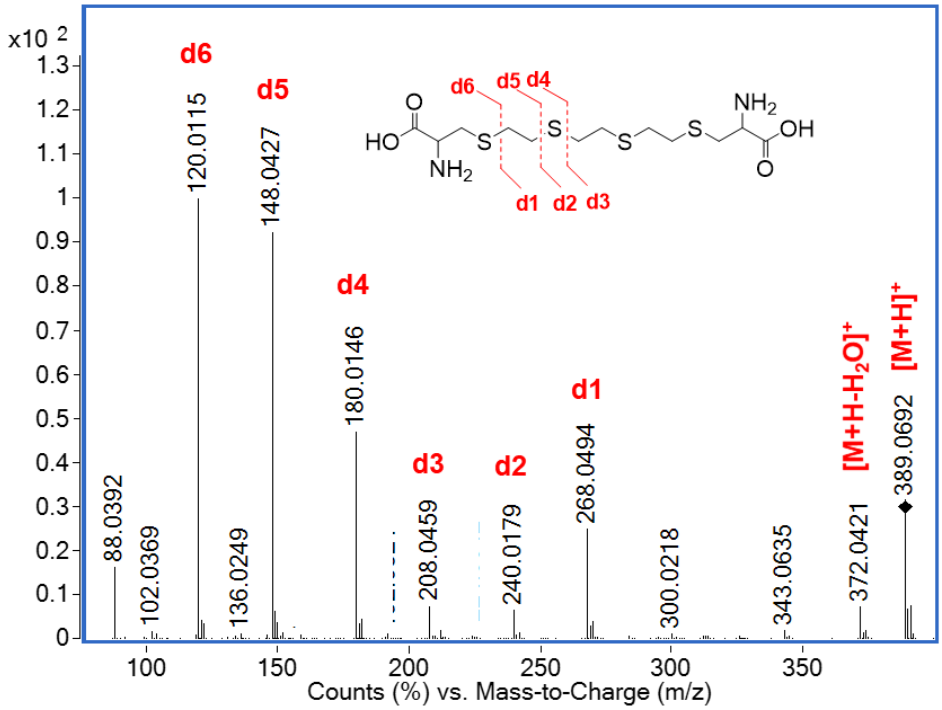
Moleküler Yapı	Elementel Bileşim	Teorik Kütle	Deneysel Kütle	Δm (ppm)
	$C_7H_{10}NO_3S$	188,0376	188,0378	1,24
 **a4**	$C_5H_9N_2O_3S$	177,0328	177,0332	1,95
 **a5**	$C_6H_{13}OS_2$	165,0402	165,0403	0,30
	$C_7H_{10}NO_3$	156,0655	156,0654	-0,49
	$C_5H_9N_2O_3$	145,0608	145,0612	2,84
	$C_4H_9OS_2$	137,0089	137,0093	2,74
	$C_5H_8NO_3$	130,0499	130,0502	2,21
	$C_5H_9N_2O_2$	129,0659	129,0661	1,74
	$C_4H_7S_2$	118,9984	118,9985	1,23
	C_4H_9OS	105,0369	105,0372	3,61

Cys-ETETE-Cys ve HETETE-Cys konjugatlarına ait PIS'ler, sırasıyla 18 eV ve 12 eV çarpışma enerjileriyle elde edilmiştir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). Spektrumlarda tanımlanan ayırt edici ürün iyonları etiketlenmiş ve moleküllerin yapıları üzerinde karşılık geldikleri parçalanma noktaları belirtilmiştir. Her iki konjugat için de elde

edilen spektrumlar, moleküler yapıların parçalanma davranışlarını ve iyon oluşum yollarını yansıtan bilgiler içermektedir.



Şekil 4.7. HETETE-Cys'ye ait PIS.



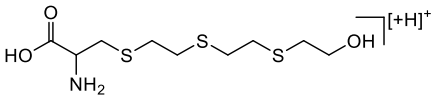
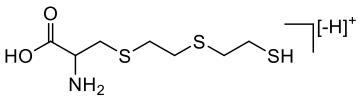
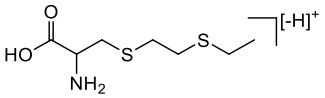
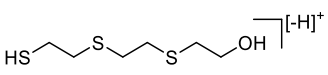
Şekil 4.8. Cys-ETETE-Cys'ye ait PIS.

Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de Q'nun Cys konjugatlarına ait ürün iyon spektrumlarında yer alan c5 ve d1 iyonları, ana molekülden sistein nötral kaybı sonucu oluşan fragmanlara karşılık gelmektedir. GSH konjugatları ile karşılaştırıldığında, Cys konjugatlarının fragmantasyon profili daha sınırlı sayıda ürün iyonu içermektedir. Her iki spektrumda da gözlenen parçalanmaların büyük ölçüde C–S bağlarının ayrılmasıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir.

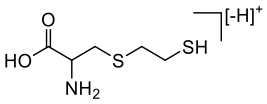
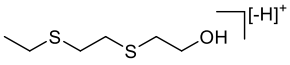
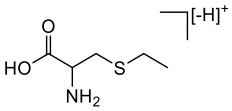
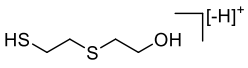
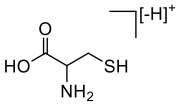
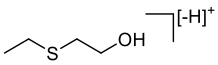
Buna ek olarak, Şekil 4.7'de HETETE-Cys'ye ait ürün iyon spektrumunda yer alan c3, c5, c7 ve c9 iyonları, molekülün tiyolakil zincirine karşılık gelmektedir. c_3 iyonu, sistein yapısındaki sülfür atomunu da içeren HETETE-S kısmını temsil etmektedir. c_5 iyonu HETETE yapısına, c_7 iyonu bitişik sülfür atomuyla birlikte HETE-S bölümüne, c_9 iyonu ise HETE yapısına karşılık gelmektedir.

Tablo 4.8 ve Tablo 4.9, sırasıyla HETETE-Cys ve Cys-ETETE-Cys konjugatlarına ait ürün iyonlarının kütle spektrometrik özelliklerini içermektedir. Her bir ürün iyonu için teorik ve deneysel m/z değerleri, kütle hataları, elementel bileşimler ve iyonların yapısal bilgileri tablo halinde sunulmuştur. Tanımlanan iyonlar, ilgili spektrumlarda gözlenen fragmantasyon modelleri ile uyumlu olacak şekilde sınıflandırılmıştır.

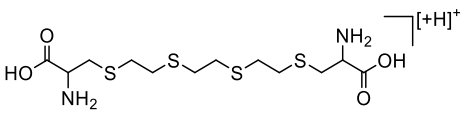
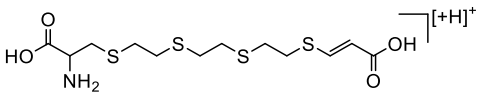
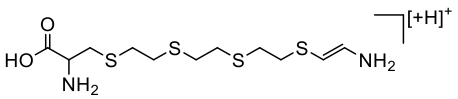
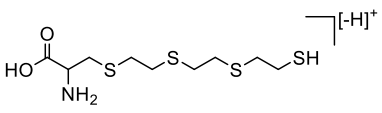
Tablo 4.8. Cys-HETETE'ye ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları.

Moleküler Yapı	Elementel Bileşim	Teorik Kütle	Deneysel Kütle	Δm (ppm)
 **$[M+H]^+$**	$C_9H_{20}NO_3S_3$	286,0600	286,0600	0,01
$[M+H-H_2O]^+$	$C_9H_{18}NO_2S_3$	268,0494	268,0494	-0,02
	$C_7H_{14}NO_2S_3$	240,0181	240,0177	-1,62
	$C_7H_{14}NO_2S_2$	208,0460	208,0459	-0,52
	$C_6H_{13}OS_3$	197,0123	197,0119	-2,07

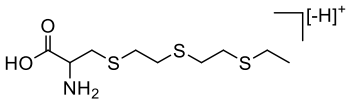
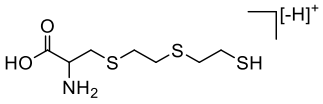
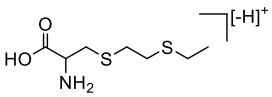
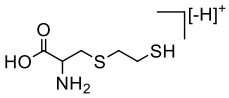
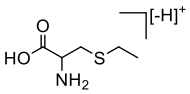
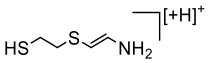
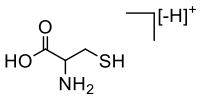
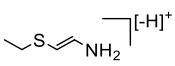
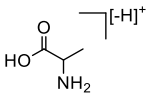
Tablo 4.8. (Devam) Cys-HETETE'ye ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları.

Moleküler Yapı	Elementel Bileşim	Teorik Kütle	Deneysel Kütle	Δm (ppm)
	$C_5H_{10}NO_2S_2$	180,0147	180,0146	-0,69
	$C_6H_{13}OS_2$	165,0402	165,0397	-3,34
	$C_5H_{10}NO_2S$	148,0427	148,0426	-0,44
	$C_3H_6NO_2S$	137,0089	137,0091	0,94
	$C_4H_9OS_2$	120,0114	120,0115	1,38
	C_4H_9OS	105,0369	105,0368	-0,12

Tablo 4.9. Cys-ETETE-Cys'ye ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları.

Moleküler Yapı	Elementel Bileşim	Teorik Kütle	Deneysel Kütle	Δm (ppm)
 **$[M+H]^+$**	$C_{12}H_{25}N_2O_4S_4$	389,0692	389,0692	0,17
	$C_{12}H_{22}NO_4S_4$	372,0426	372,0421	-1,45
	$C_{11}H_{23}N_2O_2S_4$	343,0637	343,0635	-0,45
	$C_9H_{18}NO_2S_4$	300,0215	300,0218	1,17

Tablo 4.9. (Devam) Cys-ETETE-Cys'ye ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları.

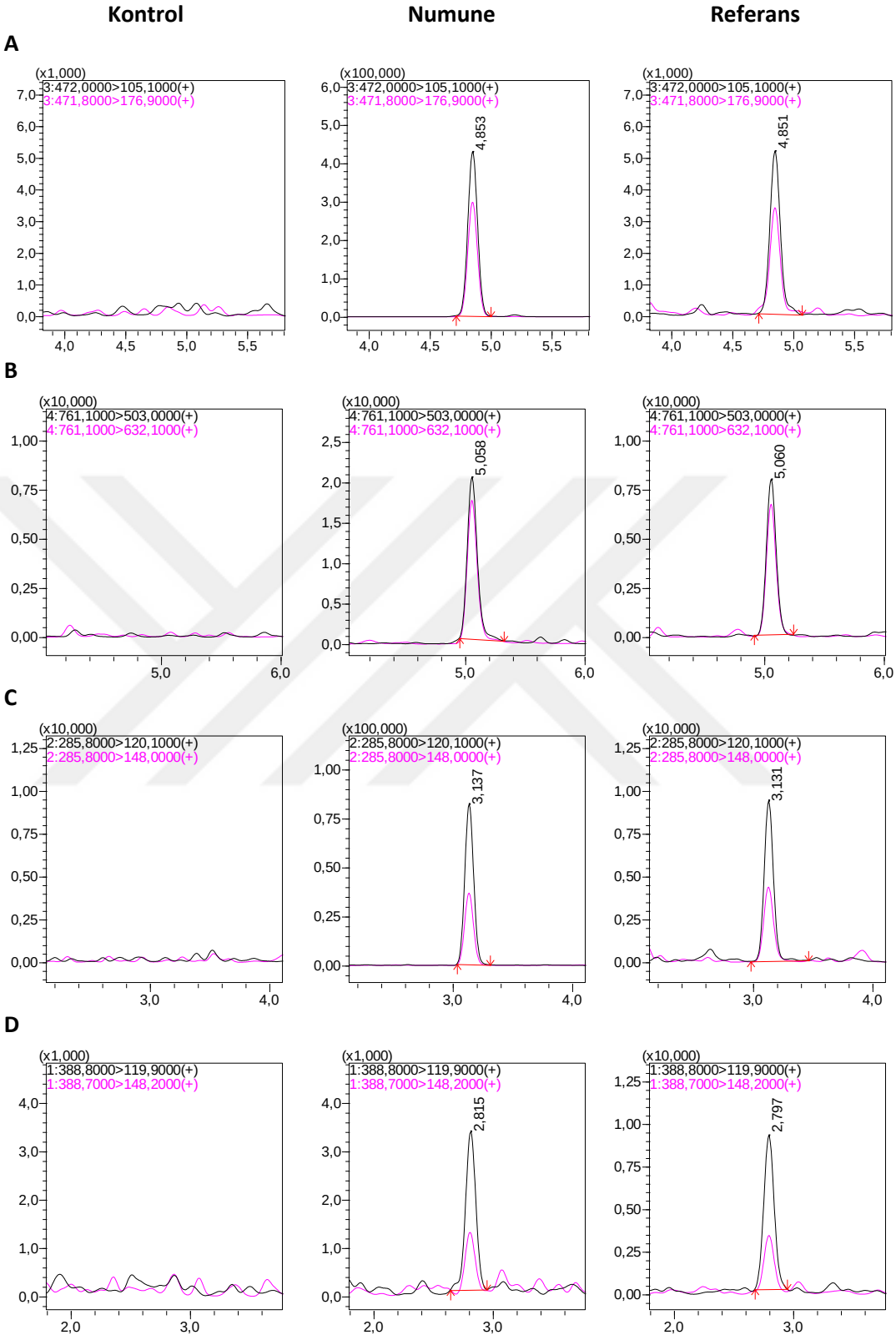
Moleküler Yapı	Elementel Bileşim	Teorik Kütle	Deneysel Kütle	Δm (ppm)
	$C_9H_{18}NO_2S_3$	268,0494	268,0494	-0,08
	$C_7H_{14}NO_2S_3$	240,0181	240,0179	-0,92
	$C_7H_{14}NO_2S_2$	208,0460	208,0459	-0,93
	$C_5H_{10}NO_2S_2$	180,0146	180,0146	-0,78
	$C_5H_{10}NO_2S$	148,0426	148,0427	-0,11
	$C_4H_{10}NS_2$	136,0249	136,0249	-0,09
	$C_3H_6NO_2S$	120,0116	120,0115	0,73
	C_4H_8NS	102,0372	102,0369	-2,51
	$C_3H_6NO_2$	88,0393	88,0392	-1,17

Sekskihardalın GSH ve Cys konjugatlarının targeted MS/MS analizlerinden elde edilen veriler doğrultusunda hazırlanan bu tablolarda görüleceği üzere her bir iyon için hesaplanan kütle hatası her zaman ±5 ppm aralığında kalmıştır.

4.2. HaCaT Hücre Kültüründe Q'nun GSH ve Cys Konjugatlarının Tespiti Belirlenmesine İlişkin Bulgular

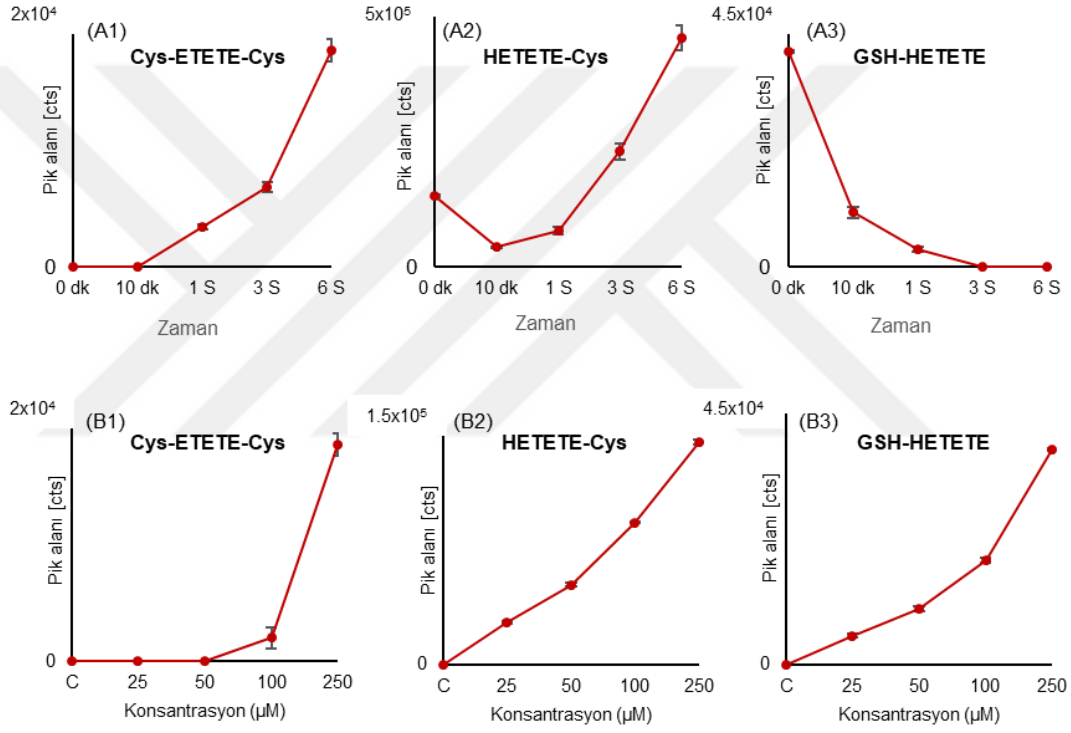
Yapısal doğrulamaları LC–HRMS analizleriyle gerçekleştirilen GSH ve Cys konjugatları, LC–MS/MS sisteminde MRM modunda yürütülen analizler için referans olarak kullanılmıştır. Optimize edilen yöntemde, her bir analitin öncü iyonundan türeyen, karakteristik ve en bol ürün iyonları ESI yöntemi ile izlenmiştir. Elde edilen MRM kromatogramlarında arka plan sinyal düzeyi düşük bulunmuş ve kontrol örneklerinde hiçbir konjugat tespit edilmemiştir. Tanımlanan dört konjugatın tamamının aynı anda yalnızca 250 µM Q'ya 30 dakika süreyle maruz bırakılan HaCaT hücrelerinin lizatlarında tespit edilmiştir. Şekil 4.9'da 250 µM Q'ya 30 dakika süreyle maruz kalan HaCaT hücrelerinde tespit edilen konjugatlara ait MRM kromatogramları; kontrol, numune ve referans standart örnekleri ile birlikte sunulmaktadır. Tüm doz ve sürelerde besiyerinden alınan örneklere ait MRM kromatogramları ise EK-2'de verilmiştir.

Şekil 4.9'da yer alan LC–MS/MS kromatogramlarından görüldüğü üzere, dört farklı konjugatın her biri için hedeflenen MRM geçişlerinde belirgin pikler gözlenmiştir. Bu pikler, alıkonma süreleri ve iyon bolluk oranları açısından referans standartlarla oldukça uyumludur. Kontrol örneklerinde söz konusu konjugatlara ilişkin herhangi bir sinyal tespit edilmemiştir.



Şekil 4.9. 30 dakika boyunca 250 µM Q'ya maruz bırakılan hücrelerin lizatında tespit edilen GSH ve Cys konjugatlarına ait LC–MS/MS (MRM) kromatogramları. (A) HETETE-GSH, (B) GSH-ETETE-GSH, (C) HETETE-Cys ve (D) Cys-ETETE-Cys.

Besiyerinden alınan numunelerin hiç birinde GSH-ETETE-GSH tespit edilememiştir. HETETE-Cys ise tüm doz ve süre koşullarında tespit edilebilen tek konjugat olmuştur. GSH-HETETE, 0.dakikada tüm dozlarda, 10. dakika ve 1. saatlerde yalnızca 250 µM Q uygulamasını takiben tespit edilirken diğer doz ve sürelerde tespit edilememiştir. Cys-ETETE-Cys konjugatı ise 100 µM ve 250 µM Q uygulamalarını takiben 1., 3. ve 6. saatlerde gözlenmiştir. Besiyerinde tespit edilen konjugatların zaman ve doz bağımlı değişim profilleri, Şekil 4.10'da sunulan grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Konsantrasyon ve maruziyetten sonra geçen süre ile konjugat oluşumundaki değişiklikler **A.** 250 µM Q maruziyeti ile konjugat oluşumunun zamana bağlı değişimi; **B.** 0. dakika (B1) ve (B2), 6. saatte (B3) konjugat oluşumunun konsantrasyona bağlı değişimi. C: Kontrol, dk: Dakika, S: Saat

Her bir konjugatın zaman ve doz bağımlı değişim profilleri dikkate alındığında, HETETE-Cys konjugatının yüksek Q konsantrasyonlarına duyarlılık gösterdiği ve zaman ilerledikçe pik alanında belirgin bir artış sergilediği gözlenmiştir. Bu konjugat, 6. saat zaman noktasında maksimum düzeye ulaşarak hücre dışı ortamda en yüksek seviyede tespit edilmiştir. Cys-ETETE-Cys konjugatı ise erken zaman noktalarında

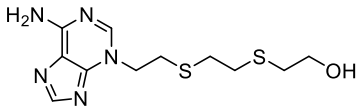
saptanamamış; ancak 1. saatten itibaren, özellikle yüksek Q dozlarında, ölçülebilir düzeylere ulaşmıştır. Buna karşılık, GSH konjugatları yalnızca erken zamanlarda yüksek pik alanı göstermiş, zaman ilerledikçe bu sinyallerde belirgin bir azalma meydana gelmiştir.

4.3. LC-HRMS ile Q-DNA Katım Ürünlerinin Tanımlanmasına İlişkin Bulgular

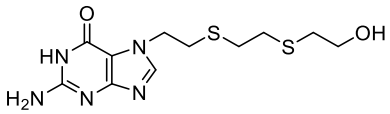
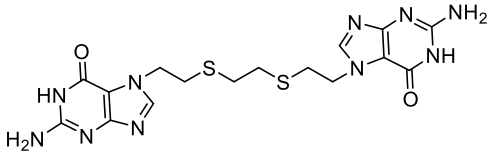
Seskimustardın DNA ile oluşturduğu katım ürünlerini tanımlamak ve karakterize etmek amacıyla, Q'ya maruz kalan ctDNA'dan elde edilen örnekler *full* MS modunda LC-HRMS ile analiz edilmiştir. Daha önce GSH ve Cys konjugatlarının analizinde uygulanan yaklaşımla paralel olarak, 100–1000 m/z aralığında hedeflenmemiş modda gerçekleştirilen taramalarda, [M+H]+ iyonlarına karşılık gelen teorik monoizotopik kütleler TIC'lerinden ekstrakte edilerek değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda, Q'nun DNA katım ürünlerine karşılık gelen üç farklı bileşik tespit edilmiştir. Bu bileşikler; m/z 300,0947'ye karşılık gelen hidroksietiltiyoetiltiyoetil-adenin (HETETE-Ade), m/z 316,0896'ya karşılık gelen hidroksietiltiyoetiltiyoetil-guanin (HETETE-Gua) ve m/z 449,1285'e karşılık gelen guanin-etiltiyoetiltiyoetil-guanin (Gua-ETETE-Gua) olarak tanımlanmıştır.

Tanımlanan DNA katım ürünlerine ait $[M+H]^+$ iyonlarının teorik ve deneysel monoizotopik kütleleri Tablo 4.10'de karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Ayrıca ilgili katım ürünlerinin moleküler yapıları, elementel bileşimleri ve kütle hataları tabloda yer almaktadır.

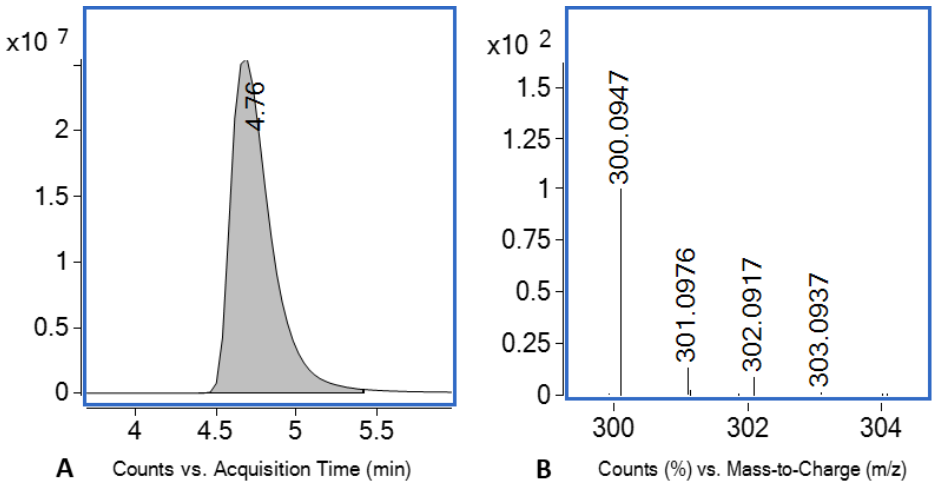
Tablo 4.10. Q'nun ctDNA ile oluşturduğu DNA katım ürünlerine ait moleküler yapılar, elementel bileşimler, teorik ve deneysel $[M+H]^+$ monoizotopik kütle değerleri ile kütle hataları.

Moleküler Yapı	Elementel Bileşim	Teorik Kütle	Deneysel Kütle	Δm (ppm)
 **HETETE-Ade**	$C_{11}H_{18}N_5OS_2$	300,0947	300,0947	0,03

Tablo 4.10. (Devam) Q'nun ctDNA ile oluşturduğu DNA katım ürünlerine ait moleküler yapılar, elementel bileşimler, teorik ve deneysel $[M+H]^+$ monoizotopik kütle değerleri ile kütle hataları.

Moleküler Yapı	Elementel Bileşim	Teorik Kütle	Deneysel Kütle	Δm (ppm)
 **HETETE-Gua**	$C_{11}H_{18}N_5O_2S_2$	316,0896	316,0896	0,03
 **Gua-ETETE-Gua**	$C_{16}H_{21}N_{10}O_2S_2$	449,1285	449,1285	0,02

Tüm DNA katım ürünleri için hesaplanan kütle hataları sıfıra oldukça yakın değerlerde gerçekleşmiş, $[M+H]^+$ iyonlarına ait monoizotopik kütle ölçümleri yüksek kütle doğruluğu ile elde edilmiştir. Ayrıca, her üç katım ürünü için teorik olarak belirlenen tüm izotop pikleri deneysel spektrumlarda tespit edilmiştir. Katım ürünlerine ait izotopik dağılımlar teorik izotopik dağılımlarla karşılaştırılmış olup veriler HETETE-Ade için Tablo 4.11'de, HETETE-Gua için Tablo 4.12'de ve Gua-ETETE-Gua için Tablo 4.13'de sunulmuştur. İlgili $[M+H]^+$ iyonlarına ait EIC'ler ve kütle spektrumları ise Şekil 4.11, 4.12 ve 4.13'te yer almaktadır.

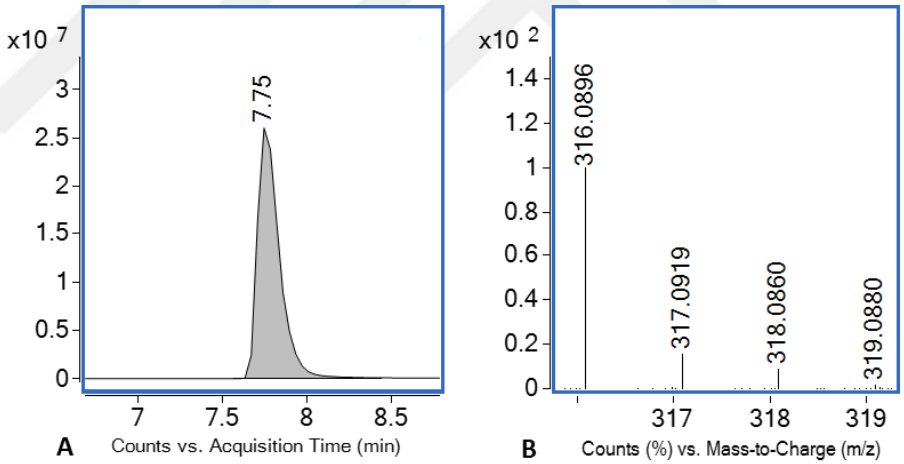


Şekil 4.11. HETETE-Ade'ye ait m/z 300, 0947 için EIC (A) ve bu yapıya ait LC-HRMS spektrumunda gözlenen izotopik pik dağılımı (B).

Tablo 4.11. HETETE-Ade'ye ait monoizotopik iyon ve izotopik bileşenlerine ilişkin teorik ve deneysel m/z değerleri, bağıl bolluk yüzdeleri ve kütle hataları.

Teorik Kütle	Deneysel Kütle	%Bağıl Bolluk (Teorik)	%Bağıl Bolluk (Deneysel)	Δm (ppm)
300,0947	300,0947	100	100	0,03
301,0976	301,0970	15,55	12,61	2,09
302,0917	302,0917	10,29	8,06	0,03
303,0937	303,0934	1,4	1,12	1,06

HETETE-Ade katım ürününe ait monoizotopik $[M+H]^+$ iyonu için teorik ve deneysel m/z değeri 300,0947 olarak belirlenmiştir. İlgili izotopik dağılımda, m/z 301,0976, 302,0917 ve 303,0937 değerlerine karşılık gelen izotop pikleri saptanmıştır. Bu piklerin bağıl bollukları sırasıyla %12,61, %8,06 ve %1,12 olarak ölçülmüş ve teorik değerlerle karşılaştırıldığında kütle hataları 2,09, 0,03 ve 1,06 ppm olarak hesaplanmıştır. Aynı izotoplara ait bağıl bolluk yüzdeleri üzerinden hesaplanan farklar ise sırasıyla %2,09, %2,23 ve %0,02'tir.

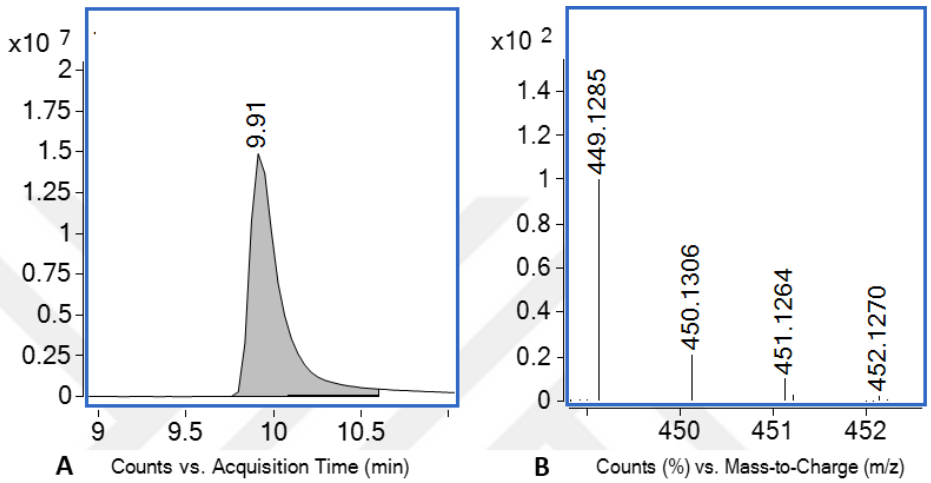


Şekil 4.12. HETETE-Gua'ya ait m/z 316,0896 için EIC (A) ve bu yapıya ait LC-HRMS spektrumunda gözlenen izotopik pik dağılımı (B).

Tablo 4.12. HETETE-Gua'ya ait monoizotopik iyon ve izotopik bileşenlerine ilişkin teorik ve deneysel m/z değerleri, bağıl bolluk yüzdeleri ve kütle hataları.

Teorik Kütle	Deneysel Kütle	%Bağıl Bolluk (Teorik)	%Bağıl Bolluk (Deneysel)	Δm (ppm)
316,0896	316,0896	100	100	-0,03
317,0919	317,0919	15,59	14,41	0,13
318,0860	318,0867	10,5	9,6	-2,26
319,0880	319,0885	1,44	1,42	-1,63

HETETE-Gua yapısına ait monoizotopik $[M+H]^+$ iyonunun teorik ve deneysel m/z değeri 316,0896'dır. İzotopik dağılımda m/z 317,0919, 318,0860 ve 319,0880 değerlerine karşılık gelen izotoplar belirlenmiş; ölçülen bağıl bolluk değerleri sırasıyla %14,41, %9,6 ve %1,42 olarak kaydedilmiştir. Bu izotoplar için hesaplanan kütle hataları ise 0,13, -2,26 ve -1,63 ppm'dir. Aynı izotoplara ait bağıl bolluk yüzdeleri üzerinden hesaplanan farklar ise sırasıyla %1,18, %0,9 ve %0,02'dir.



Şekil 4.13. Gua-ETETE-Gua'ya ait m/z 449,1285 için EIC (A) ve bu yapıya ait LC-HRMS spektrumunda gözlenen izotopik pik dağılımı (B).

Tablo 4.13. Gua-ETETE-Gua'ya ait monoizotopik iyon ve izotopik bileşenlerine ilişkin teorik ve deneysel m/z değerleri, bağıl bolluk yüzdeleri ve kütle hataları.

Teorik Kütle	Deneysel Kütle	%Bağıl Bolluk (Teorik)	%Bağıl Bolluk (Deneysel)	Δm (ppm)
449,1285	449,1285	100	100	-0,02
450,1306	450,1306	20,88	22,86	-0,02
451,1264	451,1263	9,85	11,86	0,13
452,1270	452,1275	2,02	2,24	-1,04

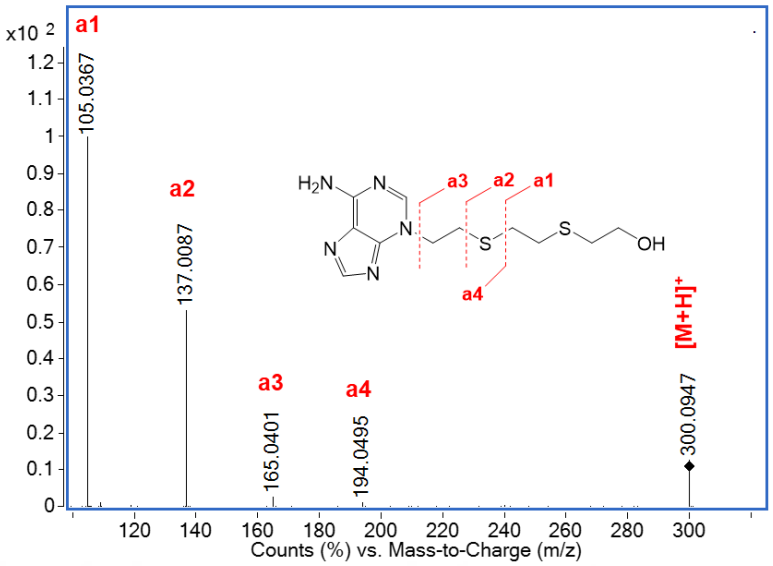
Gua-ETETE-Gua yapısına ait monoizotopik $[M+H]^+$ iyonu 449.1285 m/z'de gözlenmiştir. İzotopik dağılımda m/z 450,1306, 451,1264 ve 452,1270 değerlerine karşılık gelen izotop piklerinin bağıl bollukları sırasıyla %22,86, %11,86 ve %2,24 olarak ölçülmüştür. Teorik hesaplamalarla karşılaştırıldığında, bu izotoplar için kütle hataları -0,02, 0,13 ve -1,04 ppm olarak hesaplanmıştır. Bağıl bolluk değerlerine dayalı olarak hesaplanan farklar ise sırasıyla %-1,98, %-2,01 ve %-0,22'dir.

Ayrıca her bir DNA katım ürünü için elde edilen EIC'lerde, hedeflenen m/z değerlerine karşılık gelen tek, simetrik ve dar pikler kaydedilmiştir. Bu gözlemler, hedef iyonların diğer bileşenlerden ayrılmış şekilde tespit edildiğini, izobarik girişim olmadığını da göstermektedir.

Full MS modunda tanımlanan DNA katım ürünlerinin yapısal karakterizasyonunu desteklemek amacıyla, bir sonraki aşamada bu bileşiklerin parçalanma profilleri *targeted* MS/MS analizleri ile değerlendirilmiştir. GSH ve Cys konjugatlarının fragmantasyon analizlerinde izlenen stratejiye benzer şekilde, Q'ya maruz bırakılan ctDNA örneklerinde tanımlanan katım ürünleri de LC-HRMS sisteminde *targeted* MS/MS modunda analiz edilmiştir. Bu kapsamda, *full* MS taramalarında belirlenen [M+H]+ öncü iyonların m/z değerleri ve alıkonma süreleri esas alınarak bir dahil etme listesi *(inclusion list)* oluşturulmuş ve her bir öncü iyon yalnızca ilgili alıkonma süresi aralığında hedeflenmiştir. Böylece interferans kaynaklı sinyaller sınırlandırılarak yöntemin seçiciliği ve analitik doğruluğu artırılmıştır. Elde edilen yüksek çözünürlüklü PIS'ler üzerinden fragmantasyon modelleri değerlendirilmiştir. Gözlenen fragment iyonları, DNA katım ürünlerinin yapısal doğrulamasında kullanılmıştır.

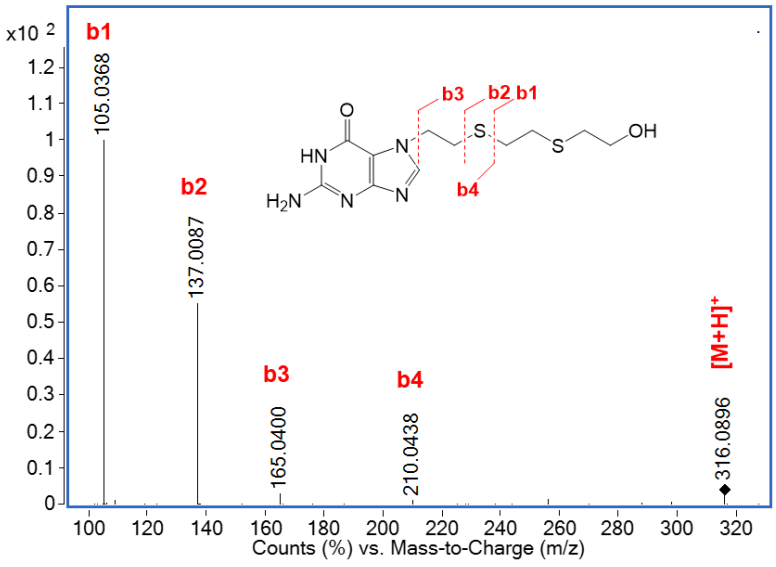
DNA katım ürünlerinin *targeted* MS/MS yöntemi ile analizlerinden elde edilen yüksek çözünürlüklü PIS'ler üzerinde karakteristik fragment iyonları etiketlenmiş, ayrıca ilgili moleküler yapılar üzerinde olası parçalanma yolları gösterilmiştir.

Monomerik katım ürünü olan HETETE-Ade'nin 15 eV CE altında kaydedilmiş PIS'si Şekil 4.14'de sunulmuştur. Spektrumda gözlenen iyonlardan a3, $[M+H]^+$ iyonundan, adeninin nötral kaybı sonrası oluşan ürün iyonudur ve aynı zamanda HETETE parçasına karşılık gelir. a2 ve a1 iyonları tiyoalkil zinciriyle ilişkili olup sırasıyla HETE-S ve HETE fragmanlarını temsil eder. a4 iyonu ise $[M+H]^+$ iyonundan HETE parçasının kaybıyla oluşmuştur. Özellikle a1 ve a2 iyonları, spektrumda en yüksek sinyal yoğunluğuna sahip fragmanlardır ve HETETE yapısının karakteristik parçalanma modelini yansıtmaktadır.



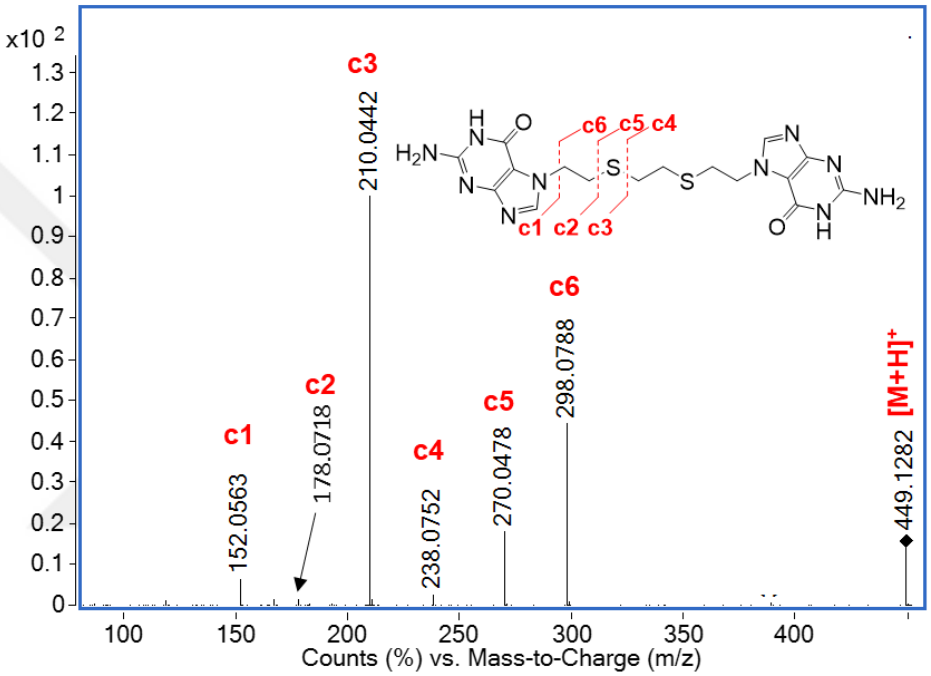
Şekil 4.14. HETETE-Ade'ye ait PIS.

Guaninin Q ile oluşturulduğu monomerik katım ürünü olan HETETE-Gua'nın 15 eV CE altında kaydedilen PIS'si Şekil 4.15'de sunulmuştur. b3 iyonu, guaninin nötral kaybını takiben elde edilen ürün iyonudur ve HETETE parçasını temsil eder. b2 ve b3 iyonları tiyoalkil zincirine ait parçalanmalarla oluşmuş, sırasıyla HETE-S ve HETE parçalarına karşılık gelirken, b4 iyonu HETE kaybını takiben gözlenmiştir. En yoğun sinyal veren ürün iyonları b1 ve b2 olup, bu katım ürünü için karakteristik fragmantasyon profili sunmaktadır.



Şekil 4.15. HETETE-Gua'ya ait PIS.

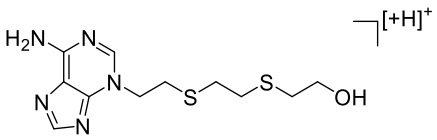
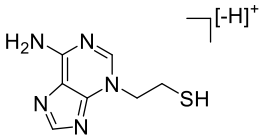
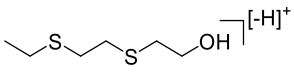
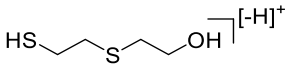
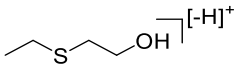
Çapraz bağlı dimerik katım ürünü olan Gua-ETETE-Gua'nın 20 eV CE ile elde edilen PIS'si Şekil 4.16'da sunulmuştur. Bu spektrumda yer alan c6 iyonu, guaninin nötral kaybıyla oluşmuş karakteristik bir ürün iyonudur. c1 iyonu, guanin parçasına ait tek protonlu bir iyonu temsil ederken, c2, c3, c4 ve c5 iyonları, tiyoalkil zincirindeki C–S bağlarının kırılmasıyla oluşmuş fragmanlardır. Spektrumda c3 ve c6 iyonları en yüksek sinyal yoğunluğuna sahip olup, çapraz bağ yapısının parçalanma dinamiklerini yansıtmaktadır.



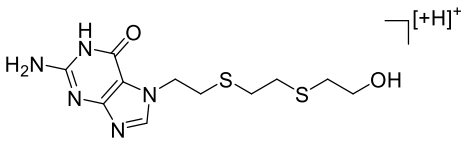
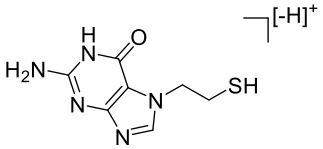
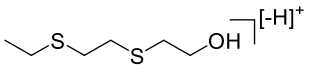
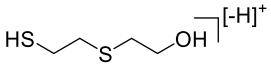
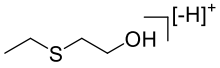
Şekil 4.16. Gua-ETETE-Gua'ya ait PIS.

Bunlara ek olarak, PIS verileri, DNA katım ürünlerine ait fragmantasyon modellerinin karakterizasyonuna ve her bir ürün iyonunun yapısal tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Tanımlanan fragmanlara ilişkin yapı bilgileri, elementel bileşimler, teorik ve deneysel kütle değerleri ve ppm cinsinden hesaplanmış kütle hataları ile birlikte Tablo 4.14, 4.15 ve 4.16'da sunulmuştur. Bu tablolar, her bir fragman için kütle hatasının hiçbir zaman 3 ppm'i aşmadığını göstermektedir.

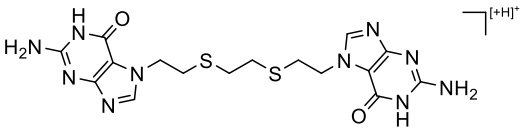
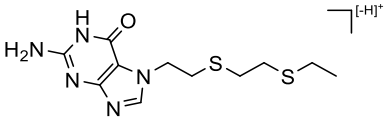
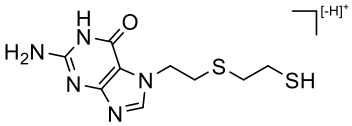
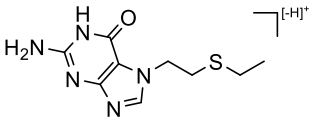
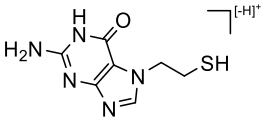
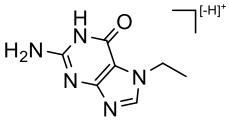
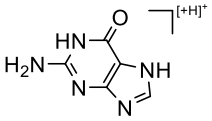
Tablo 4.14. HETETE-Ade'ye ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları.

Moleküler Yapı	Elementel Bileşim	Teorik Kütle	Deneysel Kütle	Δm (ppm)
	$C_{11}H_{18}N_5OS_2$	300,0947	300,0947	-0,07
	$C_7H_8N_5S$	194,0495	194,0495	0,05
	$C_6H_{13}OS_2$	165,0402	165,0401	-0,91
	$C_4H_9OS_2$	137,0089	137,0087	-1,75
	C_4H_9OS	105,0369	105,0367	-1,52

Tablo 4.15. HETETE-Gua'ya ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları.

Moleküler Yapı	Elementel Bileşim	Teorik Kütle	Deneysel Kütle	Δm (ppm)
	$C_{11}H_{18}N_5O_2S_2$	316,0896	316,0896	-0,16
	$C_7H_8N_5OS$	210,0444	210,0438	-2,71
	$C_6H_{13}OS_2$	165,0402	165,0400	-1,45
	$C_4H_9OS_2$	137,0089	137,0087	-1,75
	C_4H_9OS	105,0369	105,0368	-0,76

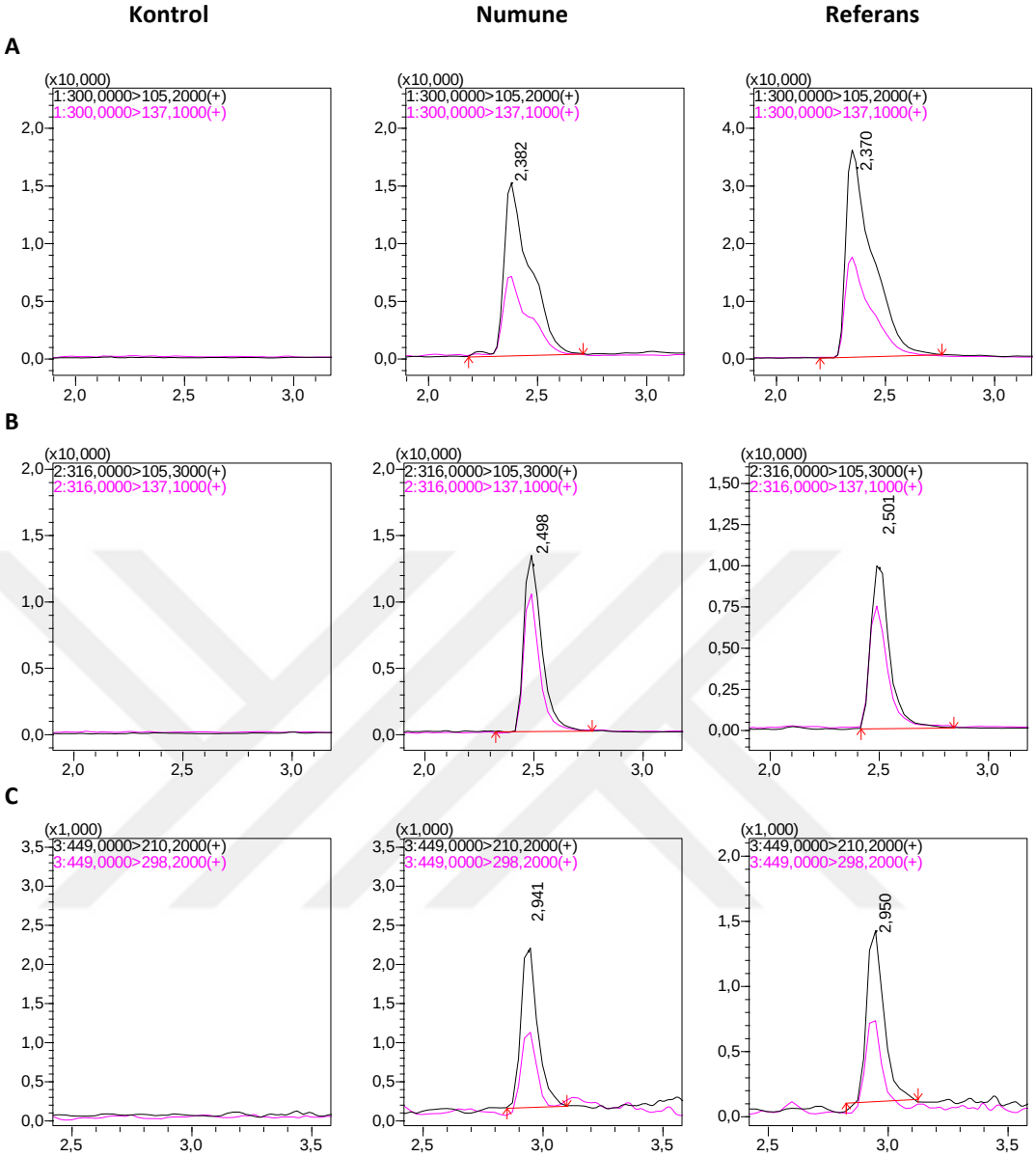
Tablo 4.16. Gua-ETETE-Gua'ya ait fragmanların yapı bilgileri, teorik ve deneysel kütle değerleri ile kütle hataları.

Moleküler Yapı	Elementel Bileşim	Teorik Kütle	Deneysel Kütle	Δm (ppm)
	$C_{16}H_{21}N_{10}O_2S_2$	449,1285	449,1282	-0,67
	$C_{11}H_{16}N_5OS_2$	298,0791	298,0788	-0,84
	$C_9H_{12}N_5OS_2$	270,0478	270,0478	0,01
	$C_9H_{12}N_5OS$	238,0757	238,0752	-2,23
	$C_7H_8N_5OS$	210,0444	210,0442	-0,95
	$C_7H_8N_5O$	178,0723	178,0718	-2,98
	$C_5H_6N_5O$	152,0567	152,0563	-2,37

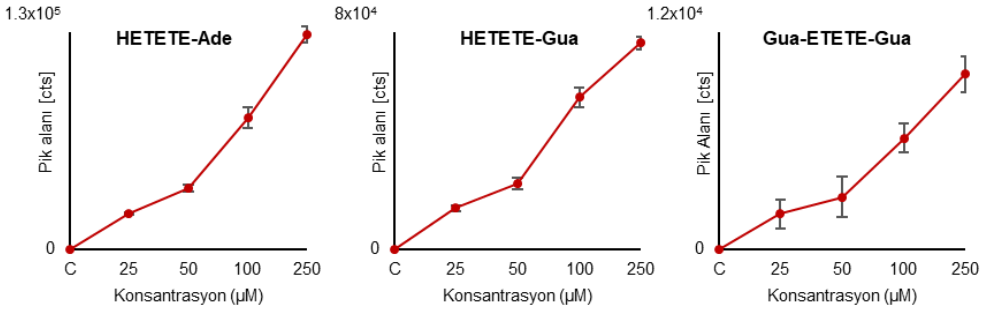
4.4. HaCaT Hücre Kültüründe Q'nun DNA Katım Ürünlerinin Saptanmasına İlişkin Bulgular

HaCaT hücre kültürlerinde Q'nun DNA ile katım ürünleri oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır. DNA katım ürünlerinin tespiti, LC-MS/MS ile MRM modunda gerçekleştirilmiştir. Yöntem optimizasyonu, daha önce LC-HRMS ile yapısal olarak karakterize edilen ve LC-PDA-FRC sistemiyle saflaştırılan DNA katım ürünleri HETETE-Ade, HETETE-Gua ve Gua-ETETE-Gua fraksiyonları kullanılarak yapılmıştır.

Seskimustarda maruz bırakılan HaCaT hücrelerinde, üç DNA katım ürünü de LC-MS/MS yöntemiyle güvenilir şekilde tespit edilmiştir. Buna karşın, kontrol grubu örneklerinde herhangi bir sinyal gözlenmemiştir. Artan konsantrasyonlarda Q'ya maruz bırakılan HaCaT hücrelerinden izole edilen DNA örneklerinde tespit edilen katım ürünlerine ilişkin LC-MS/MS (MRM) kromatogramları Şekil 4.17'de sunulmuştur. Analizlerden elde edilen veriler, her üç katım ürününe ait karakteristik MRM geçişlerine karşılık gelen pik alanlarında, 25 µM'dan 250 µM'a kadar uygulanan dozlarla uyumlu sinyal artışları olduğunu göstermiştir. HETETE-Gua ve Gua-ETETE-Gua katım ürünleri yaklaşık 5 kat sinyal artışı sergilerken, HETETE-Ade için bu artış yaklaşık 6 kat olarak belirlenmiştir. Tüm doz gruplarında karşılaştırıldığında, HETETE-Ade'ye ait pik alanları diğer iki katım ürününe kıyasla daha yüksek seviyelerde seyretmiştir. Özellikle, HETETE-Ade'nin sinyal yoğunluğu Gua-ETETE-Gua'ya göre yaklaşık 10 kat ve HETETE-Gua'ya göre yaklaşık 1,5 kat daha yüksektir. Hücrelerde tespit edilen DNA katım ürünlerinin doz bağımlı değişim profilleri, Şekil 4.18'de sunulan grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 4.17. 250 µM Q'ya maruz bırakılan hücrelerde DNA katım ürünlerine ait LC–MS/MS (MRM) kromatogramları. A) HETETE-Ade, B) HETETE-Gua, C) Gua-ETETE-Gua



Şekil 4.18. Konsantrasyon ile DNA katım ürünü oluşumundaki ilişki. C: Kontrol.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, Q maruziyetinin özgül biyobelirteçleri olabilecek GSH ve DNA ile oluşturduğu konjugat ve katım ürünlerinin kütle spektrometrik yöntemlerle tanımlanması ve biyolojik sistemlerde doğrulanması hedeflenmiştir. Bu amaçla, Q'nun GSH konjugatları ve DNA kovalent katım ürünleri LC-HRMS tekniği ile karakterize edilmiştir. Söz konusu yapıların biyolojik sistemlerde de oluştuğunu doğrulamak amacıyla *in vitro* hücre kültürü modellerinde zaman ve doz bağımlı oluşumları incelenmiş, analitik izlenebilirlikleri LC-MS/MS yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Literatürde bilgimiz dahilinde Q ile söz konusu konjugat ve katım ürünlerinin tanımlanmasına ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır. Bu yapıların, kütle spektrometrik yöntemlerle analitik olarak tanımlanması, biyolojik örneklerde kalıcılıklarının uzun olması nedeniyle geriye dönük olarak maruziyetin doğrulamasında kullanılabileceği öngörülmüştür. Gerçekleştirilen analizler sonucunda elde edilen verilerin literatür ile karşılaştırmalı değerlendirmeleri aşağıda başlıklar halinde sunumuştur.

5.1. LC-HRMS Analizleri

Bu bölümde, GSH ve Cys konjugatları ile DNA katım ürünlerine ait yapıların, LC-HRMS sisteminde *full* MS modunda elde edilen veriler üzerinden tanımlanmasına ilişkin değerlendirmeler sunulmaktadır. Yapısal karakterizasyonun ilk aşamasında, teorik olarak hesaplanan monoizotopik kütleler ile deneysel olarak elde edilen $[M+H]^+$ iyonlara ait m/z değerleri karşılaştırılmış ve her biri için ppm cinsinden kütle hatası hesaplanmıştır (Tablo 4.1, 4.10). Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisinde yapı doğrulama açısından ±2,5 ppm sınırı kabul edilebilir eşik olarak değerlendirilmiştir. Bulgularımızda, tespit edilen tüm hedef moleküllerin deneysel m/z değerleri bu aralık içerisinde kalmış ve tanımlanan yapıların yüksek kütle doğruluğu ile belirlendiğini ortaya koymuştur.

Tanımlanan tüm hedef iyonlar için izotopik dağılım da teorik olarak hesaplanmış ve elde edilen deneysel verilerle karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada

yalnızca teorik izotopik dağılımda bağıl bolluğu %1'in üzerinde olan izotoplar değerlendirmeye alınmıştır. Tespit edilen izotopik dağılımların tamamı gerek kütle doğruluğu gerekse izotopik oran açısından teorik modelle yüksek düzeyde uyum göstermiştir. Her bir izotop için hesaplanan kütle hatalarının ±2,5 ppm sınırı içinde kaldığı ve izotopik dağılım karakteristiğini bozacak ölçüde bir sapma oluşmadığı gözlemlenmiştir (Tablo 4.2-4.5, 4.11-4.13).

Teorik olarak belirlenen değerlerle karşılaştırıldığında, tespit edilen izotopik iyonların bağıl bolluklarında kabul edilebilir düzeyde sapmalar mevcuttur. Özellikle düşük bolluklu izotop sinyallerinin, kütle spektrometrelerinin algılama sınırlarına yakın olması, bu iyonlara ait bağıl bolluk değerlerinde daha fazla belirsizlik oluşmasına neden olabilmektedir. Bu durum, yüksek çözünürlüklü sistemlerde dahi izotopik oranlarda gözlenen sapmaların tamamen ortadan kaldırılamayacağını göstermektedir. Nitekim literatürde, düşük izotopik oranlara sahip sinyallerde gözlenen bağıl bolluk sapmalarının ölçüm sistemine bağlı olarak değişebileceği ve çoğu durumda olağan kabul edildiği bildirilmektedir (224, 225). Bu nedenle, izotop dağılımı yapı doğrulama sürecinde molekül tanımlamasını destekleyen tamamlayıcı bir kriter olarak değerlendirilmektedir. İzotopik dağılım, bazı tanımlama algoritmalarında yalnızca kullanıcıyı bilgilendirmek amacıyla sunulmakta ve skorlamaya dahil edilmemektedir (224, 226). Bu bağlamda, izotop dağılımlarının genel karakteristiğinde herhangi bir bozulma gözlenmemiş ve dağılım profili teorik modelle uyumlu şekilde örtüşmüştür.

Ayrıca, cihaz yazılımının elde edilen spektrumlara dayanarak önerdiği elementel bileşim, teorik olarak hesaplanan moleküler formülle birebir örtüşmüştür. Bu eşleşme, yalnızca monoizotopik pikin değil, aynı zamanda diğer izotopik sinyallerin de doğru tespit edildiğini ve yazılımın izotop verisini güvenilir şekilde işleyebildiğini göstermektedir. İzotop dağılımında anlamlı bir sapma söz konusu olması durumunda, bu elementel bileşim önerisi de teorik yapıdan farklılık gösterebilmektedir. Dolayısıyla bu uyum hem kütle doğruluğu hem de izotopik bütünlük yönünden hedef moleküllerin güvenilir biçimde tanımlandığını ortaya koymaktadır.

Ana moleküler iyonlara ait teorik ve deneysel m/z değerlerinin birebir örtüşmesi, hedef konjugatların doğru şekilde tanımlandığını güçlü biçimde desteklemektedir. İzotopik bolluklara ilişkin karşılaştırmalarda da sonuçların uyumlu olduğu gözlenmiştir. İzotop piklerinde kabul edilebilir düzeyde sapmalar bulunmakla birlikte, izotopik dağılım profilinin karakteristik yapısı korunmuştur. Ayrıca, her bir analit için elde edilen EIC'ler, hedef m/z değerlerine karşılık gelen tek, simetrik ve keskin piklerin saptanması analitlerin yüksek saflıkta olduğunu ve izobarik girişimlerden arındırılmış biçimde tayin edildiklerini göstermektedir (Şekil 4.1a- 4.4a, 4.11a-4.13a). Bu bulgular hem kütle doğruluğu hem de izotopik bütünlük açısından elde edilen verilerin yüksek analitik güvenilirliğe sahip olduğunu ve söz konusu konjugatların yapı doğrulamasında güvenle kullanılabileceğini ortaya koymaktadır.

Yapısal doğrulamanın nihai aşamasında ise *targeted* MS/MS analizleri kritik öneme sahiptir. Konjugatların ve katım ürünlerinin parçalanma modellerinin incelendiği bu analizler, moleküler yapıların spesifik fragman iyonları aracılığıyla detaylı biçimde aydınlatılmasını sağlamaktadır.

Bu bilgiler doğrultusunda, bir sonraki bölümde elde edilen MS/MS verileri temel alınarak hedef bileşiklerin fragmantasyon profilleri değerlendirilecektir.

5.1.1. GSH ve Cys Konjugatlarının Targeted MS/MS Yöntemi ile Yapısal Doğrulaması

Konjugat yapıların doğrulanmasında tandem MS ile elde edilen fragmantasyon modelleri, örneklerdeki hedef bileşiklerin tanımlanmasında yüksek düzeyde seçicilik sağlamaktadır. GSH konjugatlarının CID koşulları altında gösterdiği parçalanma profilleri, karakteristik nötral kayıplar ve fragman iyonları üzerinden değerlendirilerek yapı doğrulamada sıkça kullanılmaktadır. Literatürde, glisin (m/z 75.0320) ve piroglutamik asit (m/z 129.0426) nötral kayıplarının, GSH konjugatlarının MS/MS analizlerinde en sık karşılaşılan ve tanımlama açısından temel kabul edilen ayrışma olayları olduğu bildirilmiştir (227).

Bunun yanı sıra konjugattan, glu-ala-glc (m/z 275.1117) ve bir GSH parçasının (m/z 307.0838) nötral kaybı ile oluşan ürün iyonları, fragmantasyon modelinin daha

kapsamlı değerlendirilmesini mümkün kılmaktadır. Bu iyonların varlığı konjugatın GSH kaynaklı olduğunu güçlü şekilde desteklemektedir. Sisteinilglisin kalıntısına karşılık gelen karakteristik iyon (m/z 177.0328), GSH konjugatlarının parçalanmasında sıklıkla gözlenen bir diğer fragmantasyon ürünüdür (228, 229).

Dimerik yapıya sahip GSH konjugatları, özellikle GSH-ETETE-GSH gibi moleküller, tekli GSH türevlerine kıyasla daha karmaşık fragmantasyon modelleri sergileyip eşzamanlı birden fazla nötral kayıp gösterebilmektedir. Azot hardalı ve HD gibi bifonksiyonel alkilleyici ajanlarla oluşturulan dimerik GSH konjugatlarında benzer çoklu nötral kayıpların da gözlemlendiği bildirilmiştir (167, 230).

Öte yandan, Cys konjugatlarının parçalanmasında ise m/z 121,0197'ye karşılık gelen nötr Cys kaybı, literatürde bu tür yapılar için özgül ve sık gözlenen bir fragmantasyon özelliği olarak tanımlanmıştır (231).

Bu literatür bilgileri ışığında, çalışmamızda elde edilen yüksek çözünürlüklü PIS'ler değerlendirilmiş ve elde edilen ürün iyonları, literatürde bildirilen karakteristik nötral kayıplarla yüksek düzeyde örtüşmüştür. Glisin (m/z 75,0320) ve piroglutamik asit (m/z 129,0426) kayıplarına karşılık gelen a1, b1 ve a2, b2 iyonları, GSH konjugatlarının doğrulanmasında temel kabul edilen iyonlar olup, söz konusu iyonlar bu tez çalışmasında da gözlenmiştir (Şekil 4.5, 4.6). Benzer şekilde, glu-ala-glc (m/z 275,1117) segmentinin kaybına karşılık gelen a3 ve b5 iyonları ile tüm GSH molekülünün nötral kaybına karşılık gelen a5 ve b6 iyonları, önceki çalışmalarla (227-229) uyum içinde olup ve yapısal doğrulamada katkı sağlamıştır. Ayrıca, sisteinilglisin kalıntısına karşılık gelen a4 ve b7 iyonları da hem konjugat yapısının GSH kaynaklı olduğunu, hem de fragmantasyon modelinin karakteristik olduğunu göstermektedir.

Dimerik yapıdaki GSH-ETETE-GSH molekülünde gözlenen b3 ve b4 iyonları, sırasıyla bir glisin ve bir piroglutamik asit ile iki piroglutamik asidin nötral kaybı sonucu ortaya çıkmıştır (Şekil 4.6). Bu kompleks fragmantasyon modeli, bifonksiyonel hardal ajanlarının GSH ile oluşturduğu konjugatlara ilişkin literatür verileri ile örtüşmüştür (167, 230).

Sistein konjugatlarına ait PIS'ler incelendiğinde ise fragmantasyon modelinin daha basit bir yapıda olduğu gözlenmiştir. c5 ve d1 iyonları, Cys nötral kaybına (m/z

121,0197) karşılık gelmekte olup, bu bulgu literatürde yaygın ve spesifik olarak bildirilen fragmantasyon yolları ile tutarlılık göstermektedir (231) (Şekil 4.7, 4.8). GSH konjugatlarıyla karşılaştırıldığında, Cys konjugatlarının fragmantasyonu esas olarak C–S bağının ayrılması üzerinden şekillenmiştir.

Tüm bu bilgilere ek olarak, HETETE-GSH ve HETETE-Cys monokonjugatlarının spektrumlarında tiyoalkil zinciri ile ilişkili karakteristik iyonlar da belirlenmiştir (Şekil 4.5, 4.7). Bu iyonlar arasında HETETE-S (a3, c3), HETETE (a5, c5), HETE-S (a6, c7) ve HETE (a7, c9) yer almakta olup, daha önce HD ve Q'nun protein katım ürünleri üzerine yapılan çalışmalarda (39, 40, 175, 232, 233) gösterilen iyonlarla da uyumlu oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.5, 4.7). Bu iyonlar, analiz edilen konjugatların tiyoalkil zinciri üzerinden fragmantasyona uğradığını ve böylece spesifik yapıların ayrıntılı olarak tanımlanabildiğini göstermektedir.

Glutatyon ve Cys konjugatlarına ait yapı doğrulama çalışmaları kapsamında elde edilen *targeted* MS/MS verileri, ürün iyonlarının teorik ve deneysel m/z değerlerini içerecek bir şekilde ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir. Tablo 4.6-4.9'da sunulan bu verilerde, her bir fragman iyonu için hesaplanan kütle sapmaları ±5 ppm sınırları içerisinde kalmış ve en yüksek sapma değeri ±4,73 ppm olarak belirlenmiştir. Bu bulgu, kullanılan cihazın kütle doğruluğunun yapı karakterizasyonu açısından yeterli olduğunu ve fragmantasyon verilerinin hedef konjugatların güvenilir bir şekilde tanımlanmasında etkin rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca, bu veri aday moleküllerin fragmantasyon modeli ile teorik beklentiler arasında tam bir uyum olduğunu ortaya koymaktadır.

Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi ve *targeted* MS/MS analizleri sonucunda, Q ile GSH ve Cys arasında gerçekleşen konjugasyon ürünleri kesin olarak tanımlanmış, yapıları yüksek doğrulukla karakterize edilmiştir. Her iki nükleofil ile hem monomerik hem de dimerik konjugatların oluştuğu belirlenmiştir. Aday moleküller, düşük kütle hataları, izotopik dağılımın teoriyle tam örtüşmesi ve özgün fragmantasyon modeliyle karakterize edilmiştir. Bu bulgular moleküler düzeyde hedef yapıların doğruluğunu göstermektedir.

Söz konusu yapıların ilk kez tanımlanmış olması, çalışmanın literatüre bilimsel açıdan önemli ve özgün bir katkı sunduğunu göstermektedir. Tez de öne sürülen hipoteze paralel olarak, bifonksiyonel alkilleyici yapısı ile bilinen Q ajanının da HD gibi tekli ve çiftli konjugasyon yeteneğine sahip olduğu ortaya konmuştur. HD'nin elektrofilik merkezleri aracılığıyla monomerik ve dimerik çapraz bağlı ürünler oluşturma kapasitesine benzer şekilde, Q'nun da GSH ve Cys gibi nükleofiller ile hem HETETE hem de ETETE zincirleri üzerinden nükleofilik katılma reaksiyonları verebileceği deneysel olarak doğrulanmıştır.

Sonuç olarak, bu tez çalışması ile Q'nun nükleofilik bileşiklerle verdiği kovalent etkileşimlerin kapsamı hakkında yeni bilgiler sunulmuştur. Bu veriler, Q'nun HD'ye benzer şekilde mono- ve bifonksiyonel alkilasyon kapasitesine sahip olduğunu göstermekte ve tezin hipotezini güçlü biçimde desteklemektedir.

5.1.2. DNA Katım Ürünlerinin Targeted MS/MS Yöntemi ile Yapısal Doğrulaması

DNA bazları, reaktif elektrofilik bileşiklerin hedef aldığı başlıca egzosiklik azot ve oksijen atomlarını içeren çok sayıda nükleofilik bölgeye sahiptir (234). Bu bölgeler arasında, guaninin N7 pozisyonu ve adeninin N3 pozisyonu diğerlerine kıyasla en nükleofilik olan bölgelerdir (235). Ancak, DNA katım ürünlerinin türleri, elektrofilin yapısal özelliklerine, kimyasal yapısına ve DNA ile etkileşim kabiliyetine bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (236). Çalışmalar, Q ile benzer özellikleri olan HD ve azotlu hardalın, DNA ile büyük oranda guaninin N7 pozisyonu ile adeninin N3 pozisyonundan etkileşime girdiğini göstermiştir (189, 191, 237, 238).

DNA katım ürünlerinin tanımlanmasında, GSH ve Cys konjugatlarında olduğu gibi, spesifik nötral kayıplardan kaynaklanan ürün iyonları en önemli yapısal doğrulama kanıtları arasında yer almaktadır. Bu kapsamda, katım ürünlerinden bir bazın nötral kaybı ile oluşan karakteristik ürün iyonları, yapısal tanımlamada temel kriterlerden biri olarak kabul edilmektedir. Literatürde de sıklıkla vurgulandığı üzere, adenin veya guanin gibi bazların nötral kaybı sonucu oluşan fragman iyonları, ayırt edici yapısal belirteçler olarak değerlendirilmektedir (235, 239-242).

Bu tez çalışmasında tanımlanan DNA katım ürünlerine ait PIS'lerde, tanısal öneme sahip iyonlar a3, b3 ve c6 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.14-4.16). Bu iyonlar, ilgili katım ürünlerinden bir bazın nötral kaybı sonrasında oluşan ürün iyonlarıdır. Baz nötral kaybına bağlı olarak oluşan bu iyonlar, katım ürününün hedef moleküle kovalent bağlanmasını doğrulayan en güçlü yapısal kanıtlardan biri olarak kabul edilmekte olup yüksek tanısal öneme sahiptir. Monomerik katım ürünlerinde gözlenen a3 ve b3 iyonları, Q'nun alkilasyon sonrası nükleofillere eklediği HETETE parçasına karşılık gelmektedir (Şekil 4.14, 4.15). Bu iyonun, bu tez kapsamında incelenen GSH ve Cys monokonjugatlarında olduğu gibi, Blum ve ark. tarafından tanımlanan Q'nun albümin üzerindeki katım ürünlerinde de benzer şekilde gözlendiği ve Q'nun tiyoalkil zincirine özgü tanısal fragmanlar olduğu gösterilmiştir (39).

HETETE-Ade ve HETETE-Gua'ya ait PIS'lerde en yüksek bollukta gözlenen iyonlar olan a1, a2, b1 ve b2, HETETE yapısındaki tiyoalkil zincirin parçalanması sonucu oluşan HETE ve HETE-S fragmanlarına karşılık gelmektedir (Şekil 4.14, 4.15). Bununla birlikte, a4 ve b4 iyonları, bu katım ürünlerinden HETE fragmanın uzaklaşmasıyla meydana gelmektedir. HETE fragmanı HD'nin monomerik DNA katım ürünlerinde de adenin ya da guaninin nötral kaybı sonucunda oluşan iyona (m/z 105,0369) karşılık gelir ve bu bileşiklere ait tanımlayıcı iyondur (188, 191, 193, 223, 243-247). Söz konusu fragmantasyon, ana molekülden bir nükleobazın nötral kaybı ile birlikte tiyoalkil grubun parçalanmasıyla karakterizedir (244).

Çapraz bağlı dimerik DNA katım ürünü Gua-ETETE-Gua'ya ait PIS'de yer alan c6 iyonu, bir guaninin nötral kaybı sonucu oluşan iyona karşılık gelmekte olup bu fragman iyonu nükleobaz kaybının tipik bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Aynı spektrumda gözlenen c1 iyonu ise, tek protonlanmış guanin iyonunu temsil etmektedir. Diğer taraftan, c2, c3, c4 ve c5 iyonları, ETETE zinciri üzerindeki sülfür atomlarının oluşturduğu C–S bağlarının kopması sonucu ortaya çıkan karakteristik ürün iyonlarıdır (Şekil 4.16). HD'nin dimerik guanin katım ürünlerinde de benzer şekilde, hem nötral nükleobaz kaybı hem de C–S bağının kopması sonucunda tanısal fragmanlar oluştuğu literatürde raporlanmıştır (244).

Q'nun DNA ile oluşturduğu katım ürünlerinin karakteristik fragmantasyon modelleri, literatürde azot hardalları ve özellikle HD ile yapılan çalışmalarda bildirilen DNA katım ürünlerinin parçalanma özellikleriyle yüksek düzeyde benzerlik göstermektedir. Bu durum, bu tez kapsamında elde edilen bulguların önceki çalışmalardan elde edilen literatür verileri ile tutarlı olduğunu ortaya koymakta ve Q'ya ait DNA katım ürünlerinin yapısal doğrulamasında tanısal iyonların güvenilirliğini desteklemektedir (188, 223, 237, 238, 246).

DNA katım ürünlerine ait yapı doğrulama çalışmaları kapsamında elde edilen targeted MS/MS verileri, ürün iyonlarının teorik ve deneysel m/z değerleri temelinde ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir. Tablo 4.14, 4.15 ve 4.16'da sunulan bu verilerde, her bir fragman iyonu için hesaplanan kütle sapmaları ±5 ppm sınırları içerisinde kalmış ve en yüksek sapma değeri -2,98 ppm olarak belirlenmiştir. Bu bulgu, kullanılan kütle spektrometre sisteminin yapı karakterizasyonu açısından yeterli doğrulukta çalıştığını ve elde edilen fragmantasyon verilerinin DNA katım ürünlerinin güvenilir bir şekilde tanımlanmasında etkin rol oynadığını göstermektedir. Ayrıca bu tablolar, her bir iyonun elementel bileşimiyle birlikte teorik fragmantasyon modeli doğrultusunda yapılan yapısal eşleştirmeleri içermekte olup, tanımlanan iyonlar ile literatürde daha önce raporlanmış fragmantasyon modelleri arasında yüksek düzeyde benzerlik olduğunu ve DNA katım ürünleri için önerilen moleküler yapıların doğruluğunu da teyit ettiğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında Q'nun DNA ile oluşturduğu üç farklı katım ürünü, LC-HRMS kullanılarak, yüksek kütle doğruluğu ve fragmantasyon verileriyle desteklenen tanısal iyonlar aracılığıyla, şüpheye yer bırakmayacak şekilde tanımlanmıştır. Her bir katım ürünü, yalnızca teorik m/z değerleriyle değil, aynı zamanda karakteristik nötral kayıplar, tiyoalkil zincir parçalanmaları ve literatürde tanımlanmış yapısal benzerlikler çerçevesinde kapsamlı olarak doğrulanmıştır. Literatürde Q'ya ait DNA katım ürünlerini hedefleyen herhangi bir çalışma bulunmamakta olup, bu çalışma Q'nun DNA ile kovalent bağlanma kapasitesini moleküler düzeyde ortaya koyan ilk sistematik yapısal doğrulama çalışması olma özelliğini taşımaktadır. Bu yönüyle çalışma, Q ve benzeri bileşiklerin DNA ile

etkileşimlerini anlamaya yönelik literatüre özgün ve öncü nitelikte katkılar sunmaktadır.

5.2. LC-MS/MS Analizleri

Bu bölümde, Q'ya maruz bırakılan HaCaT hücre kültürü örneklerinde oluşması beklenen GSH ve Cys konjugatları ile DNA katım ürünlerinin varlığı ve değişimi tartışılmaktadır. Önceki bölümde LC-HRMS ile kimyasal yapıları ayrıntılı biçimde tanımlanan bu moleküller, izleyen aşamada LC-PDA-FRC sistemi ile fraksiyonlarına ayrılmış ve her biri için hedefe yönelik MS/MS yöntem optimizasyonları gerçekleştirilmiştir. Optimize edilen MRM geçişleri sayesinde, biyolojik örneklerdeki iz miktardaki bileşiklerin yüksek özgüllükle tespit edilmesi mümkün olmuştur. Bu strateji, Q'nun hücresel ortamda GSH ve Cys gibi endojen nükleofillerle konjugat oluşturma kapasitesini ve DNA ile kovalent bağ kurma yeteneğini doğrudan doğrulayan önemli kanıtlar sunmakta ve deneysel bulguların biyolojik geçerliliğini güçlendirmektedir.

5.2.1. HaCaT Hücre Kültüründe Q'nun GSH ve Cys Konjugatlarının Tespiti

Q'ya maruz bırakılan HaCaT hücrelerinden elde edilen örneklerin LC-MS/MS analizleri, GSH ve Cys konjugatlarının hücre içi ve dışı ortamlarda zaman ve doza bağlı değişkenliğini ortaya koymuştur. Tüm konjugatlar yalnızca 30 dakikalık maruziyetin ardından hücre lizatlarında eş zamanlı olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Besiyerinden alınan numunelerde ise GSH-ETETE-GSH hiçbir zaman noktasında tespit edilememiştir. Buna karşılık HETETE-Cys, tüm doz ve süre koşullarında saptanabilen tek konjugat olmuştur ve bu yönüyle biyolojik matrislerdeki kararlılığı açısından dikkat çekicidir. HETETE-GSH, 0.dakikada tüm dozlarda, 10. dakika ve 1. saatlerde yalnızca 250 µM Q uygulamasını takiben tespit edilirken diğer doz ve sürelerde tespit edilememiştir. Cys-ETETE-Cys ise 100 µM ve 250 µM Q maruziyetinden sonra 1., 3. ve 6. saatlerde besiyerinde tespit edilmiştir (Şekil.4.10). Bu bulgular, GSH konjugatlarının besiyerinde kimyasal ya da enzimatik yollarla hızlı bir şekilde metabolize olduğunu ve

bu nedenle sınırlı süreyle saptanabildiğini, buna karşılık Cys konjugatlarının HaCaT hücre kültüründe daha stabil yapılar olduğunu göstermektedir.

Konjugat profillerinde zamanla gözlenen değişim, literatürde tanımlanan merkapturik asit metabolizması ile tutarlıdır. Bu biyotransformasyon yolunda, GSH konjugatları GGT ve dipeptidaz gibi membrana bağlı enzimlerin etkisiyle sırasıyla glutamat ve glisin gruplarını kaybederek Cys konjugatlarına dönüştürülmektedir. Hanna ve Anders tarafından da vurgulandığı üzere, bu dönüşüm GSH konjugatlarının birincil metabolik kaderidir ve bu süreç *in vitro* ortamlarda da işleyebilmektedir (248). Dolayısıyla, besiyerinde GSH konjugatlarının kısa süreli gözlenmesi, ardından Cys konjugatlarının daha uzun süre saptanabilir olması, bu metabolik dönüşüm zincirinin kültür sisteminde de gerçekleştiğine işaret etmektedir.

Merkapturik asit metabolizması, toksik elektrofilik maddeler için önemli bir biyotransformasyon yoludur ve GST enzimleri tarafından katalize edilen GSH konjugasyonu ile başlar (249). GST'ler, GSH'nin sülfhidril grubu aracılığıyla elektrofilik bileşiklerin reaksiyonunu katalize ederek potansiyel alkilleyici ajanların detoksifikasyonunda fizyolojik olarak önemli bir rol oynar. Hücreye giren elektrofiller, GST'ler aracılığıyla GSH-S konjugatlarına dönüştürülür ve protein taşıyıcıları (MRP1) tarafından hücre yüzeyine taşınır. Burada, ɣ-glutamil kısmı GGT ve glisin kalıntısı dipeptidaz tarafından parçalanır ve sisteinilglisin S-konjugatına dönüştürülür. Hem GGT hem de dipeptidazlar membrana bağlı enzimlerdir. Bu nedenle, GSH konjugatı hücre dışına taşındıktan sonra biyotransformasyon hücre dışında gerçekleşir ve ardından Cys konjugatı hücre içine yeniden taşınır (250). Bu durumda, GSH ve Cys konjugatlarının hem besiyerinde hem de hücre lizatlarında gözlenmesi beklenebilir. Çalışma sonuçlarımız hem besiyerinde hem de hücrelerde Cys ve GSH konjugatlarının varlığına işaret etmektedir ki bu da bu sürecin beklenen sonucuyla tutarlıdır. Bununla birlikte, GSH-ETETE-GSH konjugatının besiyerinden elde edilen örneklerde tespit edilememesinin, düşük sinyal yoğunluğu nedeniyle tespit limitinin altında kalması ve hızlı hücresel metabolizmaya bağlı olarak ara metabolitlere dönüşmesi ile ilişkilendirilebilir. Bu bulgular, besiyerinde bu konjugatın izlenememesini açıklamaktadır.

Merkaptürik asit metabolizması, hücreye yeniden taşınan Cys konjugatının NAT tarafından NAC-S konjugatına dönüştürülmesiyle devam eder (251). Bununla birlikte, Cys konjugatlarının asetilasyonu biyolojik sistemde NAT enzimlerinin çoğunlukla renal proksimal tübüler hücrelerde bulunması nedeniyle burada gerçekleşmektedir. Ayrıca karaciğerde ise böbreğe kıyasla daha az eksprese edilir. Sonuç olarak, Cys-S konjugatlarının deri hücrelerinde NAC-S konjugatlarına dönüştürülemediği ve metabolize edilmeden biriktiği bildirilmiştir (252). Monofonksiyonel kükürtlü hardal bileşiği 2-kloroetil etil sülfür'e (CEES) maruz bırakılan HaCaT hücre kültüründe Cys ve GSH konjugatları tespit edilmiştir. Ancak, bu *in vitro* çalışmada NAC konjugatı tespit edilmemiştir. Ayrıca, ortamda tespit edilen GSH-CEES ve Cys-CEES miktarlarının doza bağlı olduğu ve Cys-CEES konsantrasyonunun tüm zaman noktalarında GSH-CEES'den daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar çalışmamızdan elde edilen verilerle tutarlıdır. Aynı çalışmada, CEES'e maruz bırakılan tüysüz SKH-1 farelerinden alınan plazma örnekleri maruziyetten bir gün sonra analiz edilmiş ve GSH-CEES, Cys-CEES ve NAC-CEES tespit edilmiştir. Ancak, GSH-CEES ve Cys-CEES konsantrasyonlarının NAC-CEES'ten çok daha düşük olduğu bildirilmiştir (252).

Yapılan başka bir çalışmada da tüysüz SKH-1 fareleri dermal olarak CEES'e maruz bırakılmıştır. Maruziyetten sonra farelerden elde edilen plazma örneklerinde yapılan analiz sonuçları GSH-CEES, Cys-CEES ve NAC-CEES metabolitlerinin varlığını göstermiştir. Metabolitlerin konsantrasyonu maruziyetten bir gün sonra en yüksek düzeyde belirlenmiş ve zamanla azaldığı tespit edilmiştir. Ancak, her üç metabolitin de 14 gün sonra hala ölçülebilir seviyelerde tespit edilebildiği bildirilmiştir. Tespit edilen birincil metabolitler Cys ve NAC metabolitleri olup, GSH-CEES konsantrasyonu diğerlerinden çok daha düşüktür (253).

Seskimustard ve CEES benzer kimyasal ve toksikolojik özelliklere sahip bileşiklerdir. Sonuç olarak, Q'ya maruz bırakılan hücrelerde tespit edilen GSH ve Cys konjugatlarının aynı şekilde *in vivo* maruziyetin ardından oluşabileceği varsayılmaktadır.

Sonuç olarak, çalışmamız kapsamında LC-HRMS ile yapıları daha önce tanımlanmış olan GSH ve Cys konjugatlarının, HaCaT hücre kültürü modeli kullanılarak gerçekleştirilen deneysel maruziyetlerde de oluştuğu gösterilmiştir. Böylece, Q'nun canlı bir sistemde endojen nükleofillerle etkileşime girerek konjugat oluşturma kapasitesi ilk kez doğrulanmış ve bu bileşiklerin biyolojik olarak da meydana gelebildiği ortaya konmuştur. Literatürde Q'nun biyolojik sistemlerle etkileşimini ele alan herhangi bir çalışma bulunmadığından, bu çalışma alandaki ilk bilimsel veriyi sunarak katkı sağlamaktadır. Elde edilen bulgular hem Q'nun toksikolojik açıdan değerlendirilmesi hem de biyobelirteç temelli doğrulama stratejilerinin geliştirilmesi açısından gelecekte yürütülecek çalışmalar için önemli bir referans niteliği taşımaktadır.

5.2.2. HaCaT Hücre Kültüründe Q'nun DNA Katım Ürünlerinin Tespiti

Seskimustardın HaCaT hücrelerinde DNA ile doğrudan etkileşime girerek kovalent katım ürünleri oluşturabildiği, bu çalışma kapsamında ilk kez deneysel olarak gösterilmiştir. Önceki bölümlerde LC-HRMS ile yapıları tanımlanmış olan üç DNA katım ürünü, Q'ya maruz bırakılan hücrelerden izole edilen DNA örneklerinde LC-MS/MS (MRM) yöntemiyle güvenilir biçimde tespit edilmiştir. Bu bulgular, reaktif yapıdaki Q'nun DNA katım reaksiyonlarının hücrede de gerçekleştiğini doğrulamıştır. Analiz sonuçları, DNA katım ürünü oluşumunun Q konsantrasyonuna bağlı olarak arttığını ortaya koymuştur. HETETE-Ade, tüm örneklerde en yüksek sinyal şiddeti ve pik alanı değerleri ile öne çıkmıştır. Özellikle, HETETE-Ade'nin pik alanları, Gua-ETETE-Gua'ya kıyasla yaklaşık 10 kat, HETETE-Gua'ya kıyasla ise 1,5 kat daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, HETETE-Ade'nin diğer katım ürünlerine kıyasla analitik olarak daha yüksek sinyal oluşturduğunu ve daha kolay tespit edilebilir olduğunu ortaya koymaktadır.

Literatürde seskimustardın biyolojik sistemlerle etkileşimi sonucunda oluşan DNA katım ürünlerine yönelik herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, benzer yapısal özelliklere sahip olan HD ile gerçekleştirilen *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, bu tez kapsamında Q ile elde edilen bulguların karşılaştırmalı olarak

değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. HD maruziyeti sonrasında, HaCaT hücrelerinde hem monomerik adenin ve guanin katım ürünlerinin hem de dimerik guanin katım ürünlerinin oluştuğu bildirilmektedir (223). Ayrıca, bu katım ürünlerinin HD'ye maruz kalan bireylerin maruziyetten sonra kan örneklerinde 14. güne, idrar örneklerinde ise 30. güne kadar tespit edilebildiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, en fazla bulunan katım ürününün monomerik guanin katım ürünü olduğu bildirilmiştir (161). Buna karşılık, HD'nin bozunma ürünü olan divinil sülfona maruz bırakılan HaCaT hücrelerinde en yüksek düzeyde oluşan katım ürününün monomerik adenin katım ürünü olduğu bildirilmiştir (254). Bu veriler, maruziyet sonrası oluşan DNA katım ürünü oranlarının kimyasal ajanların yapısal benzerliklerine rağmen farklı olabileceğini göstermektedir.

Bu tez çalışmasının ilgili bölümünde, LC-HRMS yöntemi ile yapısal olarak tanımlanan üç farklı DNA katım ürününün, HaCaT hücre modeli kullanılarak yürütülen in vitro deneylerde de oluştuğu doğrulanmıştır. Hücrelerden izole edilen DNA örneklerinde bu ürünlere ait karakteristik iyon geçişlerinin LC-MS/MS yöntemiyle tespit edilmesi, Q'nun biyolojik sistemlerde DNA ile doğrudan etkileşime girerek kovalent bağlanma yeteneğine sahip olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, artan Q konsantrasyonuna paralel olarak DNA katım ürünlerinin seviyelerinde gözlenen doz-yanıt ilişkisi, bu etkileşimin biyolojik olarak anlamlı ve tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir. Elde edilen bulgular, Q'nun DNA ile etkileşimini deneysel olarak gösteren literatürdeki ilk çalışma niteliğindedir. Böylece, Q'nun da HD'ye benzer şekilde DNA ile alkilasyon reaksiyonuna girdiği hipotezini doğrulamaktadır. Bunun yanı sıra adli ve klinik uygulamalarda biyobelirteç olarak kullanılmaya uygun, stabil, uzun ömürlü ve yüksek özgüllüğe sahip üç DNA katım ürünü aydınlatılarak literatüre kazandırılmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, kimyasal savaş ajanı sınıfında yer alan ve HD'nin yapısal analoğu olan Q bileşiğinin, GSH, Cys ve DNA ile reaksiyona girerek oluşturduğu kovalent bağlanma ürünlerinin kütle spektrometrik yöntemlerle tanı ve doğrulaması amaçlanmıştır. Q'nun GSH, Cys ve ctDNA ile doğrudan reaksiyonları sonucunda elde edilen reaksiyon karışımlarından izole edilen fraksiyonlar kullanılarak konjugat ve katım ürünlerinin karakterizasyonu LC-HRMS yöntemiyle yapılmıştır. Bu yapıların biyolojik sistemlerde oluşup oluşmadığı ise Q'ya maruz bırakılan HaCaT hücrelerinden elde edilen numunelerin LC-MS/MS yöntemiyle analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir. GSH ve Cys konjugatları zaman ve doza bağlı olarak izlenmiş, DNA katım ürünleri ise yalnızca doza bağlı olarak değerlendirilmiştir.

1. Yapılan analizler sonucunda, Q'nun GSH ve Cys ile reaksiyona girerek GSH-ETETE-GSH, HETETE-GSH, Cys-ETETE-Cys ve HETETE-Cys olmak üzere dört özgül konjugat yapı oluşturduğu belirlenmiştir.
2. Söz konusu GSH konjugatların tümü, ilk kez bu tez çalışmasında kütle spektrometrik yöntemlerle tanımlanmıştır. HaCaT hücre kültürü modeline uygulanan Q maruziyeti sonrasında, bu yapıların tamamı biyolojik örneklerde başarıyla tespit edilmiştir. Özellikle GSH konjugatlarının zamanla Cys konjugatlarına dönüşüm gösterdiği gözlemlenmiş; bu durum, GSH konjugasyonunun yalnızca detoksifikasyonla sınırlı olmadığını, aynı zamanda Cys türevlerine dönüşerek biyotransformasyon zincirine dahil olabileceğini ortaya koymuştur. GSH ve Cys konjugatlarının oluşumu, doz ve zaman bağımlı olarak da değerlendirilebilmiştir.
3. Bununla birlikte, Q'nun DNA ile reaksiyonu sonucu oluşan üç yeni katım ürünü HETETE-Ade, HETETE-Gua ve Gua-ETETE-Gua bu tez kapsamında ilk kez tanımlanmıştır.
4. Belirlenen DNA katım ürünleri, Q'nun genotoksik potansiyeline dair önemli moleküler göstergeler sunmakta olup, yapısal özgüllükleri ve biyolojik kalıcılıkları sayesinde maruziyetin retrospektif olarak doğrulanmasında kullanılabilecek aday biyobelirteçler olarak değerlendirilmektedir. Elde edilen

veriler, Q'nun da HD gibi elektrofilik ara ürünleri aracılığıyla DNA alkilasyonu gerçekleştirdiğini ve toksisite mekanizmaları açısından benzer biyolojik etkilere yol açabileceğini göstermektedir.

5. Bu çalışmada, Q'nun GSH ve Cys ile oluşturduğu konjugatlar ile DNA üzerinde meydana getirdiği katım ürünleri güvenilir bir şekilde tanımlanmış ve bu yapıların tamamı literatürde ilk kez tanımlanan özgül biyobelirteçler arasında yer almıştır.
6. Tanımlanan bu yapılar yalnızca analitik açıdan anlam taşımamakta, aynı zamanda biyolojik sistemlerdeki varlıkları hem klinik doğrulama aracı olarak kullanılabilecek nitelikte hem de Kimyasal Silahlar Sözleşmesi'nin ihlali durumlarında retrospektif maruziyeti belgeleyebilecek adli bilimsel kanıt niteliği taşımaktadır.
7. Ayrıca, elde edilen bulgular Q'nun HD ile benzer toksikokinetik mekanizmalar üzerinden etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Bu ajanın biyotransformasyonu ve biyomoleküler etkileşimleri, toksisite mekanizmasının daha ayrıntılı şekilde anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Bu veriler, özellikle antidot geliştirme çalışmalarına bilimsel zemin oluşturması ve mevcut tedavi yaklaşımlarının iyileştirilmesine katkı sunması bakımından da önemlidir.

Gelecekte yapılması planlanabilecek çalışmalara yönelik değerlendirmeler aşağıda sunulmuştur:

- Bu tez çalışmasında Cys konjugatlarına kadar izlenen GSH konjugasyon yolağının devamında yer alan β-liyaz ve merkapturik asit metabolitlerinin varlığı belirlenmemiştir. Bu nedenle, ileride yapılacak çalışmalarda renal proksimal tübüler hücreler gibi uygun hücre kültürü modelleri kullanılarak, söz konusu ileri metabolitlerin oluşumu da araştırılabilir. Böylece, Q'nun biyotransformasyon profiline ilişkin literatüre daha bütüncül bir değerlendirme verisi sunulabilir.
- Bu tez çalışması, biyobelirteç adaylarının yapısal tanımlanmasına odaklanan kalitatif bir pilot çalışma niteliğindedir. Gelecekteki araştırmalarda, bu

bileşiklerin yüksek saflıkta referans standartları sentezlenerek kantitatif analizlerine yönelik analitik yöntemlerin validasyonu gerçekleştirilmelidir.

- Çalışmalarda kullanılacak biyolojik örneklerde, katım ürünlerinin izlenebilirliğini artırmak amacıyla numune hazırlama, temizleme ve zenginleştirme protokolleri geliştirilmelidir. Böylece daha düşük maruziyet dozlarında da söz konusu ürünleri tespit mümkün hale gelebilir.
- Q'ya ait tanımlanan biyobelirteçlerin in vivo hayvan modelleri kullanılarak canlı biyolojik sistemde de doğrulanması, bu yapıların biyolojik stabiliteleri, farmakokinetikleri ve vücut sıvılarındaki kalıcılık sürelerinin değerlendirilmesi açısından önemlidir.
- Ayrıca, tanımlanan konjugat ve katım ürünlerinin hücre düzeyindeki etkilerinin, DNA onarımı üzerindeki olası sonuçları ve hücresel savunma mekanizmalarıyla olan etkileşimleri de detaylı biçimde incelenmelidir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması, Q'nun toksisite mekanizmalarının aydınlatılmasına ve retrospektif maruziyet doğrulamasına yönelik güçlü bilimsel veriler sunmaktadır. Tanımlanan GSH, Cys konjugatları ve DNA katım ürünleri, kimyasal savaş ajanlarına maruziyetin belirlenmesinde yüksek potansiyele sahip biyobelirteçler olarak değerlendirilmekte; bu bulgular, kimyasal savaş ajanlarına maruz kalımın kanıtlanması yönünden hem literatüre bilimsel olarak katkı sunmakta hem de yeni tanı ve doğrulama yaklaşımlarının geliştirilmesine temel oluşturmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Fitzgerald GJ. Chemical warfare and medical response during World War I. American Journal Of Public Health. 2008;98(4):611-25.

2. Kimyasal Silahlar Sözleşmesi [Internet]. 1993 [Erişim Tarihi: 04.07.2025]. Erişim adresi: https://www.opcw.org/chemical-weapons-convention/articles.

3. Koblentz GD. Chemical-weapon use in Syria: atrocities, attribution, and accountability. The Nonproliferation Review. 2019;26(5-6):575-98.

4. Rafati-Rahimzadeh M, Rafati-Rahimzadeh M, Kazemi S, Moghadamnia AA. Therapeutic options to treat mustard gas poisoning–Review. Caspian Journal of Internal Medicine. 2019;10(3):241.

5. Holmgren KH, Hok S, Magnusson R, Larsson A, Åstot C, Koester C, et al. Synthesis route attribution of sulfur mustard by multivariate data analysis of chemical signatures. Talanta. 2018;186:615-21.

6. McElroy CS, Min E, Huang J, Loader JE, Hendry-Hofer TB, Garlick RB, et al. From the cover: catalytic antioxidant rescue of inhaled sulfur mustard toxicity. Toxicological Sciences. 2016;154(2):341-53.

7. Ghasemi H, Owlia P, Jalali-Nadoushan MR, Pourfarzam S, Azimi G, Yarmohammadi M-E, et al. A clinicopathological approach to sulfur mustard-induced organ complications: a major review. Cutaneous and Ocular Toxicology. 2013;32(4):304-24.

8. Rowell M, Kehe K, Balszuweit F, Thiermann H. The chronic effects of sulfur mustard exposure. Toxicology. 2009;263(1):9-11.

9. Wattana M, Bey T. Mustard gas or sulfur mustard: an old chemical agent as a new terrorist threat. Prehospital and Disaster Medicine. 2009;24(1):19-29.

10. Paromov V, Suntres Z, Smith M, Stone WL. Sulfur mustard toxicity following dermal exposure: role of oxidative stress, and antioxidant therapy. Journal of Burns and Wounds. 2007;7:e7.

11. Mishra N, Agarwal R. Research models of sulfur mustard-and nitrogen mustard-induced ocular injuries and potential therapeutics. Experimental Eye Research. 2022;223:109209.

12. Jiang N, Zhang P, Shen W, Zhang Y, Zhou W. Clinical and experimental research progress on neurotoxicity of sulfur mustard and its possible mechanisms. Toxicology. 2023;483:153372.

13. Nasiri L, Vaez-Mahdavi M-R, Ghazanfari T, Hassanpour H, Ardestani SK. Evaluation of metabolic profile following delayed toxicity of sulfur mustard in chemical veterans. Toxicologie Analytique et Clinique. 2025;37(2):153-8.

14. Bouhlel J, Caffin F, Gros-Désormeaux F, Douki T, Benoist J-F, Castelli FA, et al. Metabolomics Analysis of Rabbit Plasma after Ocular Exposure to Vapors of Sulfur Mustard. Metabolites. 2024;14(7):349.

15. Owens M, Thyagarajan A, Travers JB, Sahu RP. Mechanistic Insights and Pharmacological Approaches for Nitrogen and Sulfur Mustards and Their Implications as Therapeutic Agents. Journal of Applied Toxicology. 2025.

16. Sezigen S. Biomarkers of Sulfur Mustard (Mustard Gas) in Urine. Biomarkers in Toxicology: Springer; 2023. p. 705-25.

17. Timperley CM, Forman JE, Abdollahi M, Al-Amri AS, Baulig A, Benachour D, et al. Advice on assistance and protection provided by the Scientific Advisory Board of the Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons: Part 3. On medical care and treatment of injuries from sulfur mustard. Toxicology. 2021;463:152967.

18. Müller-Dott K, Raßmuß SC, Blum M-M, Thiermann H, John H, Steinritz D. Activation of the human TRPA1 channel by different alkylating sulfur and nitrogen mustards and structurally related chemotherapeutic drugs. Toxicology Letters. 2023;376:51-9.

19. D'Agostino PA, Provost LR. Capillary column isobutane chemical ionization mass spectrometry of mustard and related compounds. Biomedical & Environmental Mass Spectrometry. 1988;15(10):553-64.

20. D'Agostino P, Provost L. Capillary column gas chromatography-ammonia and deuterated ammonia chemical ionization mass spectrometry of sulfur vesicants. Journal of Chromatography A. 1992;600(2):267-72.

21. D'Agostino P, Provost L. Capillary column electron impact and ammonia chemical ionization gas chromatographic-mass spectrometric and gas chromatographic-tandem mass spectrometric analysis of mustard hydrolysis products. Journal of Chromatography A. 1993;645(2):283-92.

22. D'agostino P, Provost L, Hancock J. Analysis of mustard hydrolysis products by packed capillary liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. Journal of Chromatography a. 1998;808(1-2):177-84.

23. Timperley CM, Black RM, Bird M, Holden I, Mundy JL, Read RW. Hydrolysis and oxidation products of the chemical warfare agents 1, 2-bis [(2-chloroethyl) thio] ethane Q and 2, 2’-bis (2-chloroethylthio) diethyl ether T. Phosphorus, Sulfur, and Silicon. 2003;178(9):2027-46.

24. Kaushik MP, Rana H. Facile one-step synthesis of dithiaalkanediols. Organic Preparations and Procedures International. 2005;37(3):268-72.

25. Kanaujia PK, Tak V, Pardasani D, Gupta A, Jain R, Dubeya D. Gas chromatography electron ionization mass spectrometric analysis of trimethylsilyl derivatives of bis (2-hydroxyethylthio) alkanes and bis (2-hydroxyethylsulfonyl) alkanes. European Journal of Mass Spectrometry. 2006;12(4):261-9.

26. Lemire SW, Ash DH, Johnson RC, Barr JR. Mass spectral behavior of the hydrolysis products of sesqui-and oxy-mustard type chemical warfare agents in atmospheric pressure chemical ionization. Journal of the American Society for Mass Spectrometry. 2007;18(8):1364-74.

27. Tak V, Purohit A, Pardasani D, Goud DR, Jain R, Dubey D. Simultaneous detection and identification of precursors, degradation and co-products of chemical warfare agents in drinking water by ultra-high performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 2014;1370:80-92.

28. Sachin LS, Karthikraj R, Kumar KK, Sony T, Raju NP, Prabhakar S. Mass spectral studies on vinylic degradation products of sulfur mustards under gas chromatography/mass spectrometry conditions. European Journal of Mass Spectrometry. 2015;21(6):791-800.

29. Veeresham A, Sandeep M, Reddy TJ, Suresh Pal A, Srinivas K, Prabhakar S. Gas chromatography/mass spectrometry analysis of reaction products of sulfur mustards with phenol. European Journal of Mass Spectrometry. 2020;26(3):213-24.

30. Koskela H, Cavalcante SFdA, Ahmed S, Vanninen P. Quantum mechanical reference spectrum simulation for precursors and degradation products of chemicals relevant to the Chemical Weapons Convention. Magnetic Resonance in Chemistry. 2021;59(2):117-37.

31. Vokuev M, Braun A, Rybalchenko I, Rodin I. Determination of Hydrolytic Transformation Products of Sesquimustards in Water by High Resolution Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. Journal of Analytical Chemistry. 2023;78(14):1897-905.

32. Zhang M, You W, Liu Y, Cai J, Xu B, Chen J, et al. Evaluation of the degradation efficiency and possible mechanism of various chemical decontaminants on series of vesicant sulfur mustards. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements. 2025:1-10.

33. Read RW. Applications of mass spectrometry in investigations of alleged use of chemical warfare agents. In: Banoup J, editor. Detection of biological agents for the prevention of bioterrorism: Springer; 2010. p. 201-19.

34. Grabowski A, Richardt A, Blum MM. Chemical Warfare Agents. In: Richardt A, Blum MM, editors. Decontamination of Warfare Agents: Enzymatic methods for the removal of B/C weapons: John Wiley&Sons; 2008. p. 55-66.

35. Black R, Noort D. Methods for the retrospective detection of exposure to toxic scheduled chemicals. Part A: Analysis of free metabolites. In: Mesilaakso M, editor. Chemical Weapons Convention Chemicals Analysis: Sample Collection, Preparation and Analytical Methods: John Wiley&Sons; 2005. p. 403-31.

36. Noort D, Black RM. Methods for retrospective detection of exposure to toxic scheduled chemicals. Part B: Mass spectrometric and immunochemical analysis of covalent adducts to proteins and DNA. In: Mesilaakso M, editor. Chemical Weapons Convention Chemicals Analysis: John Wiley&Sons; 2005. p. 433-51.

37. Van der Schans M. Laboratory analysis of chemical warfare agents, adducts, and metabolites in biomedical samples. In: Gupta R, editor. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. 3. ed: Academic Press; 2020. p. 969-81.

38. Black RM, Noort D. Biological Markers of Exposure to Chemical Warfare Agents. In: Marrs T.C. MRL, Sidell F.R., editor. Chemical Warfare Agents. 2. ed: Wiley; 2007. p. 127-56.

39. Blum M-M, Richter A, Siegert M, Thiermann H, John H. Adduct of the blistering warfare agent sesquimustard with human serum albumin and its mass spectrometric identification for biomedical verification of exposure. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2020;412(28):7723-37.

40. Hemme M, Fidder A, van der Riet-van Oeveren D, van der Schans MJ, Noort D. Mass spectrometric analysis of adducts of sulfur mustard analogues to human plasma proteins: approach towards chemical provenancing in biomedical samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2021;413(15):4023-36.

41. Blum M-M, Schmeißer W, Dentzel M, Thiermann H, John H. The blistering warfare agent O-mustard (agent T) generates protein-adducts with human serum albumin useful for biomedical verification of exposure and forms intramolecular cross-links. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2024;416(26):5791-804.

42. Chen B, Liang D, Yu H, Liu C, Yuan L, Wang F, et al. A sensitive method for simultaneous screening exposure to 14 alkylating agents based on tripeptide adducts: an efficient approach for chemical weapon verification and chemical impurity profiling in plasma samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2025;417(15):3353-69.

43. Chen B, Zhang Q, Ren Z, Zhang T, Yu H, Liu C, et al. A proteomics strategy for the identification of multiple sites in sulfur mustard–modified HSA and screening potential biomarkers for retrospective analysis of exposed human plasma. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2022;414(14):4179-88.

44. Ataş HB, Cenk M, Bozkurt ENN. A proper and systematic qualitative method validation procedure and its application to gas chromatography-mass spectrometry analysis of Chemical Weapons Convention related chemicals. Forensic Science International. 2021;327:110974.

45. What is a Chemical Weapon? [Internet] 2025 [Erişim Tarihi: 04.07.2025]. Erişim adresi: https://www.opcw.org/our-work/what-chemical-weapon

46. Ganesan K, Raza S, Vijayaraghavan R. Chemical warfare agents. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. 2010;2(3):166-78.

47. Üzümcü A. The Chemical Weapons Convention—disarmament, science and technology. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2014;406(21):5071-3.

48. Costanzi S, Slavick CK, Hutcheson BO, Koblentz GD, Cupitt RT. Lists of chemical warfare agents and precursors from international nonproliferation frameworks: structural annotation and chemical fingerprint analysis. Journal of Chemical Information and Modeling. 2020;60(10):4804-16.

49. Annex on Chemicals [Internet]. 1993 [Erişim Tarihi: 04.07.2025]. Erişim adresi: https://www.opcw.org/chemical-weapons-convention/annexes/annex-chemicals/annex-chemicals.

50. Norman KW, Gillman VC. Chemical Warfare Agents. Wiley Encyclopedia of Forensic Science. 2: Wiley; 2009. p. 507-28.

51. Salem H, Ternay Jr AL, Smart JK. Brief history and use of chemical warfare agents in warfare and terrorism. Chemical Warfare Agents: CRC Press; 2019. p. 3-15.

52. Black R. Development, Historical Use and Properties of Chemical Warfare Agents. In: Worek F, Jenner J, Thiermann H, Thiermann H, Jenner J, Worek F, editors. Chemical Warfare Toxicology, Volume 1: Fundamental Aspects: The Royal Society of Chemistry; 2016. p. 1-28.

53. Szinicz L. History of chemical and biological warfare agents. Toxicology. 2005;214(3):167-81.

54. Tu A. Chemical and Biological Weapons and Terrorism: CRC Press; 2017.

55. Richardt A, Sabath F. A glance back–myths and facts about CBRN incidents. CBRN Protection: Managing the Threat of Chemical, Biological, Radioactive and Nuclear Weapons. 2013:1-38.

56. Chauhan S, D'cruz R, Faruqi S, Singh K, Varma S, Singh M, et al. Chemical warfare agents. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2008;26(2):113-22.

57. Riches JR, Read RW, Black RM, Cooper NJ, Timperley CM. Analysis of clothing and urine from Moscow theatre siege casualties reveals carfentanil and remifentanil use. Journal of Analytical Toxicology. 2012;36(9):647-56.

58. Sezigen S, Kenar L. Recent sulfur mustard attacks in Middle East and experience of health professionals. Toxicology Letters. 2020;320:52-7.

59. John H, van der Schans MJ, Koller M, Spruit HE, Worek F, Thiermann H, et al. Fatal sarin poisoning in Syria 2013: forensic verification within an international laboratory network. Forensic toxicology. 2018;36:61-71.

60. McKeigue P, Mason J, Miller D, Robinson P. Briefing note: The alleged chemical attack in Douma on 7 April 2018, and other alleged chlorine attacks in Syria since 2014. Working Group on Syria, Propaganda and Media. 2018;20.

61. Sezigen S, Kenar L. Hardal gazına maruz kalmış kimyasal yaralıların tıbbi yönetiminin retrospektif değerlendirilmesi ve öneriler. Osmangazi Tıp Dergisi. 2020.

62. Nepovimova E, Kuca K. The history of poisoning: from ancient times until modern ERA. Archives of toxicology. 2019;93(1):11-24.

63. Haslam JD, Russell P, Hill S, Emmett SR, Blain PG. Chemical, biological, radiological, and nuclear mass casualty medicine: a review of lessons from the Salisbury and Amesbury Novichok nerve agent incidents. British Journal of Anaesthesia. 2022;128(2):e200-e5.

64. Steindl D, Boehmerle W, Körner R, Praeger D, Haug M, Nee J, et al. Novichok nerve agent poisoning. The Lancet. 2021;397(10270):249-52.

65. Pitschmann V. Overall view of chemical and biochemical weapons. Toxins. 2014;6(6):1761-84.

66. Steinritz D, Thiermann H. Sulfur Mustard. In: Brent J, Burkhart K, Dargan P, Hatten B, Megarbane B, Palmer R, et al., editors. Critical Care Toxicology: Diagnosis and Management of the Critically Poisoned Patient. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 2683-712.

67. Sadeghi M, Balali-Mood B. Chemistry of mustard compounds. In: Balali-Mood M, Abdollahi M, editors. Basic and Clinical Toxicology of Mustard Compounds. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 1-27.

68. Bennett GM, Whincop EM. CCXI.—Some derivatives of monothioethylene glycol. Journal of the Chemical Society, Transactions. 1921;119(0):1860-4.

69. Rosen R, Reid EE. Sesqui-mustard gas or bis-β-chloro-ethyl ether of ethylene dithio-glycol. Journal of the American Chemical Society. 1922;44(3):634-6.

70. Giannakoudakis DA, Bandosz TJ. Detoxification of Chemical Warfare Agents. 2018. 978-3 p.

71. Smith PA. Gas chromatographic analysis of chemical warfare agents. In: Poole CF, editor. Gas Chromatography (Second Edition). Amsterdam: Elsevier; 2012. p. 875-900.

72. Costanzi S. Chemical warfare agents. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology Wiley. 2020:1-32.

73. Geoghegan J, Tong JL. Chemical warfare agents. Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain. 2006;6(6):230-4.

74. Kuča K, Pohanka M. Chemical warfare agents. In: Luch A, editor. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Volume 2: Clinical Toxicology. Basel: Birkhäuser Basel; 2010. p. 543-58.

75. Ghabili K, Agutter PS, Ghanei M, Ansarin K, Panahi Y, Shoja MM. Sulfur mustard toxicity: history, chemistry, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. Critical Reviews in Toxicology. 2011;41(5):384-403.

76. Jabbour RE, Salem H, Sidell FR. Blister Agents/Vesicants. In: Wexler P, editor. Encyclopedia of Toxicology. 3. ed. Oxford: Academic Press; 2014. p. 522-5.

77. Balali-Mood M. Early and delayed effects of sulfur mustard in Iranian veterans after the Iraq–Iran conflict. In: Gupta RC, editor. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. 3 ed. Boston: Academic Press; 2020. p. 55-65.

78. Young RA, Bast CB. Blister agents. In: Gupta RC, editor. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. 3 ed. Boston: Academic Press; 2020. p. 149-69.

79. Munro NB, Talmage SS, Griffin GD, Waters LC, Watson AP, King JF, et al. The sources, fate, and toxicity of chemical warfare agent degradation products. Environmental Health Perspectives. 1999;107(12):933-74.

80. Ellison DH. Handbook of chemical and biological warfare agents. 2 ed. Boca Raton: CRC press; 2007.

81. Blister Agents. In: Hoenig SL, editor. Compendium of Chemical Warfare Agents. New York, NY: Springer New York; 2007. p. 1-46.

82. Sulfur Mustard [Internet]. 2025 [Erişim Tarihi: 04.07.2025]. Erişim adresi: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bis_2-chloroethyl_sulfide.

83. Sesquimustard [Internet]. 2025 [Erişim Tarihi: 04.07.2025]. Erişim adresi: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/19092.

84. Wagner GW, Maciver BK, Rohrbaugh DK, Yang Y-C. Thermal degradation of bis (2-chloroethyl) sulfide (mustard gas). Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements. 1999;152(1):65-76.

85. Avigo L, Hallez F, Combès A, Desoubries C, Albaret C, Bossée A, et al. Analytical methods based on liquid chromatography for the analysis of albumin adducts involved in retrospective biomonitoring of exposure to mustard agents. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2024;416(9):2173-88.

86. Black R, Brewster K, Harrison J, Stansfield N. The chemistry of 1, 1'-Thiobis-(2-chloroethane)(Sulphur mustard) Part I. Some simple derivatives. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements. 1992;71(1-4):31-47.

87. Malhotra R, Ganesan K, Sugendran K, Swamy R. Chemistry and toxicology of sulphur mustard-a review. Defence Science Journal. 1999;49(2):97.

88. Wang Q-Q, Begum RA, Day VW, Bowman-James K. Sulfur, oxygen, and nitrogen mustards: stability and reactivity. Organic & Biomolecular Chemistry. 2012;10(44):8786-93.

89. St Quintin TD, Leslie DR, Collins JG. Hydrolysis of sesquimustards. Australian Journal of Chemistry. 2003;56(4):309-13.

90. Oheix E, Gravel E, Doris E. Catalytic processes for the neutralization of sulfur mustard. Chemistry–A European Journal. 2021;27(1):54-68.

91. Kehe K, Szinicz L. Medical aspects of sulphur mustard poisoning. Toxicology. 2005;214(3):198-209.

92. Vairetti M, Di Pasqua LG, Cagna M, Richelmi P, Ferrigno A, Berardo C. Changes in glutathione content in liver diseases: an update. Antioxidants. 2021;10(3):364.

93. Jafari M. Dose-and time-dependent effects of sulfur mustard on antioxidant system in liver and brain of rat. Toxicology. 2007;231(1):30-9.

94. Layali I, Shahriary A, Rahmani Talatappe N, Tahmasbpour E, Rostami H, Beigi Harchegani A. Sulfur mustard triggers oxidative stress through glutathione depletion and altered expression of glutathione-related enzymes in human airways. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 2018;40(4):290-6.

95. Beigi Harchegani A, Tahmasbpour E, Borna H, Imamy A, Ghanei M, Shahriary A. Free radical production and oxidative stress in lung tissue of patients exposed to sulfur mustard: an overview of cellular and molecular mechanisms. Chemical Research in Toxicology. 2018;31(4):211-22.

96. Liu L, Hu X, Zhang N, Zhong Y, Zhu X-j, Liu T. Oxidative stress reactions in rats with pulmonary injuries induced by sulfur mustard (1 LD50). Human & Experimental Toxicology. 2024;43:09603271241308772.

97. Mostafalou S, Abdollahi M. Basic Pharmacology and Toxicology. In: Balali-Mood M, Abdollahi M, editors. Basic and Clinical Toxicology of Mustard Compounds. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 49-61.

98. Mol MA, Smith WJ. Ca2+ homeostasis and Ca2+ signalling in sulphur mustard-exposed normal human epidermal keratinocytes. Chemico-Biological Interactions. 1996;100(1):85-93.

99. Sawyer TW, Hamilton MG. Effect of intracellular calcium modulation on sulfur mustard cytotoxicity in cultured human neonatal keratinocytes. Toxicology in Vitro. 2000;14(2):149-57.

100. Smith M, Stone W, Guo R, Ward P, Suntres Z, Mukherjee S, et al. Vesicants and oxidative stress. 2008.

101. Kehe K, Balszuweit F, Steinritz D, Thiermann H. Molecular toxicology of sulfur mustard-induced cutaneous inflammation and blistering. Toxicology. 2009;263(1):12-9.

102. Nourani MR, Mahmoodzadeh Hosseini H, Azimzadeh Jamalkandi S, Imani Fooladi AA. Cellular and molecular mechanisms of acute exposure to sulfur mustard: a systematic review. Journal of Receptors and Signal Transduction. 2017;37(2):200-16.

103. Pirzad G, Jafari M, Tavana S, Sadrayee H, Ghavami S, Shajiei A, et al. The Role of Fas-FasL Signaling Pathway in Induction of Apoptosis in Patients with Sulfur Mustard-Induced Chronic Bronchiolitis. Journal of Toxicology. 2010;2010(1):373612.

104. Khateri S, Balali-Mood M, Blain P, Williams F, Jowsey P, Soroush MR, et al. DNA damage and repair proteins in cellular response to sulfur mustard in Iranian veterans more than two decades after exposure. Toxicology Letters. 2018;293:67-72.

105. Panahi Y, Fattahi A, Nejabati HR, Abroon S, Latifi Z, Akbarzadeh A, et al. DNA repair mechanisms in response to genotoxicity of warfare agent sulfur mustard. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2018;58:230-6.

106. Khan F, Niaz K, Ismail Hassan F, Abdollahi M. An evidence-based review of the genotoxic and reproductive effects of sulfur mustard. Archives of Toxicology. 2017;91(3):1143-56.

107. Liu F, Jiang N, Xiao Z-y, Cheng J-p, Mei Y-z, Zheng P, et al. Effects of poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibition on sulfur mustard-induced cutaneous injuries in vitro and in vivo. PeerJ. 2016;4:e1890.

108. Jowsey PA, Williams FM, Blain PG. DNA damage responses in cells exposed to sulphur mustard. Toxicology Letters. 2012;209(1):1-10.

109. Tahmasbpour E, Reza Emami S, Ghanei M, Panahi Y. Role of oxidative stress in sulfur mustard-induced pulmonary injury and antioxidant protection. Inhalation Toxicology. 2015;27(13):659-72.

110. Pourfarzam S, Ardestani SK, Jamali T, Ghazanfari H, Naghizadeh MM, Faghihzadeh S, et al. Distinct inflammatory profiles in mustard lung: A study of sulfur mustard-exposed patients with serious pulmonary complications. International Immunopharmacology. 2025;146:113832.

111. Malaviya R, Sunil VR, Cervelli J, Anderson DR, Holmes WW, Conti ML, et al. Inflammatory effects of inhaled sulfur mustard in rat lung. Toxicology and Applied Pharmacology. 2010;248(2):89-99.

112. Weinberger B, Malaviya R, Sunil VR, Venosa A, Heck DE, Laskin JD, et al. Mustard vesicant-induced lung injury: Advances in therapy. Toxicology and Applied Pharmacology. 2016;305:1-11.

113. Tewari-Singh N, Agarwal R. Mustard vesicating agent–induced toxicity in the skin tissue and silibinin as a potential countermeasure. Annals of the New York Academy of Sciences. 2016;1374(1):184-92.

114. Etemad L, Moshiri M, Balali-Mood M. Advances in treatment of acute sulfur mustard poisoning–a critical review. Critical Reviews in Toxicology. 2019;49(3):191-214.

115. Balali-Mood M, Hefazi M. The clinical toxicology of sulfur mustard. Archives of Iranian Medicine. 2005;8(3):162-79.

116. Altmann HJ, Oelze S, Niemeyer B. Chemical agents–Small molecules with deadly properties. CBRN Protection: Managing the Threat of Chemical, Biological, Radioactive and Nuclear Weapons. 2013:67-101.

117. Nair A, Yadav P, Behl A, Sharma RK, Kulshrestha S, Butola BS, et al. Toxic blister agents: Chemistry, mode of their action and effective treatment strategies. Chemico-Biological Interactions. 2021;350:109654.

118. Gray JP, Shakarjian MP, Gerecke DR, Casillas RP. Dermal toxicity of sulfur mustard. In: Gupta RC, editor. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents 3.ed. Boston: Academic Press; 2020. p. 613-39.

119. Kumar V, Kim H, Pandey B, James TD, Yoon J, Anslyn EV. Recent advances in fluorescent and colorimetric chemosensors for the detection of chemical warfare agents: a legacy of the 21st century. Chemical Society Reviews. 2023;52(2):663-704.

120. Gasson E, McCombie H, Williams A, Woodward F. 10. New organic sulphur vesicants. Part IV. 1: 2-Di-(2-chloroethylthio) ethane and its analogues. Journal of the Chemical Society (Resumed). 1948:44-6.

121. Sawyer TW, McNeely K, Louis K, Lecavalier P, Song Y, Villanueva M, et al. Comparative toxicity of mono-and bifunctional alkylating homologues of sulphur mustard in human skin keratinocytes. Toxicology. 2017;382:36-46.

122. McNutt PM, Nguyen DL, Nelson MR, Lyman ME, Eisen MM, Ondeck CA, et al. Corneal endothelial cell toxicity determines long-term outcome after ocular exposure to sulfur mustard vapor. Cornea. 2020;39(5):640-8.

123. 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.

124. Sezigen S, Eyison RK, Kilic E, Kenar L. Evidence of sulfur mustard exposure in victims of chemical terrorism by detection of urinary β-lyase metabolites. Clinical Toxicology. 2020;58(1):36-44.

125. Ghorani-Azam A, Balali-Mood M. Clinical Pharmacology and Toxicology of Mustard Compounds. In: Balali-Mood M, Abdollahi M, editors. Basic and Clinical Toxicology of Mustard Compounds. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 63-99.

126. Balali-Mood M, Hefazi M. The pharmacology, toxicology, and medical treatment of sulphur mustard poisoning. Fundamental & Clinical Pharmacology. 2005;19(3):297-315.

127. Darchini-Maragheh E, Nemati-Karimooy H, Hasanabadi H, Balali-Mood M. Delayed neurological complications of sulphur mustard and tabun poisoning in 43 Iranian veterans. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 2012;111(6):426-32.

128. 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.

129. Jl W. Clinical management of mustard gas casualties. Ann Med Militaris Belgicae. 1989:1-60.

130. Rajaei M, Rejaei P, Balalimoud M. Nursing care of acute sulfur mustard poisoning. 2010.

131. Dachir S, Fishbeine E, Meshulam Y, Sahar R, Amir A, Kadar T. Potential anti-inflammatory treatments against cutaneous sulfur mustard injury using the mouse ear vesicant model. Human & Experimental Toxicology. 2002;21(4):197-203.

132. Dachir S, Fishbeine E, Meshulam Y, Sahar R, Chapman S, Amir A, et al. Amelioration of sulfur mustard skin injury following a topical treatment with a mixture of a steroid and a NSAID. Journal of Applied Toxicology: An International Journal. 2004;24(2):107-13.

133. Babin MC, Ricketts KM, Gazaway MY, Lee RB, Sweeney RE, Brozetti JJ. A combination drug treatment against ocular sulfur mustard injury. Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology. 2005;23(1):65-75.

134. Pleyer U, Sherif Z, Baatz H, Hartmann C. Delayed mustard gas keratopathy: clinical findings and confocal microscopy. American Journal of Ophthalmology. 1999;128(4):506-7.

135. Ghanei M, Khalili ARH, Arab MJ, Mojtahedzadeh M, Aslani J, Lessan-Pezeshki M, et al. Diagnostic and therapeutic value of short-term corticosteroid therapy in

exacerbation of mustard gas-induced chronic bronchitis. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology. 2005;97(5):302-5.

136. Panahi Y, Ghanei M, Hajhashemi A, Sahebkar A. Effects of curcuminoids-piperine combination on systemic oxidative stress, clinical symptoms and quality of life in subjects with chronic pulmonary complications due to sulfur mustard: a randomized controlled trial. Journal of Dietary Supplements. 2016;13(1):93-105.

137. Panahi Y, Ghanei M, Vahedi E, Ghazvini A, Parvin S, Madanchi N, et al. Effect of recombinant human IFNγ in the treatment of chronic pulmonary complications due to sulfur mustard intoxication. Journal of Immunotoxicology. 2014;11(1):72-7.

138. Chilcott R, Jenner J, Carrick W, Hotchkiss S, Rice P. Human skin absorption of bis-2-(chloroethyl) sulphide (sulphur mustard) in vitro. Journal of Applied Toxicology: An International Journal. 2000;20(5):349-55.

139. Nagy SM, Golumbic C, Stein WH, Fruton JS, Bergmann M. The penetration of vesicant vapors into human skin. Journal of General Physiology. 1946;29(6):441-69.

140. Hambrook J, Howells D, Schock C. Biological fate of sulphur mustard (1, 1'-thiobis (2-chloroethane)): uptake, distribution and retention of 35S in skin and in blood after cutaneous application of 35S-sulphur mustard in rat and comparison with human blood in vitro. Xenobiotica. 1993;23(5):537-61.

141. Benson JM, Tibbetts BM, Weber WM, Grotendorst GR. Uptake, tissue distribution, and excretion of 14C-sulfur mustard vapor following inhalation in F344 rats and cutaneous exposure in hairless guinea pigs. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. 2011;74(13):875-85.

142. John H, Balszuweit F, Steinritz D, Kehe K, Worek F, Thiermann H. Toxicokinetic aspects of nerve agents and vesicants. In: Gupta RC, editor. Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents. 3 ed. Boston: Academic Press; 2020. p. 875-919.

143. Drasch G, Kretschmer E, Kauert G, Von Meyer L. Concentrations of mustard gas [bis (2-chloroethyl) sulfide] in the tissues of a victim of a vesicant exposure. Journal of Forensic Sciences. 1987;32(6):1788-93.

144. Xu B, Zong C, Zhang Y, Zhang T, Wang X, Qi M, et al. Accumulation of intact sulfur mustard in adipose tissue and toxicokinetics by chemical conversion and isotope-dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Archives of toxicology. 2017;91:735-47.

145. Maisonneuve A, Callebat I, Debordes L, Coppet L. Biological fate of sulphur mustard in rat: toxicokinetics and disposition. Xenobiotica. 1993;23(7):771-80.

146. Schwenk M. Chemical warfare agents. Classes and targets. Toxicology letters. 2018;293:253-63.

147. Langenberg JP, van der Schans MJ, Noort D. Toxicokinetics of Sulfur Mustard. In: Worek F, Jenner J, Thiermann H, Thiermann H, Jenner J, Worek F, editors. Chemical Warfare Toxicology, Volume 1: Fundamental Aspects: The Royal Society of Chemistry; 2016. p. 191-212.

148. Schmeißer W, Lüling R, Steinritz D, Thiermann H, Rein T, John H. Transthyretin as a target of alkylation and a potential biomarker for sulfur mustard poisoning: electrophoretic and mass spectrometric identification and characterization. Drug Testing and Analysis. 2022;14(1):80-91.

149. Lüling R, Singer H, Popp T, John H, Boekhoff I, Thiermann H, et al. Sulfur mustard alkylates steroid hormones and impacts hormone function in vitro. Archives of Toxicology. 2019;93:3141-52.

150. Siegert M, Kranawetvogl A, Thiermann H, John H. N-Acetylcysteine as a chemical scavenger for sulfur mustard: New insights by mass spectrometry. Drug Testing and Analysis. 2018;10(2):243-53.

151. Davison C, Rozman RS, Smith PK. Metabolism of bis-β-chloroethyl sulfide (sulfur mustard gas). Biochemical Pharmacology. 1961;7(1):65-74.

152. Black R, Hambrook J, Howells D, Read R. Biological fate of sulfur mustard, 1, 1'-thiobis (2-chloroethane). Urinary excretion profiles of hydrolysis products and β-lyase metabolites of sulfur mustard after cutaneous application in rats. Journal of Analytical Toxicology. 1992;16(2):79-84.

153. Black R, Brewster K, Clarke R, Hambrook J, Harrison J, Howells D. Biological fate of sulphur mustard, 1, 1'-thiobis (2-chloroethane): isolation and identification of urinary metabolites following intraperitoneal administration to rat. Xenobiotica. 1992;22(4):405-18.

154. Black R, Read RW. Biological fate of sulphur mustard, 1, 1'-thiobis (2-chloroethane): identification of β-lyase metabolites and hydrolysis products in human urine. Xenobiotica. 1995;25(2):167-73.

155. Black RM, Clarke RJ, Read RW. Analysis of 1, 1'-sulphonylbis [2-(methylsulphinyl) ethane] and 1-methylsulphinyl-2-[2-(methylthio) ethylsulphonyllethane, metabolites of sulphur mustard, in urine using gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1991;558(2):405-14.

156. Black RM, Read RW. Improved methodology for the detection and quantitation of urinary metabolites of sulphur mustard using gas chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 1995;665(1):97-105.

157. 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. Journal of Chromatography B. 2013;917:100-7.

158. 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.

159. Witkiewicz Z, Neffe S. Chromatographic analysis of chemical warfare agents and their metabolites in biological samples. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2020;130:115960.

160. Jenner J. Toxicology of Vesicants. In: Worek F, Jenner J, Thiermann H, Thiermann H, Jenner J, Worek F, editors. Chemical Warfare Toxicology, Volume 1: Fundamental Aspects: The Royal Society of Chemistry; 2016. p. 29-80.

161. 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.

162. 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. Journal of Chromatography B. 2007;845(1):114-20.

163. Ash DH, Lemire SW, McGrath SC, McWilliams LG, Barr JR. Multianalyte quantification of five sesqui-and ethyl ether oxy-mustard metabolites in human urine by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry. Journal of Analytical Toxicology. 2008;32(1):44-50.

164. Li X-S, Yang F-c, Yan L, Wu J-N, Yuan L, Yang Y, et al. Simultaneous Quantification of Biomarkers for Bis-(2-chloroethyl) Sulfide and 1, 2-Bis (2-chloroethylthio) Ethane Exposure in Human Urine at Trace Exposure Levels by Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry via Simultaneous Incubation and Extraction. Chemical Research in Toxicology. 2023;36(9):1549-59.

165. Qi M, Xu B, Wu J, Zhang Y, Zong C, Chen J, et al. Simultaneous determination of sulfur mustard and related oxidation products by isotope-dilution LC–MS/MS method coupled with a chemical conversion. Journal of Chromatography B. 2016;1028:42-50.

166. Black R, Harrison J, Read R. Biological fate of sulphur mustard: in vitro alkylation of human haemoglobin by sulphur mustard. Xenobiotica. 1997;27(1):11-32.

167. Halme M, Pesonen M, Hakala U, Pasanen M, Vähäkangas K, Vanninen P. Applying human and pig hepatic in vitro experiments for sulfur mustard study: Screening and identification of metabolites by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2015;29(14):1279-87.

168. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2003;57(3-4):145-55.

169. Giustarini D, Colombo G, Garavaglia ML, Astori E, Portinaro NM, Reggiani F, et al. Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells. Free Radical Biology and Medicine. 2017;112:360-75.

170. Cooper AJL, Hanigan MH. 10.17 - Metabolism of Glutathione S-Conjugates: Multiple Pathways. In: McQueen CA, editor. Comprehensive Toxicology (Third Edition). Oxford: Elsevier; 2018. p. 363-406.

171. Pantazides BG, Quiñones-González J, Nazario DMR, Crow BS, Perez JW, Blake TA, et al. A quantitative method to detect human exposure to sulfur and nitrogen mustards via protein adducts. Journal of Chromatography B. 2019;1121:9-17.

172. Noort D, Hulst AG, de Jong LP, Benschop HP. Alkylation of human serum albumin by sulfur mustard in vitro and in vivo: mass spectrometric analysis of a cysteine adduct as a sensitive biomarker of exposure. Chemical Research in Toxicology. 1999;12(8):715-21.

173. John H, Siegert M, Gandor F, Gawlik M, Kranawetvogl A, Karaghiosoff K, et al. Optimized verification method for detection of an albumin-sulfur mustard adduct at Cys34 using a hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer after direct plasma proteolysis. Toxicology Letters. 2016;244:103-11.

174. Steinritz D, Striepling E, Rudolf K-D, Schröder-Kraft C, Püschel K, Hullard-Pulstinger A, et al. Medical documentation, bioanalytical evidence of an accidental human exposure to sulfur mustard and general therapy recommendations. Toxicology Letters. 2016;244:112-20.

175. John H, Koller M, Worek F, Thiermann H, Siegert M. Forensic evidence of sulfur mustard exposure in real cases of human poisoning by detection of diverse albumin-derived protein adducts. Archives of toxicology. 2019;93:1881-91.

176. Chen B, Yu H-L, Liu S-L, Liu C-C, Liang L-H, Li X-H, et al. A sensitive quantification approach for detection of HETE-CP adduct after benzyl chloroformate derivatization using ultra-high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2019;411:3405-15.

177. Chen B, Ren Z, Zhang T, Yu H, Shu Z, Liu C, et al. Simultaneous quantification of multiple amino acid adducts from sulfur mustard-modified human serum albumin in plasma at trace exposure levels by ultra-high performance liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry after propionyl derivatization. Journal of Chromatography A. 2022;1678:463354.

178. Noort D, Fidder A, Degenhardt-Langelaan C, Hulst A. Retrospective detection of sulfur mustard exposure by mass spectrometric analysis of adducts to albumin and hemoglobin: an in vivo study. Journal of Analytical Toxicology. 2008;32(1):25-30.

179. Koryagina N, Shachneva M, Ukolov A, Savel'eva E, Khlebnikova N, Radilov A. An Improved Procedure for the Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Detection of the Globin Adduct of Sulfur Mustard. Journal of Analytical Chemistry. 2018;73:1269-74.

180. Hallez F, Combès A, Desoubries C, Bossée A, Pichon V. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the analysis of tryptic digest of human hemoglobin exposed to sulfur mustard. Journal of Chromatography B. 2021;1163:122518.

181. Noort D, Verheij ER, Hulst AG, de Jong LP, Benschop HP. Characterization of sulfur mustard induced structural modifications in human hemoglobin by liquid

chromatography− tandem mass spectrometry. Chemical Research in Toxicology. 1996;9(4):781-7.

182. Noort D, Hulst AG, Trap HC, de Jong LP, Benschop HP. Synthesis and mass spectrometric identification of the major amino acid adducts formed between sulphur mustard and haemoglobin in human blood. Archives of Toxicology. 1997;71:171-8.

183. BLACK* R, Clarke R, Harrison J, Read RW. Biological fate of sulphur mustard: identification of valine and histidine adducts in haemoglobin from casualties of sulphur mustard poisoning. Xenobiotica. 1997;27(5):499-512.

184. Noort D, Benschop H, Black R. Biomonitoring of exposure to chemical warfare agents: a review. Toxicology and Applied Pharmacology. 2002;184(2):116-26.

185. Noort D, Fidder A, Benschop H, De Jong L, Smith J. Procedure for monitoring exposure to sulfur mustard based on modified Edman degradation of globin. Journal of Analytical Toxicology. 2004;28(5):311-5.

186. Fidder A, Moes GW, Scheffer AG, van der Schans GP, Baan RA, de Jong LP, et al. Synthesis, characterization, and quantitation of the major adducts formed between sulfur mustard and DNA of calf thymus and human blood. Chemical Research in Toxicology. 1994;7(2):199-204.

187. van der Schans GP, Scheffer AG, Mars-Groenendijk RH, Fidder A, Benschop HP, Baan RA. Immunochemical detection of adducts of sulfur mustard to DNA of calf thymus and human white blood cells. Chemical Research in Toxicology. 1994;7(3):408-13.

188. Batal M, Boudry I, Cléry-Barraud C, Mouret S, Douki T. Relative yields of monomeric and dimeric adducts induced by sulphur mustard in isolated and cellular DNA as determined by HPLC/tandem mass spectrometry. Toxicological & Environmental Chemistry. 2013;95(2):260-76.

189. Cheng X, Liu C, Yang Y, Liang L, Chen B, Yu H, et al. Advances in sulfur mustard-induced DNA adducts: Characterization and detection. Toxicology Letters. 2021;344:46-57.

190. Ludlum DB, Austin-Ritchie P, Hagopian M, Niu T-Q, Yu D. Detection of sulfur mustard-induced DNA modifications. Chemico-Biological Interactions. 1994;91(1):39-49.

191. Zubel T, Bürkle A, Mangerich A. Mass spectrometric analysis of sulfur mustard-induced biomolecular adducts: are DNA adducts suitable biomarkers of exposure? Toxicology Letters. 2018;293:21-30.

192. Kehe K, Schrettl V, Thiermann H, Steinritz D. Modified immunoslotblot assay to detect hemi and sulfur mustard DNA adducts. Chemico-Biological Interactions. 2013;206(3):523-8.

193. Zhang Y, Yue L, Nie Z, Chen J, Guo L, Wu B, et al. Simultaneous determination of four sulfur mustard–DNA adducts in rabbit urine after dermal exposure by isotope-

dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B. 2014;961:29-35.

194. Wu H, Zhang Y, Xu H, Xu B, Chen J, Guo L, et al. Urinary Profile of alkylated DNA adducts and DNA oxidative damage in sulfur mustard-exposed rats revealed by mass spectrometry quantification. Chemical Research in Toxicology. 2023;36(9):1495-502.

195. Black RM, Read RW, Noort D. Methods for the retrospective detection of exposure to toxic scheduled chemicals: Analysis of free metabolites. In: Meyers RA, editor. Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation: Wiley; 2006. p. 1-32.

196. Steinritz D, Thiermann H. Verification of SM Exposure in Biological Samples. In: Balali-Mood M, Abdollahi M, editors. Basic and Clinical Toxicology of Mustard Compounds. Cham: Springer International Publishing; 2015. p. 349-58.

197. Black RM, Read RW. Liquid chromatography/mass spectrometry in analysis of chemicals related to the Chemical Weapons Convention. In: Mesilaakso M, editor. Chemical Weapons Convention Chemicals Analysis: Sample Collection, Preparation and Analytical Methods: Wiley; 2005. p. 283-320.

198. Thurman E, Ferrer I, Barceló D. Choosing between atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization interfaces for the HPLC/MS analysis of pesticides. Analytical Chemistry. 2001;73(22):5441-9.

199. Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. International Journal of Analytical Chemistry. 2012;2012(1):282574.

200. Oyler J, Maistros K, Oyler B, Kilgour D. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry in Analysis of Chemicals Related to the Chemical Weapons Convention. In: Meyers RA, editor. Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory and Instrumentation2006. p. 1-50.

201. Aleksenko S. Liquid chromatography with mass-spectrometric detection for the determination of chemical warfare agents and their degradation products. Journal of Analytical Chemistry. 2012;67(2):82-97.

202. Dong MW. Basic Terms and Concepts. Modern HPLC for Practicing Scientists. New Jersey: John Wiley & Sons; 2006. p. 15-46.

203. Dong MW. HPLC Columns and Trends. Modern HPLC for Practicing Scientists. New Jersey.: John Wiley & Sons; 2006. p. 47-75.

204. Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Basic concepts and the control of separation. Introduction to modern liquid chromatography. 3 ed. New Jersey: John Wiley & Sons; 2010. p. 15-82.

205. Dong MW. Introduction. In: Dong MW, editor. Modern HPLC for Practicing Scientists. New Jersey: John Wiley & Sons; 2006. p. 1-14.

206. Poole CF. Chapter 4 - The Column in Liquid Chromatography. In: Poole CF, editor. The Essence of Chromatography. Amsterdam: Elsevier Science; 2003. p. 267-429.

207. Swartz ME. UPLC™: an introduction and review. Journal of liquid chromatography & related technologies. 2005;28(7-8):1253-63.

208. Yandamuri N, Dinakaran SK. Advanced study of nano liquid chromatography and its application-a review. World Journal of Pharmaceutical Research. 2015;4:1355-67.

209. Gross JH. Introduction. Mass Spectrometry: A Textbook. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 1-28.

210. Gross JH. Electrospray Ionization. Mass Spectrometry: A Textbook. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 721-78.

211. Scigelova M, Makarov A. Orbitrap mass analyzer–overview and applications in proteomics. Proteomics. 2006;6(S2):16-21.

212. Brenton AG, Godfrey AR. Accurate mass measurement: terminology and treatment of data. Journal of the American Society for Mass Spectrometry. 2010;21(11):1821-35.

213. Marshall AG, Blakney GT, Chen T, Kaiser NK, McKenna AM, Rodgers RP, et al. Mass resolution and mass accuracy: how much is enough? Mass spectrometry. 2013;2(Special_Issue):S0009-S.

214. Gross JH. Isotopic Composition and Accurate Mass. Mass Spectrometry: A Textbook. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 85-150.

215. Covey TR, Schneider BB, Javaheri H, LeBlanc J, Ivosev G, Corr JJ, et al. ESI, APCI, and MALDI A comparison of the central analytical figures of merit: sensitivity, reproducibility, and speed. Electrospray and MALDI mass spectrometry: Fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications. 2010;2.

216. Gross JH. Chemical Ionization. Mass Spectrometry: A Textbook. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 439-96.

217. Gross JH. Instrumentation. Mass Spectrometry: A Textbook. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 151-292.

218. Gross JH. Tandem Mass Spectrometry. Mass Spectrometry: A Textbook. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 539-612.

219. Taylor PJ. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. Clinical biochemistry. 2005;38(4):328-34.

220. Lucini L, Pellegrino R, Cimino N, Kane D, Pretali L. QqQ and Q-TOF liquid chromatography mass spectrometry direct aqueous analysis of herbicides and their metabolites in water. International Journal of Mass Spectrometry. 2015;392:16-22.

221. Chen Y, Feng X, Li L, Zhang X, Song K, Diao X, et al. UHPLC-Q-TOF-MS/MS method based on four-step strategy for metabolites of hinokiflavone in vivo and in vitro. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2019;169:19-29.

222. Bielmann A, Sambiagio N, Wehr N, Gerber-Lemaire S, Bochet CG, Curty C. Synthesis of different glutathione–sulfur mustard adducts of verified and potential biomarkers. RSC Advances. 2018;8(42):23881-90.

223. Zubel T, Hochgesand S, John H, Steinritz D, Schmidt A, Bürkle A, et al. A mass spectrometric platform for the quantitation of sulfur mustard-induced nucleic acid adducts as mechanistically relevant biomarkers of exposure. Archives of Toxicology. 2019;93:61-79.

224. Kind T, Fiehn O. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. Bioanalytical Reviews. 2010;2:23-60.

225. Claesen J, Rockwood A, Gorshkov M, Valkenborg D. The isotope distribution: A rose with thorns. Mass Spectrometry Reviews. 2025;44(1):22-42.

226. Ruttkies C, Schymanski EL, Wolf S, Hollender J, Neumann S. MetFrag relaunched: incorporating strategies beyond in silico fragmentation. Journal of Cheminformatics. 2016;8:1-16.

227. Wen B, Fitch WL. Screening and characterization of reactive metabolites using glutathione ethyl ester in combination with Q-trap mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry. 2009;44(1):90-100.

228. Murphy CM, Fenselau C, Gutierrez PL. Fragmentation characteristic of glutathione conjugates activated by high-energy collisions. Journal of the American Society for Mass Spectrometry. 1992;3(8):815-22.

229. Brink A, Fontaine F, Marschmann M, Steinhuber B, Cece EN, Zamora I, et al. Post-acquisition analysis of untargeted accurate mass quadrupole time-of-flight MSE data for multiple collision-induced neutral losses and fragment ions of glutathione conjugates. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2014;28(24):2695-703.

230. Hamzah N, Kjellberg M, Vanninen P. Glutathione conjugation of nitrogen mustards: In vitro study. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2023;37(9):e9495.

231. Ma Y, Kind T, Yang D, Leon C, Fiehn O. MS2Analyzer: A software for small molecule substructure annotations from accurate tandem mass spectra. Analytical Chemistry. 2014;86(21):10724-31.

232. Braun AV, Rybal'chenko IV, Ponsov MA, Stavitskaya YV, Tikhomirov LA, Grechukhin AP. Optimization of a method for the determination of a mustard gas biomarker in human blood plasma by liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry. Journal of Analytical Chemistry. 2017;72(3):303-8.

233. Steinritz D, Lüling R, Siegert M, Herbert J, Mückter H, Taeger CD, et al. Alkylated epidermal creatine kinase as a biomarker for sulfur mustard exposure:

comparison to adducts of albumin and DNA in an in vivo rat study. Archives of Toxicology. 2021;95:1323-33.

234. Tretyakova N, Goggin M, Sangaraju D, Janis G. Quantitation of DNA adducts by stable isotope dilution mass spectrometry. Chemical Research in Toxicology. 2012;25(10):2007-35.

235. Hwa Yun B, Guo J, Bellamri M, Turesky RJ. DNA adducts: Formation, biological effects, and new biospecimens for mass spectrometric measurements in humans. Mass Spectrometry Reviews. 2020;39(1-2):55-82.

236. Guo J, Turesky RJ. Emerging technologies in mass spectrometry-based DNA adductomics. High-Throughput. 2019;8(2):13.

237. Gruppi F, Hejazi L, Christov PP, Krishnamachari S, Turesky RJ, Rizzo CJ. Characterization of nitrogen mustard formamidopyrimidine adduct formation of bis (2-chloroethyl) ethylamine with calf thymus DNA and a human mammary cancer cell line. Chemical Research in Toxicology. 2015;28(9):1850-60.

238. Zhao-xia W, Yu-long L, Jia C, Yan-qin L, Hua X, Jian-wei X. Mass Spectrometric Fragmentation Patterns of Nitrogen Mustard-DNA Adducts in Vitro. zggx. 2024;43(5):690-702.

239. Stornetta A, Villalta PW, Hecht SS, Sturla SJ, Balbo S. Screening for DNA alkylation mono and cross-linked adducts with a comprehensive LC-MS3 adductomic approach. Analytical Chemistry. 2015;87(23):11706-13.

240. Totsuka Y, Maesako Y, NAGAI M, KATO M, GI M, WANIBUCHI H, et al. Comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis) in the liver of rats treated with 1, 4-dioxane. Proceedings of the Japan Academy, Series B. 2020;96(5):180-7.

241. Möller C, Virzi J, Chang Y-J, Keidel A, Chao M-R, Hu C-W, et al. DNA modifications: biomarkers for the exposome? Environmental Toxicology and Pharmacology. 2024:104449.

242. La Barbera G, Shuler MS, Beck SH, Ibsen PH, Lindberg LJ, Karstensen JG, et al. Development of an untargeted DNA adductomics method by ultra-high performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. Talanta. 2025;282:126985.

243. Yuxia W, Lijun Y, Qin L, Jia C, Jianwei X. A sensitive high performance liquid chromatography–positive electrospray tandem mass spectrometry method for N7-[2-[(2-hydroxyethyl) thio]-ethyl] guanine determination. Journal of Chromatography B. 2011;879(19):1707-12.

244. Yue L, Wei Y, Chen J, Shi H, Liu Q, Zhang Y, et al. Abundance of Four Sulfur Mustard-DNA Adducts ex Vivo and in Vivo Revealed by Simultaneous Quantification in Stable Isotope Dilution–Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Chemical Research in Toxicology. 2014;27(4):490-500.

245. Yue L, Zhang Y, Chen J, Zhao Z, Liu Q, Wu R, et al. Distribution of DNA adducts and corresponding tissue damage of Sprague–Dawley rats with percutaneous exposure to sulfur mustard. Chemical Research in Toxicology. 2015;28(3):532-40.

246. Wang P, Zhang Y, Chen J, Guo L, Xu B, Wang L, et al. Analysis of different fates of DNA adducts in adipocytes post-sulfur mustard exposure in vitro and in vivo using a simultaneous UPLC-MS/MS quantification method. Chemical Research in Toxicology. 2015;28(6):1224-33.

247. Orlova O, Karakashev G, Savel'eva E. Simultaneous determination of sulfur mustard adducts with guanine and acetylcysteine in urine by high-resolution high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Analytical Chemistry. 2020;75(8):1011-7.

248. Hanna PE, Anders M. The mercapturic acid pathway. Critical Reviews in Toxicology. 2019;49(10):819-929.

249. Tierbach A, Groh KJ, Schoenenberger R, Schirmer K, Suter MJ-F. Characterization of the mercapturic acid pathway, an important phase II biotransformation route, in a zebrafish embryo cell line. Chemical Research in Toxicology. 2020;33(11):2863-71.

250. Hinchman CA, Ballatori N. Glutathione conjugation and conversion to mercapturic acids can occur as an intrahepatic process. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues. 1994;41(4):387-409.

251. Frigerio G, Mercadante R, Polledri E, Missineo P, Campo L, Fustinoni S. An LC-MS/MS method to profile urinary mercapturic acids, metabolites of electrophilic intermediates of occupational and environmental toxicants. Journal of Chromatography B. 2019;1117:66-76.

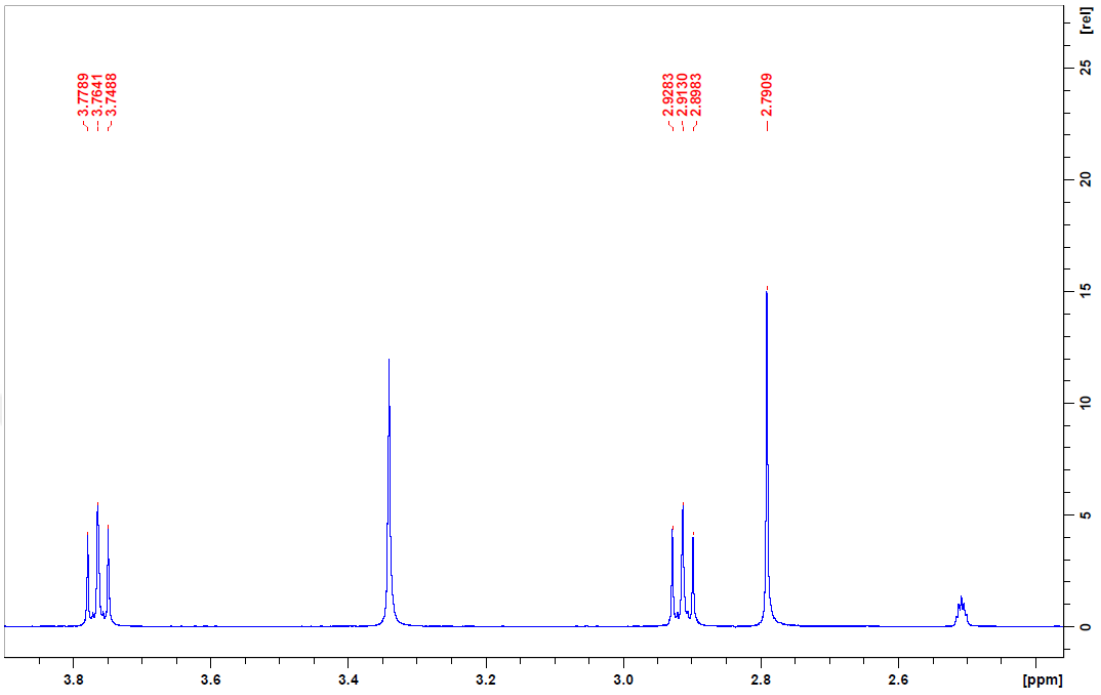
252. Roser M, Béal D, Eldin C, Gudimard L, Caffin F, Gros-Désormeaux F, et al. Glutathione conjugates of the mercapturic acid pathway and guanine adduct as biomarkers of exposure to CEES, a sulfur mustard analog. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2021;413:1337-51.

253. Gilardoni M, Léonço D, Caffin F, Gros-Désormeaux F, Eldin C, Béal D, et al. Evidence for the systemic diffusion of (2-chloroethyl)-ethyl-sulfide, a sulfur mustard analog, and its deleterious effects in brain. Toxicology. 2021;462:152950.

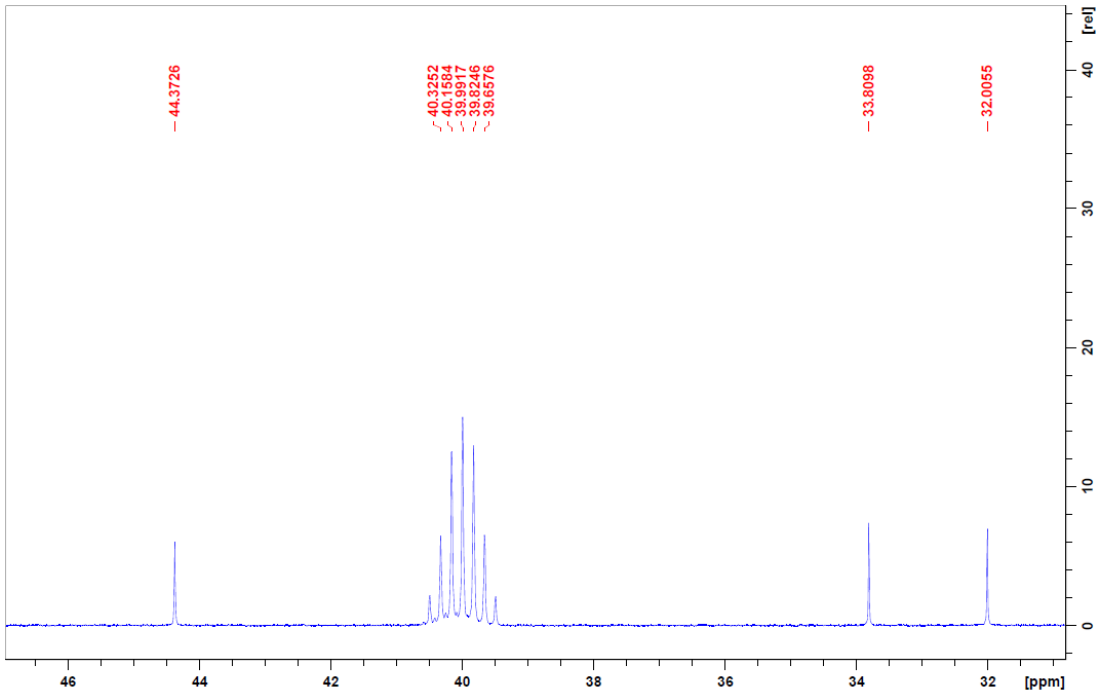
254. Lv S, Zhang Y, Xu B, Xu H, Zhao Y, Chen J, et al. Synthesis, characterization, and identification of new in vitro covalent DNA adducts of divinyl sulfone, an oxidative metabolite of sulfur mustard. Chemical Research in Toxicology. 2017;30(10):1874-82.

8. EKLER

Ek-1: Seskimustarda ait NMR sonuçları

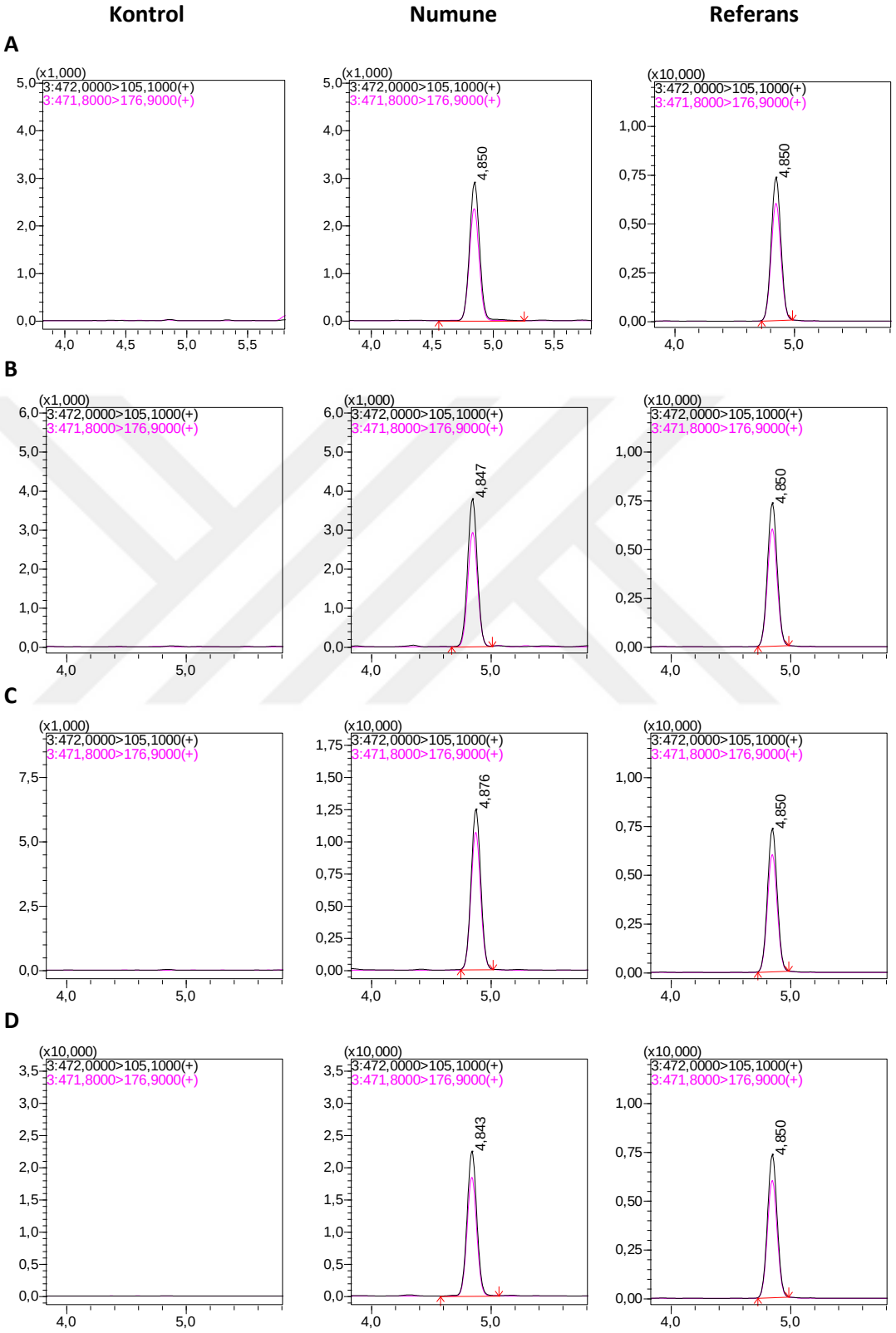


Seskimustard'a ait H-NMR sonucu. Q: ^{1}H-NMR ($(CD_3)_2SO$, 500 MHz): δ 2.79 (s, 4H, J = 0 Hz), δ 2.91 (t, 4H, J = 7.5 Hz), δ 3.76 (t, 4H, J = 7.5 Hz).

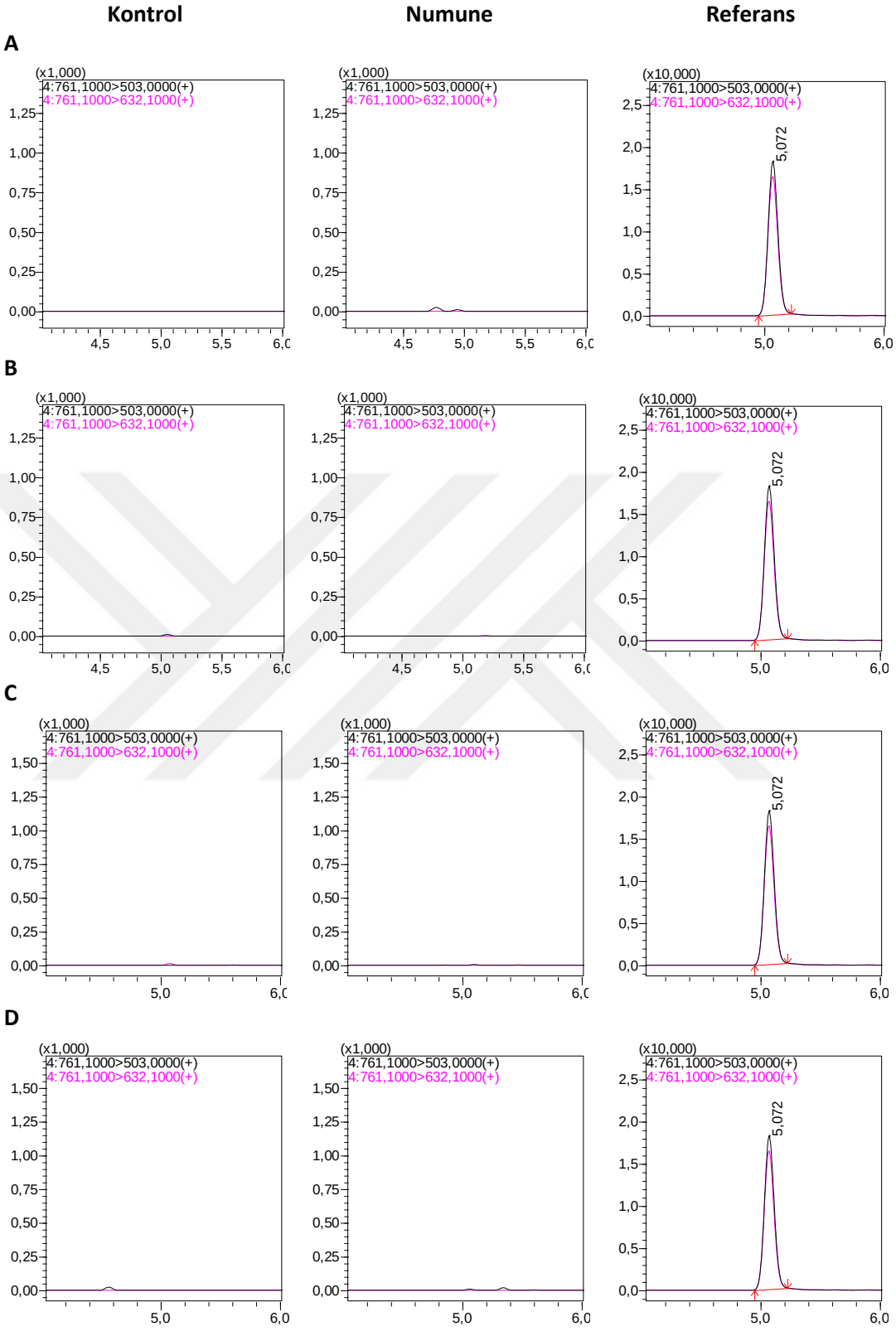


Seskimustard'a ait C-NMR sonucu. Q: ^{13}C-NMR ($(CD_3)_2SO$, 100 MHz): δ 32.01, 33.81, 44.37.

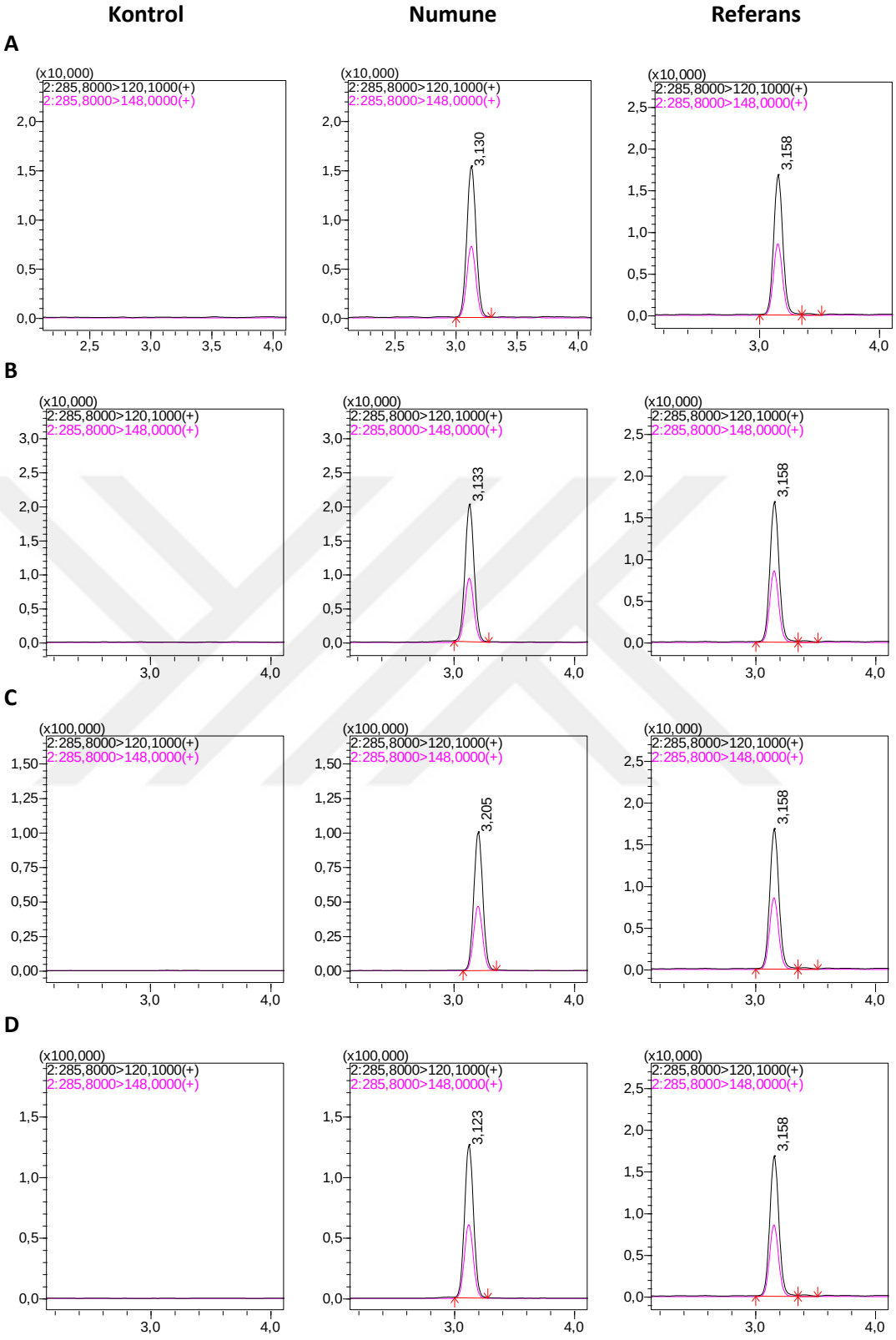
Ek-2: Tüm doz ve sürelerde besiyerinden alınan örneklere ait MRM kromatogramları



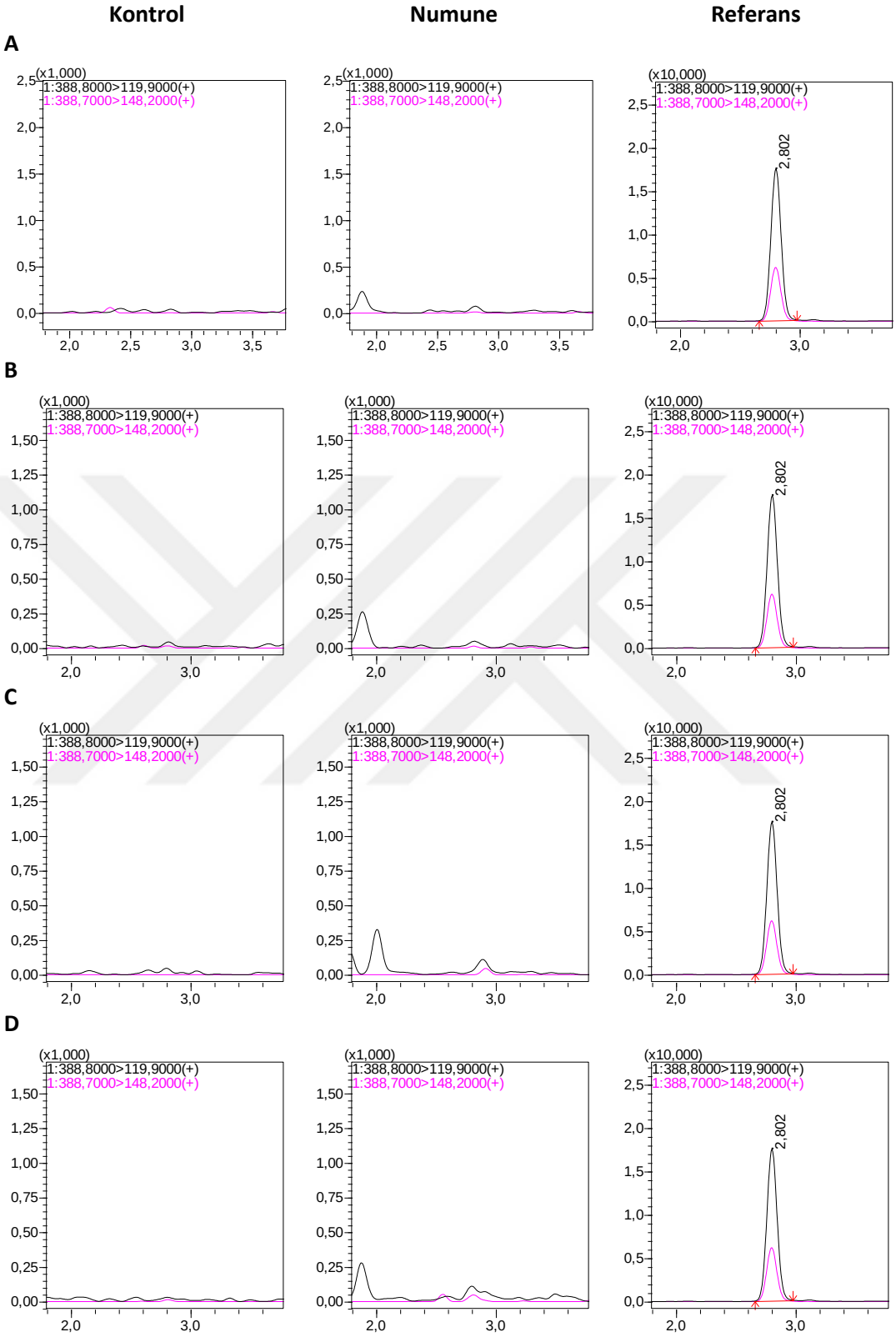
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde 0. dakikada HETETE-GSH'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



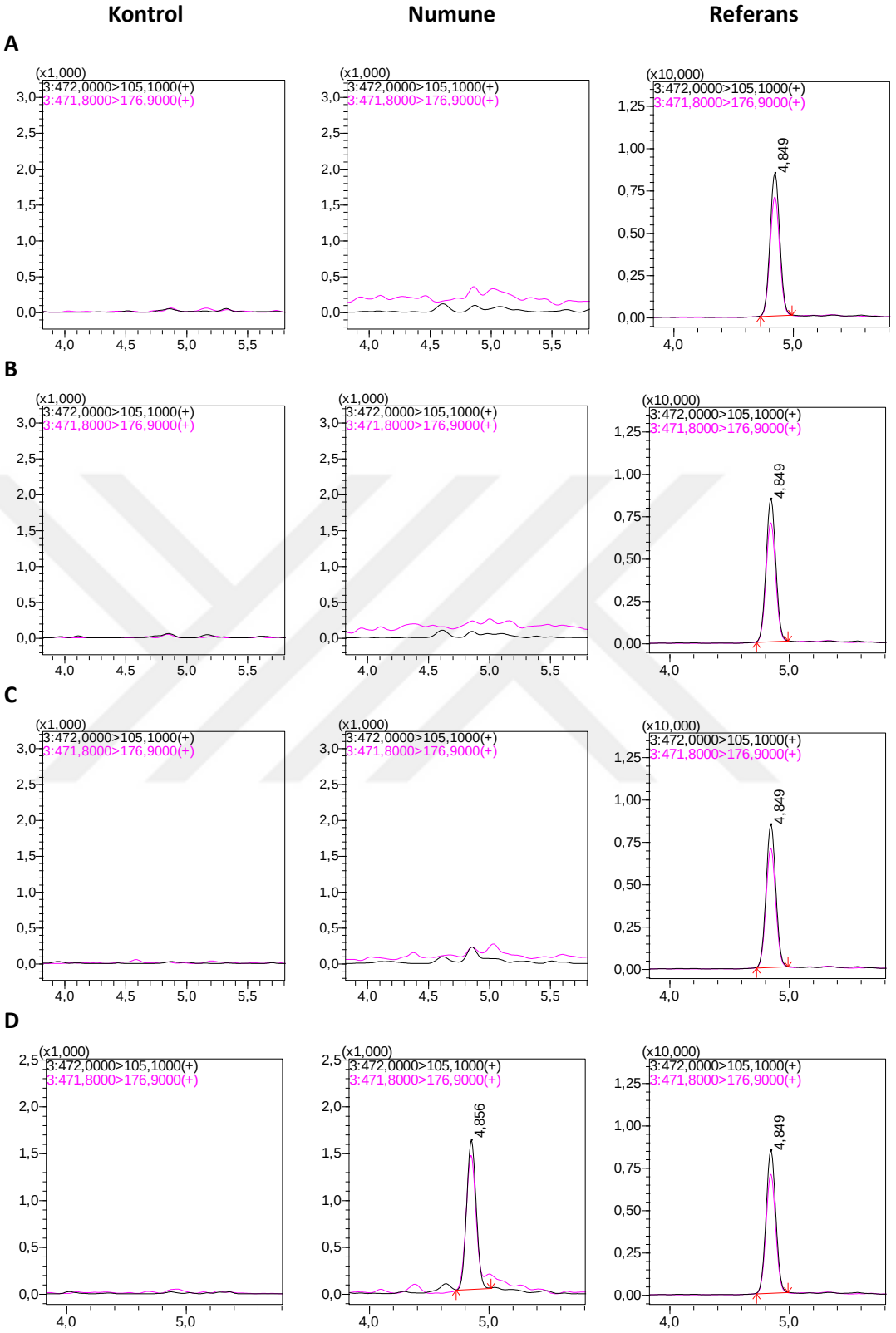
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde 0. dakikada GSH-ETETE-GSH'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



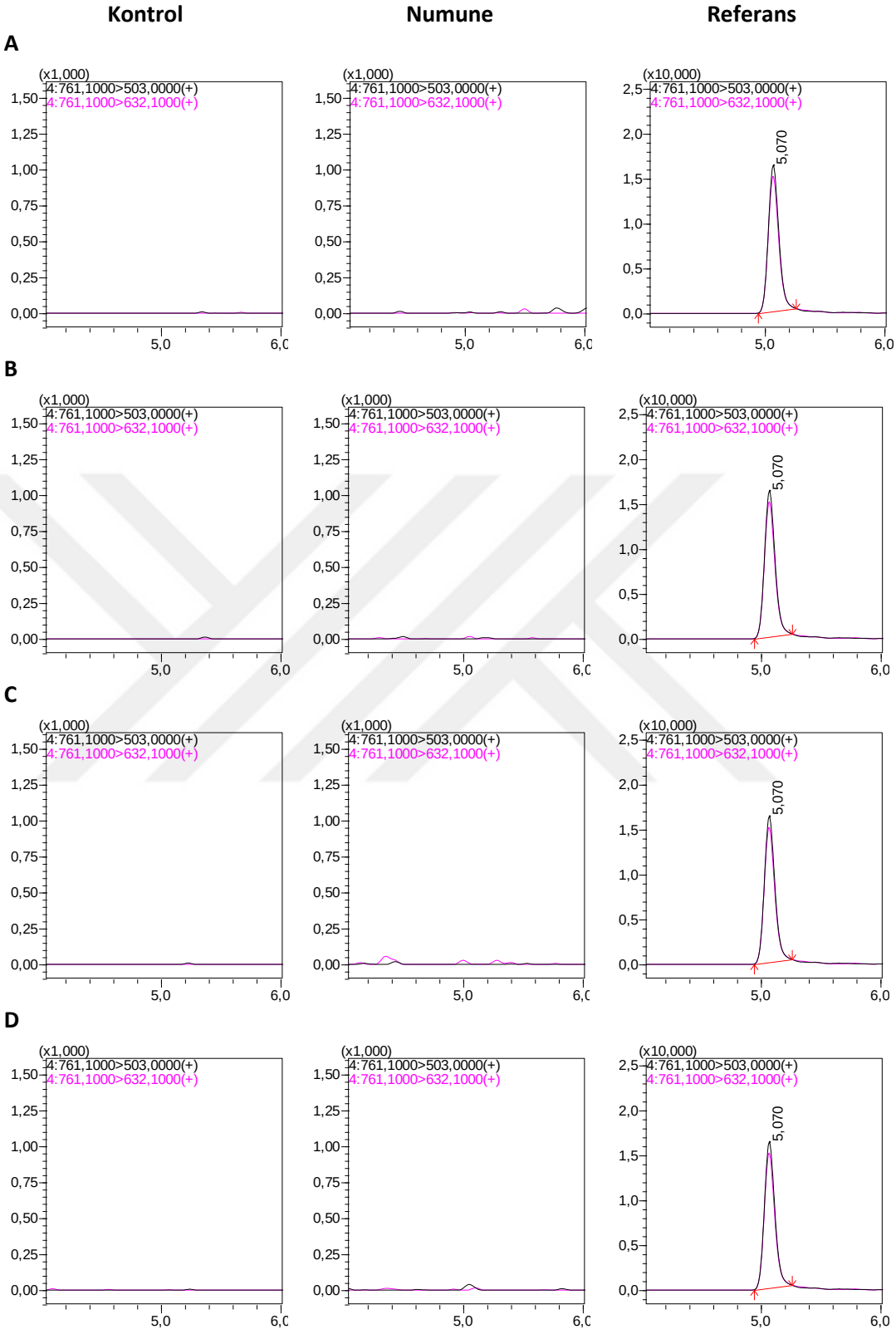
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde 0. dakikada HETETE-Cys'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



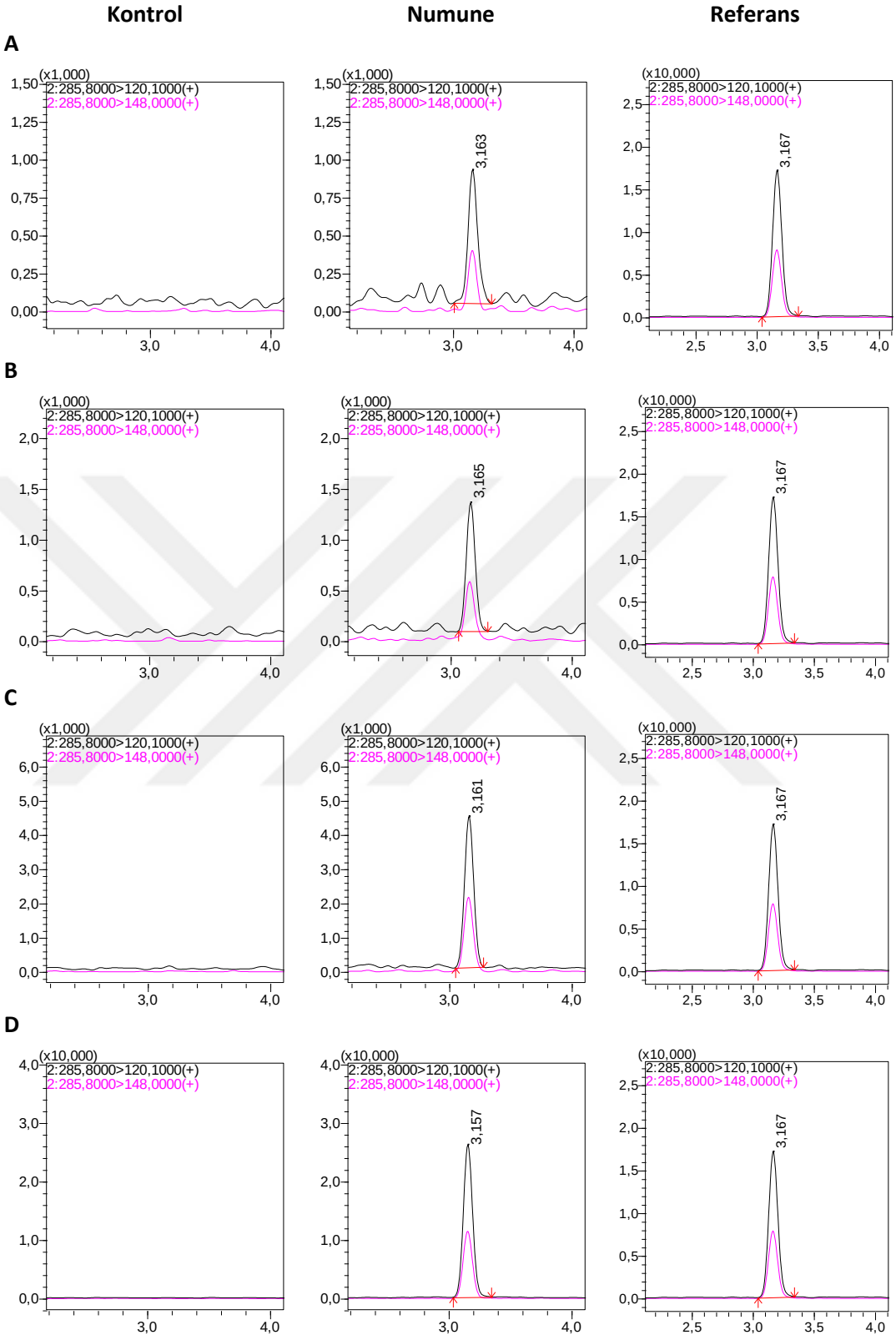
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde 0. dakikada Cys-ETETE-Cys'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



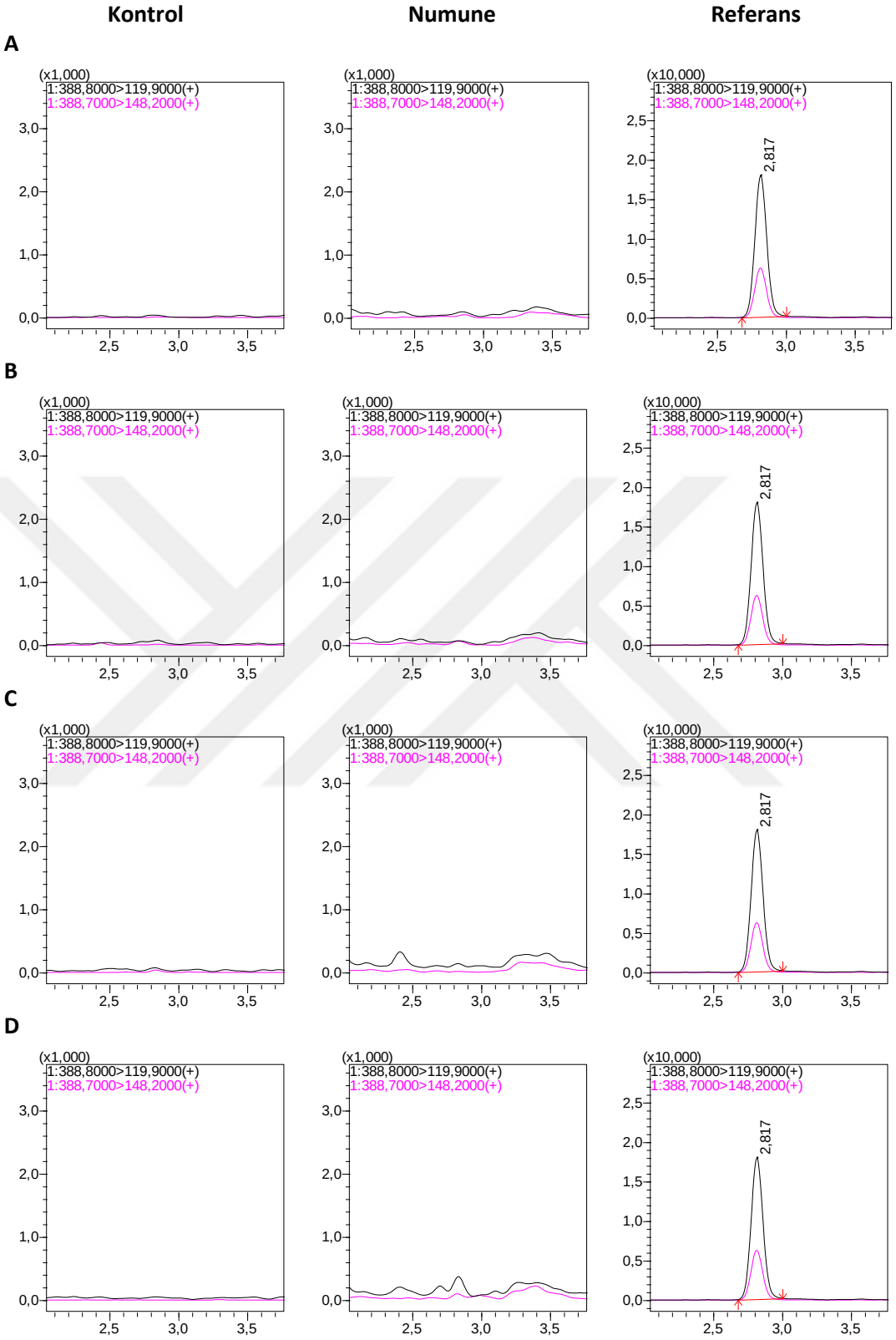
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde maruziyetten 10 dakika sonra HETETE-GSH'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



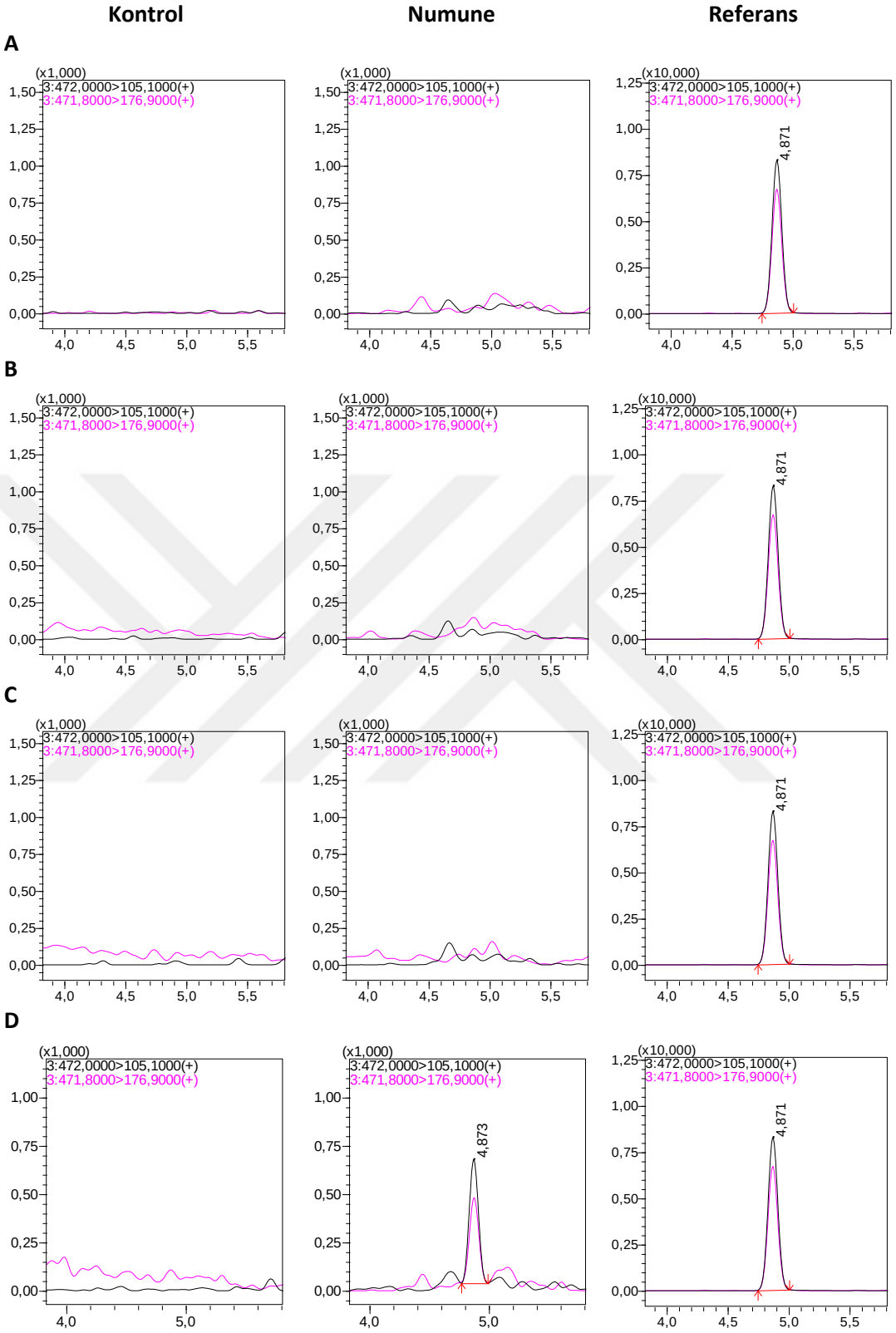
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde maruziyetten 10 dakika sonra GSH-ETETE-GSH'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



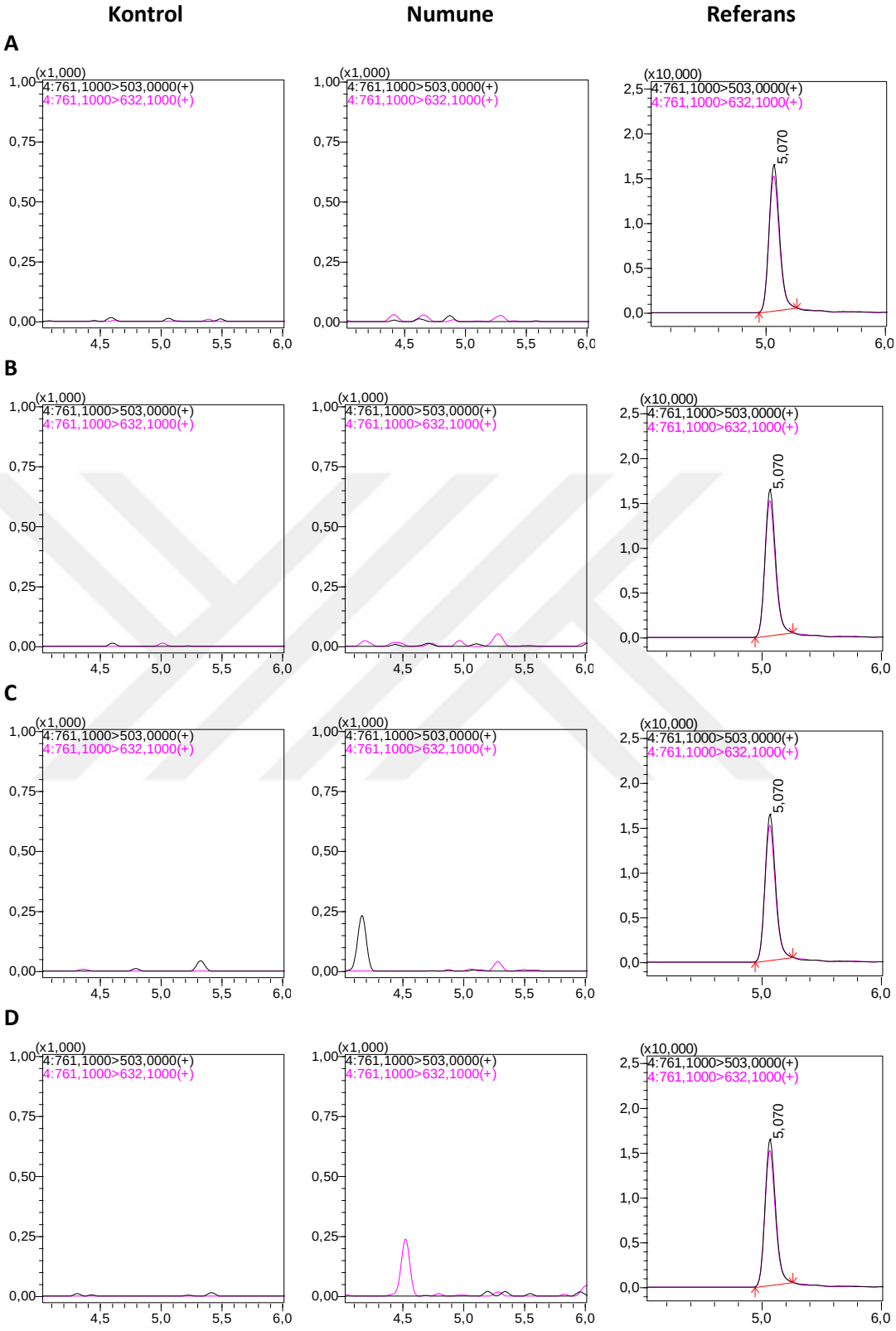
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde maruziyetten 10 dakika sonra HETETE-Cys'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



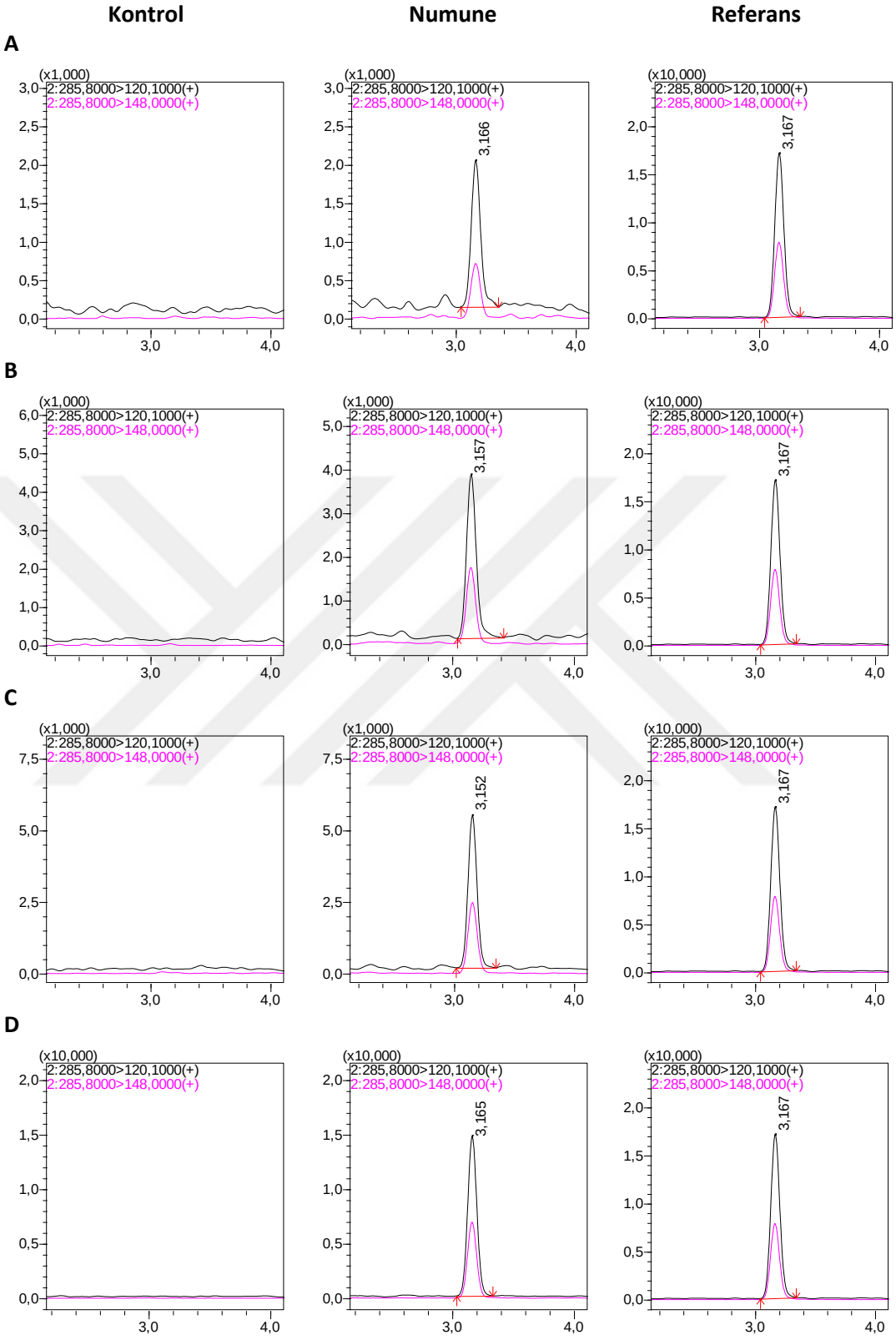
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde maruziyetten 10 dakika sonra Cys-ETETE-Cys'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



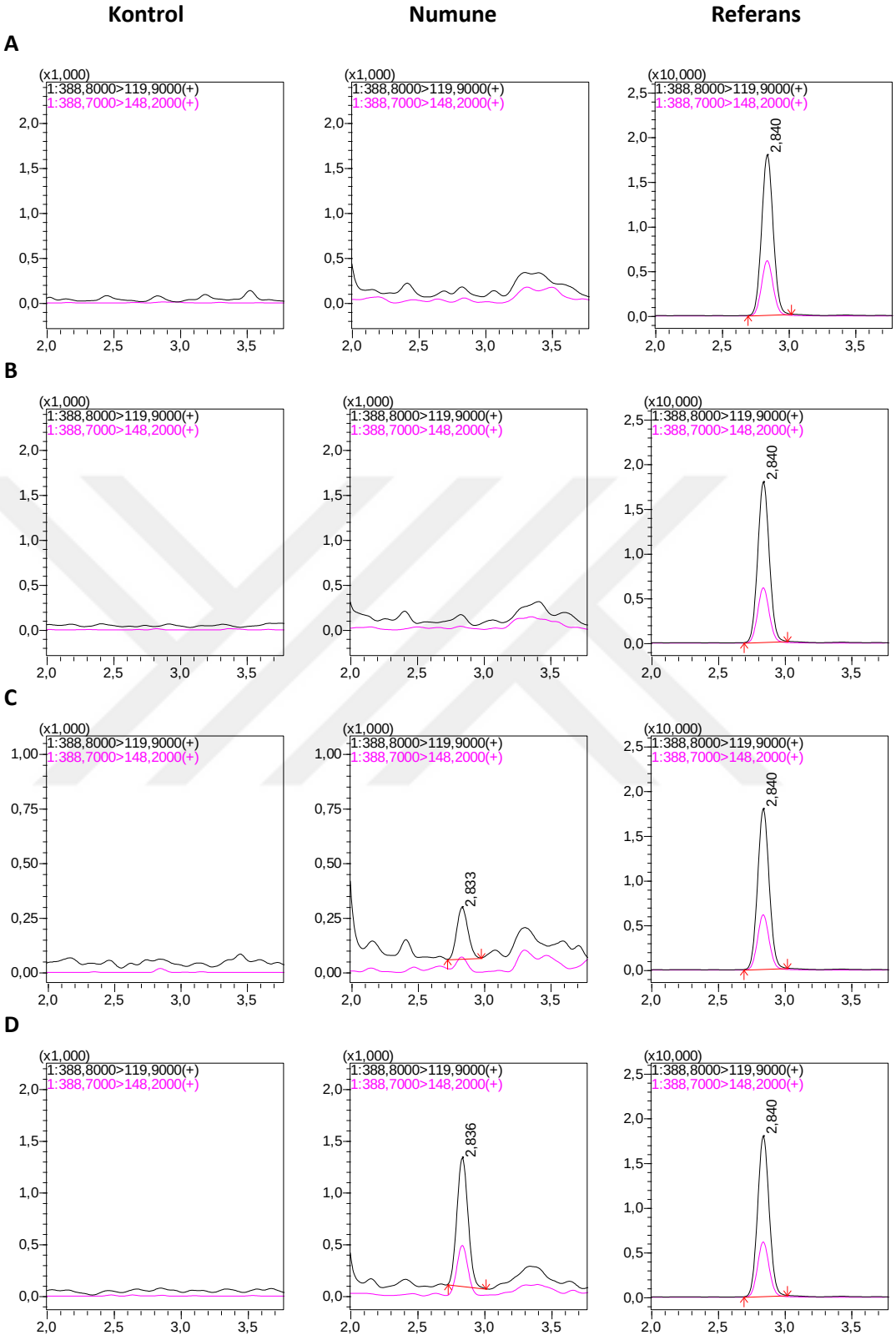
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde maruziyetten 1 saat sonra HETETE-GSH'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



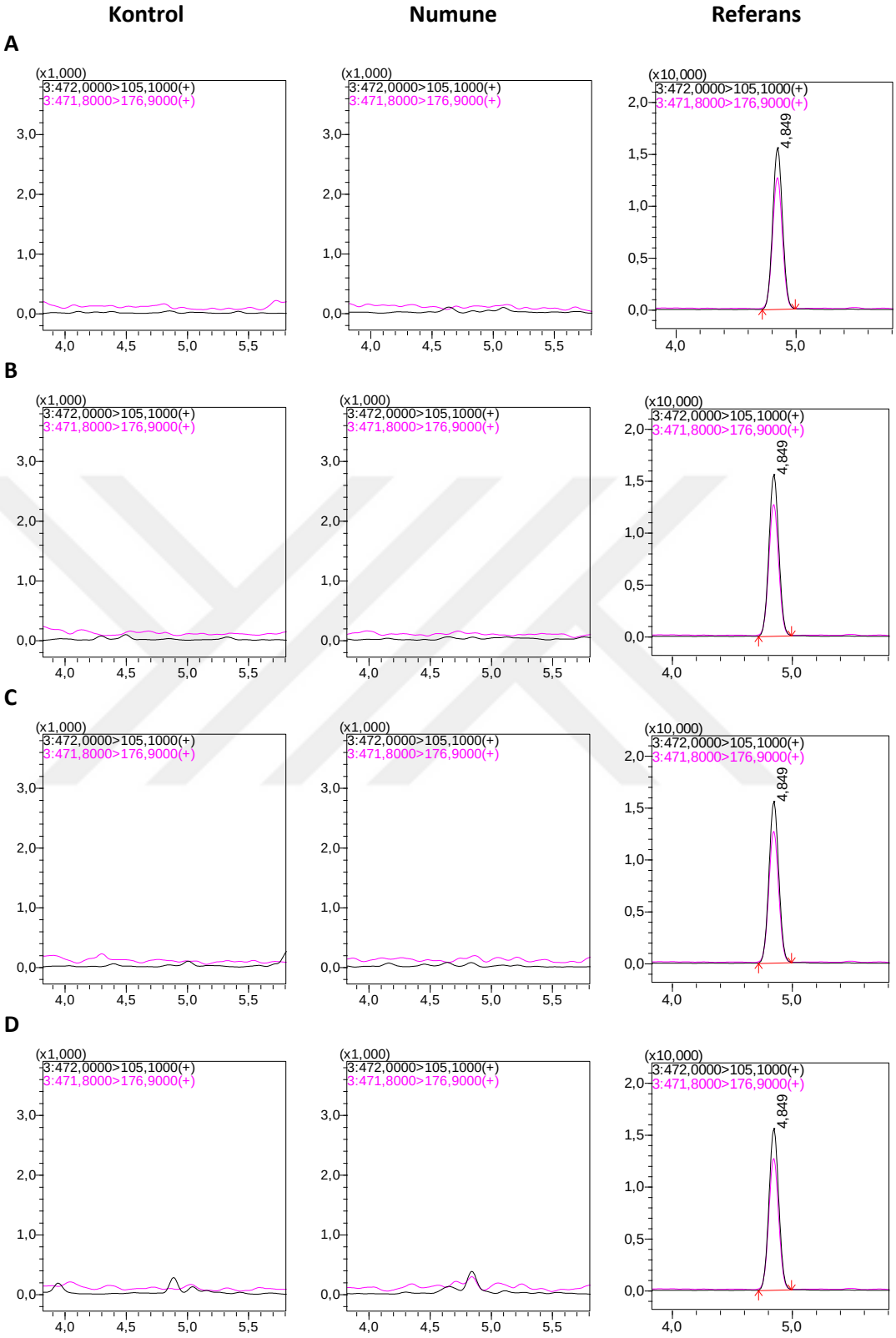
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde maruziyetten 1 saat sonra GSH-ETETE-GSH'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



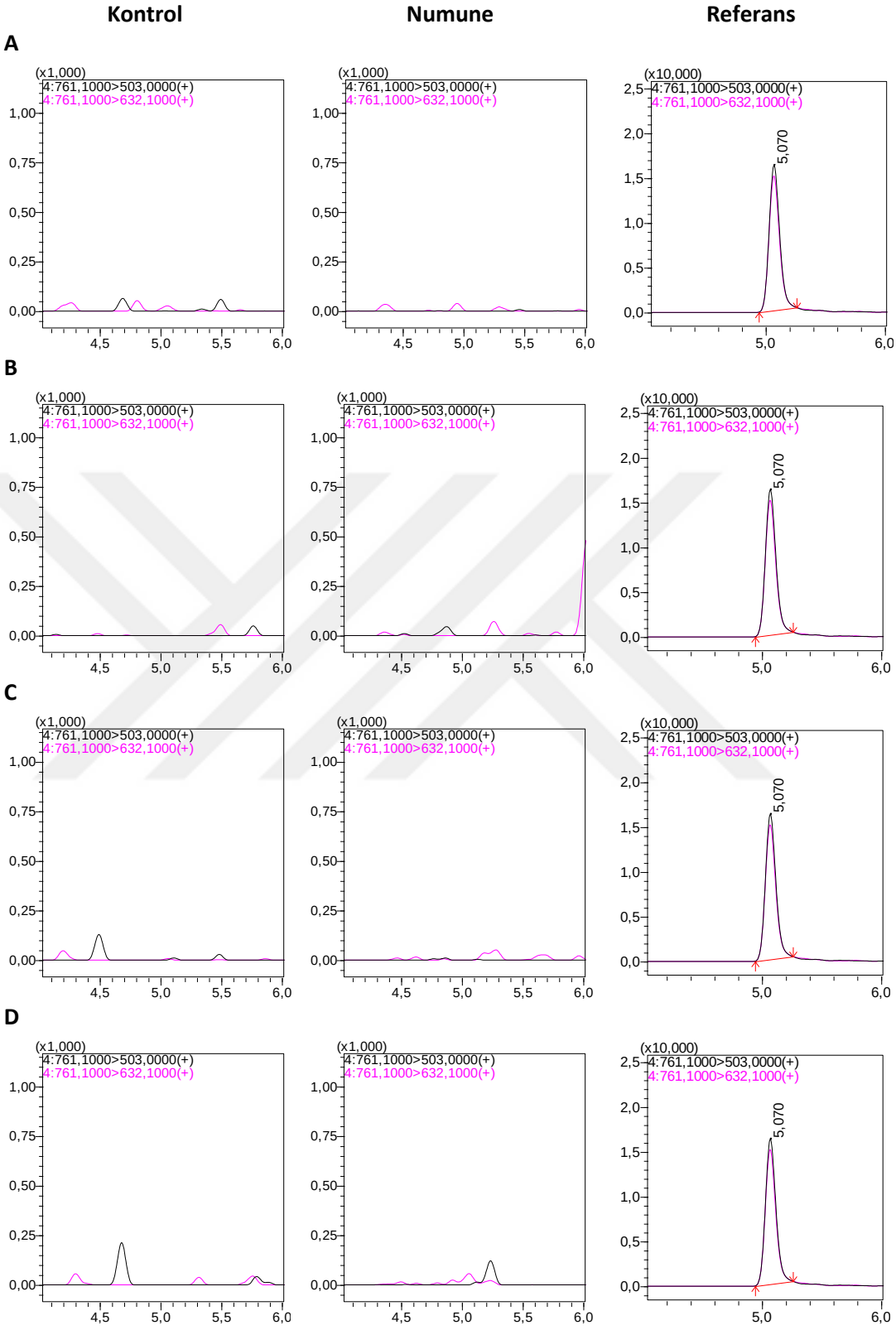
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde maruziyetten 1 saat sonra HETETE-Cys'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



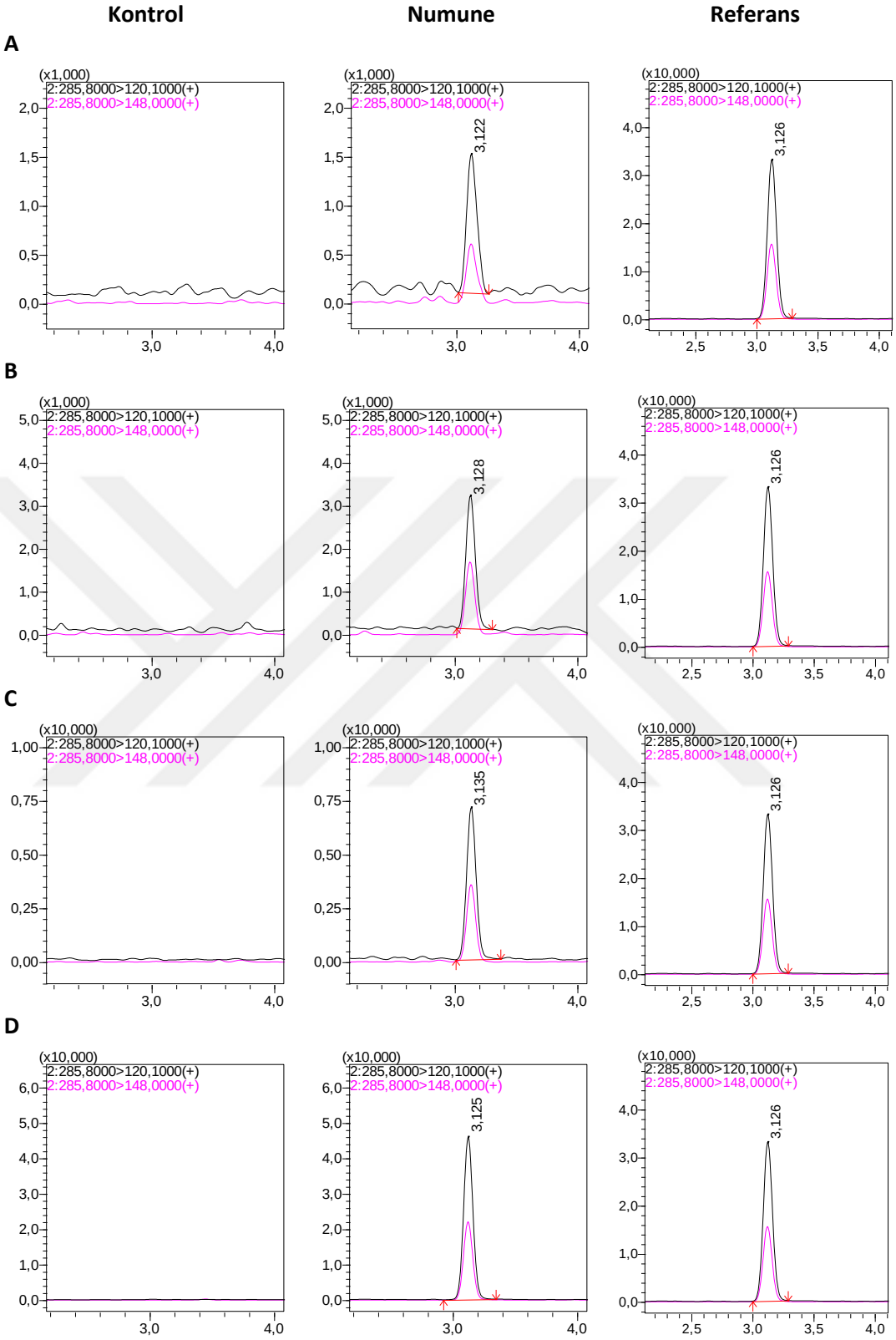
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde maruziyetten 1 saat sonra Cys-ETETE-Cys'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



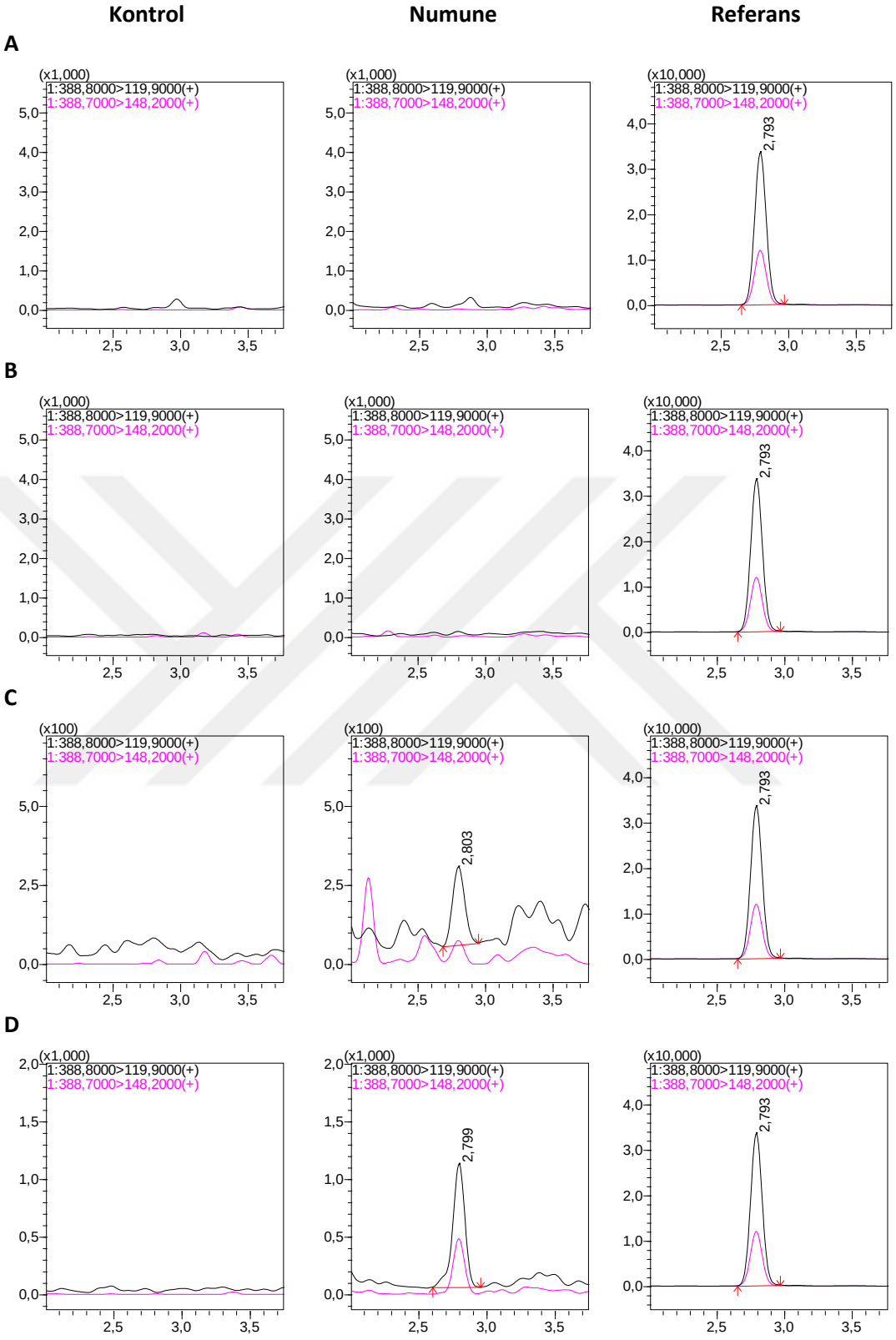
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde maruziyetten 3 saat sonra HETETE-GSH'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



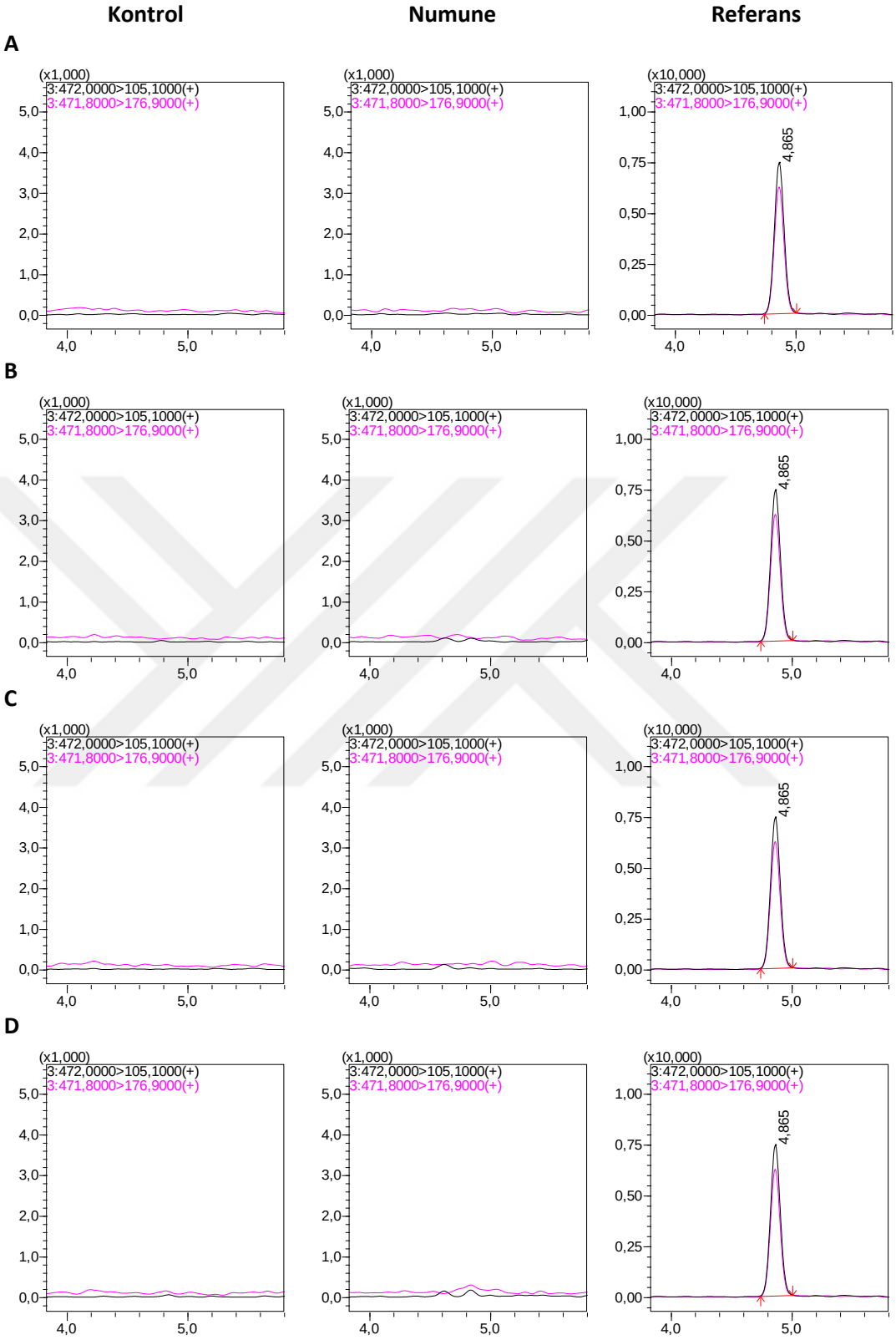
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde maruziyetten 3 saat sonra GSH-ETETE-GSH'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



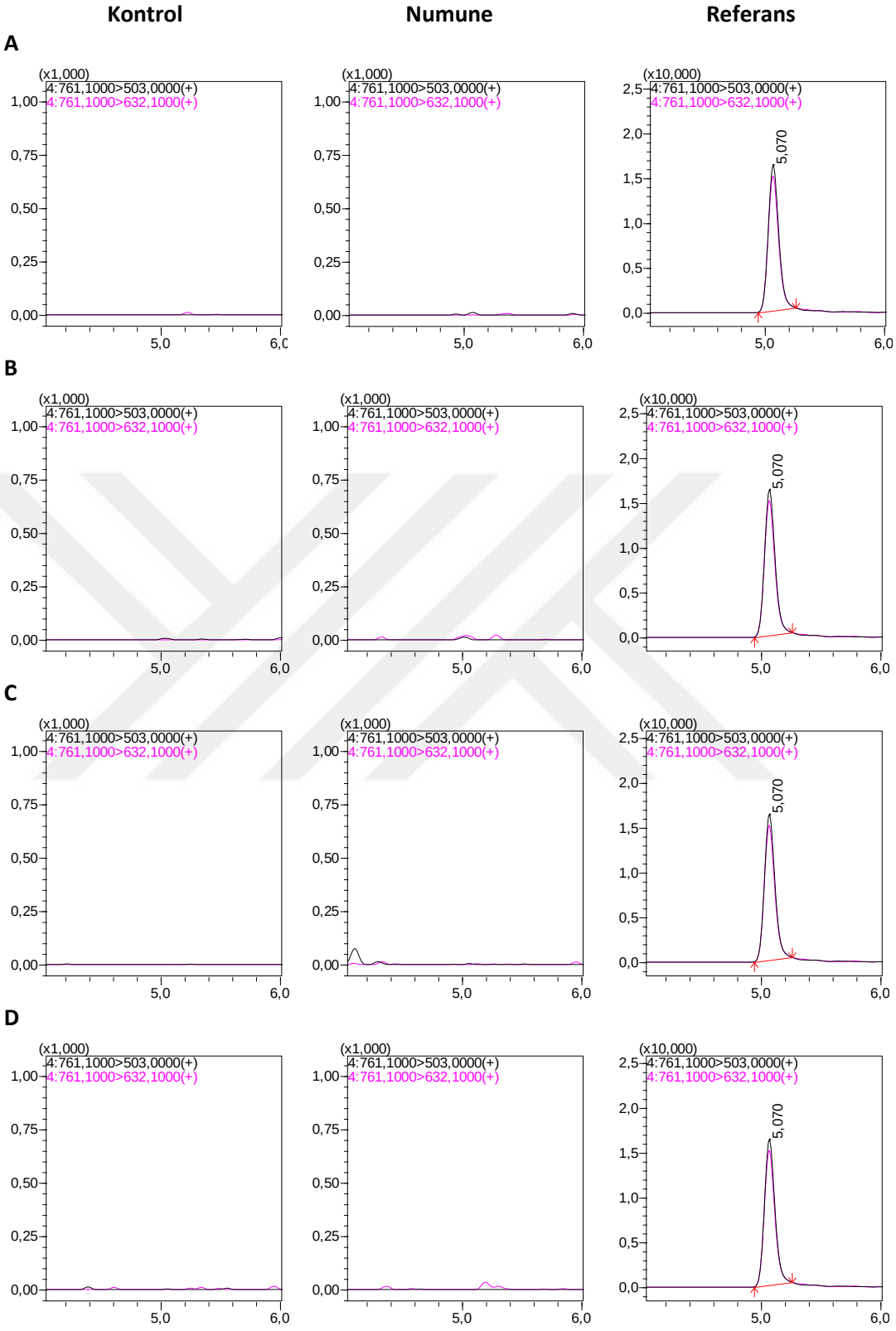
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde maruziyetten 3 saat sonra HETETE-Cys'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



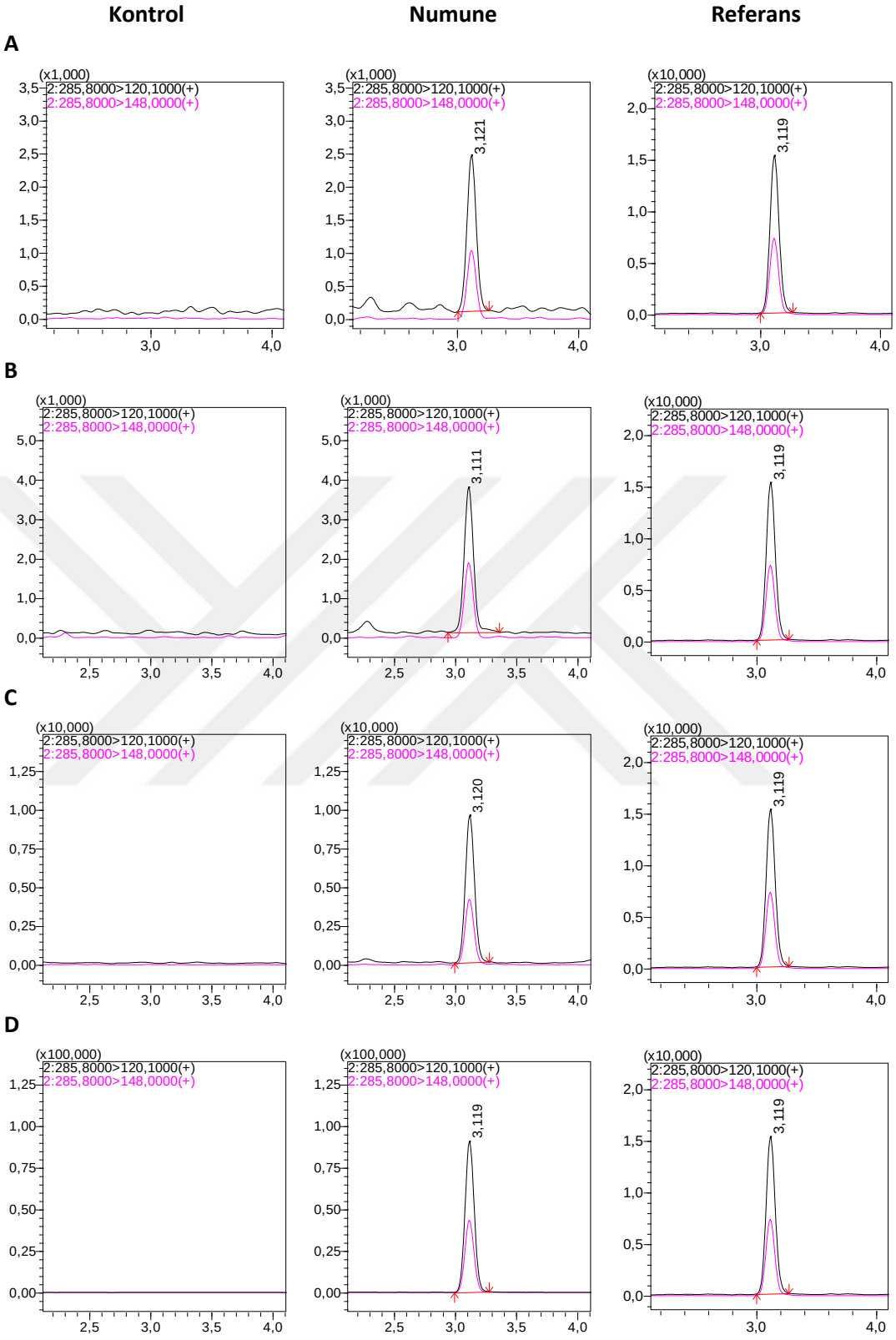
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde maruziyetten 3 saat sonra Cys-ETETE-Cys'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



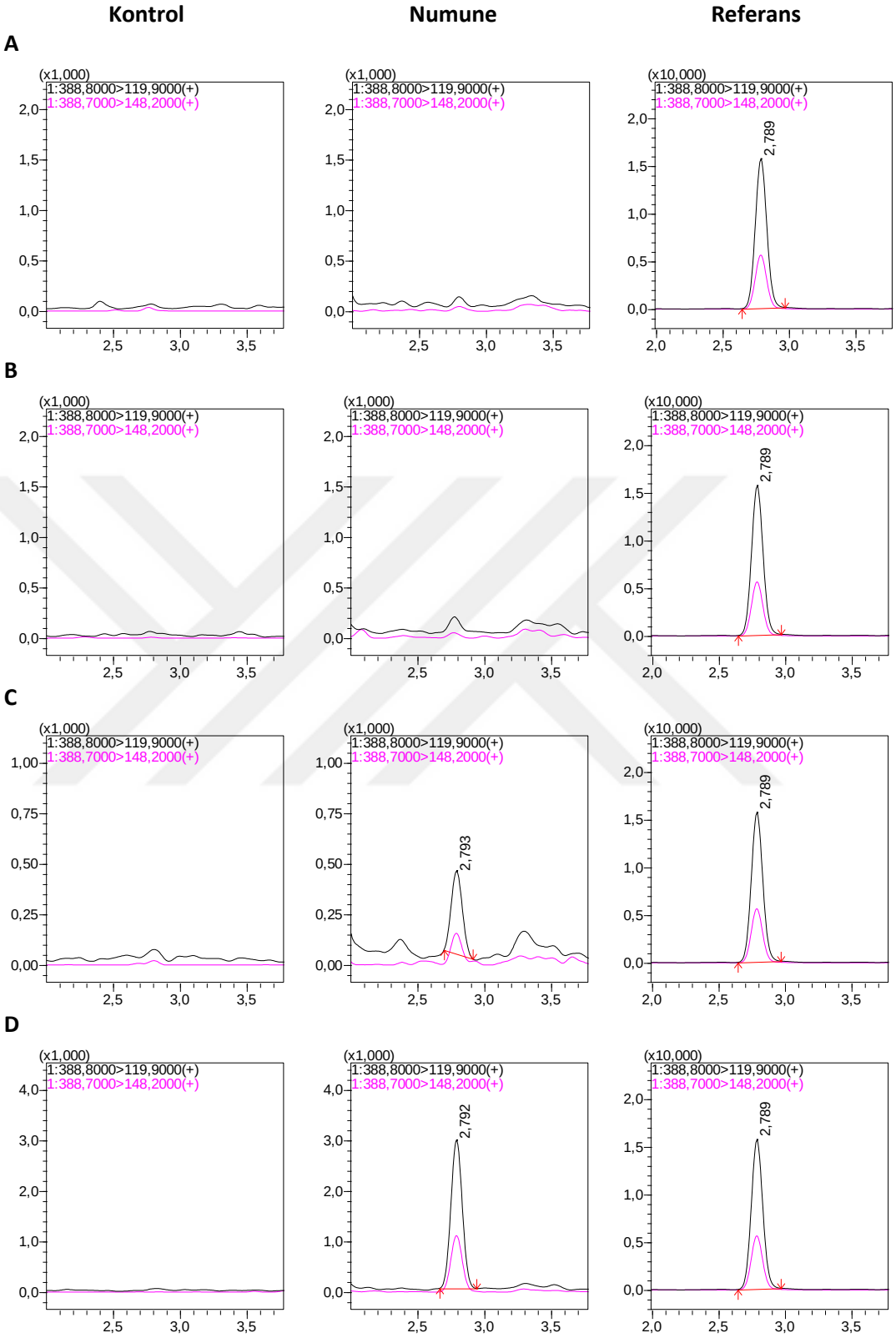
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde maruziyetten 6 saat sonra HETETE-GSH'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



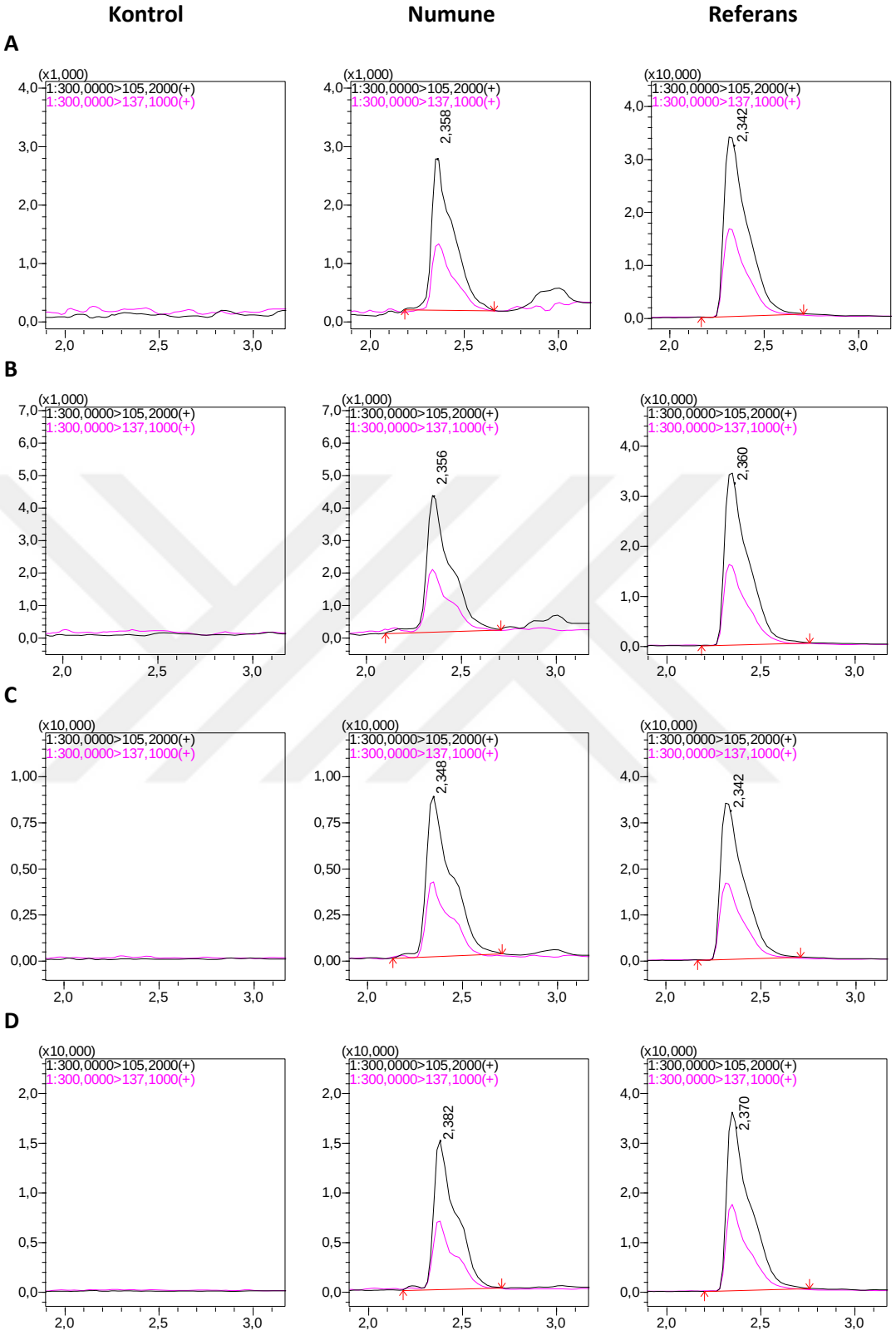
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde maruziyetten 6 saat sonra GSH-ETETE-GSH'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



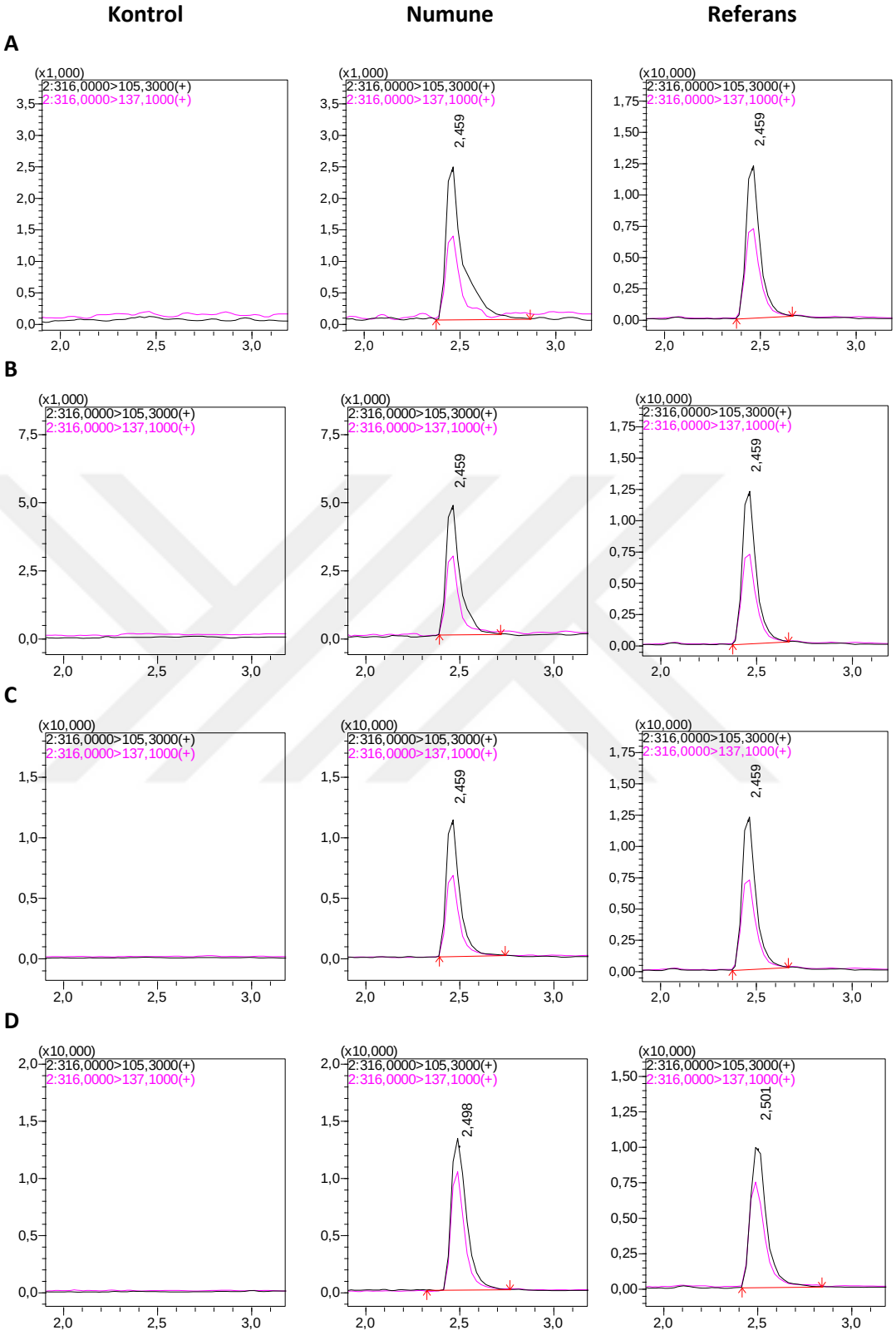
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde maruziyetten 6 saat sonra HETETE-Cys'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



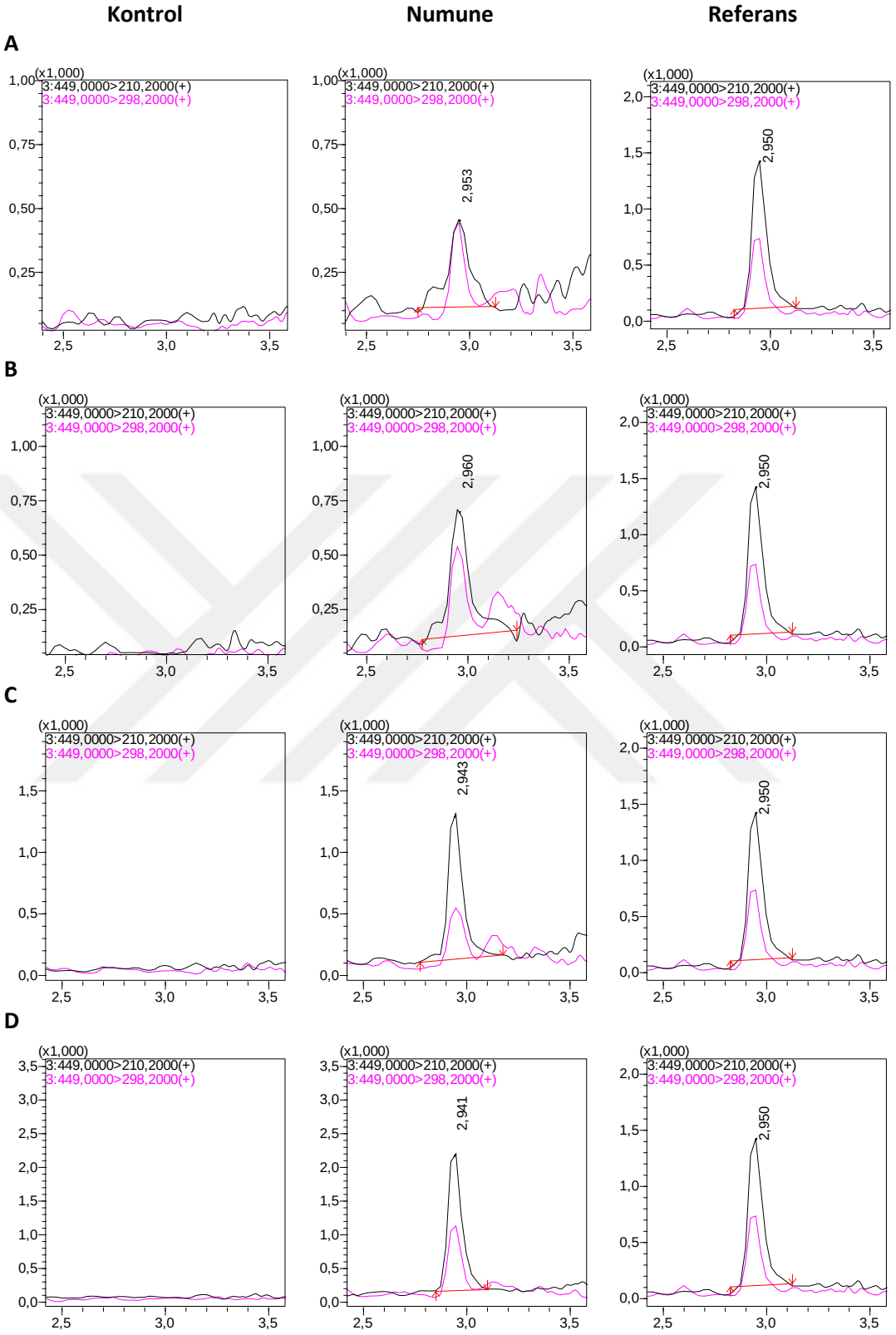
Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde maruziyetten 6 saat sonra Cys-ETETE-Cys'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde HETETE-Ade'ye ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM

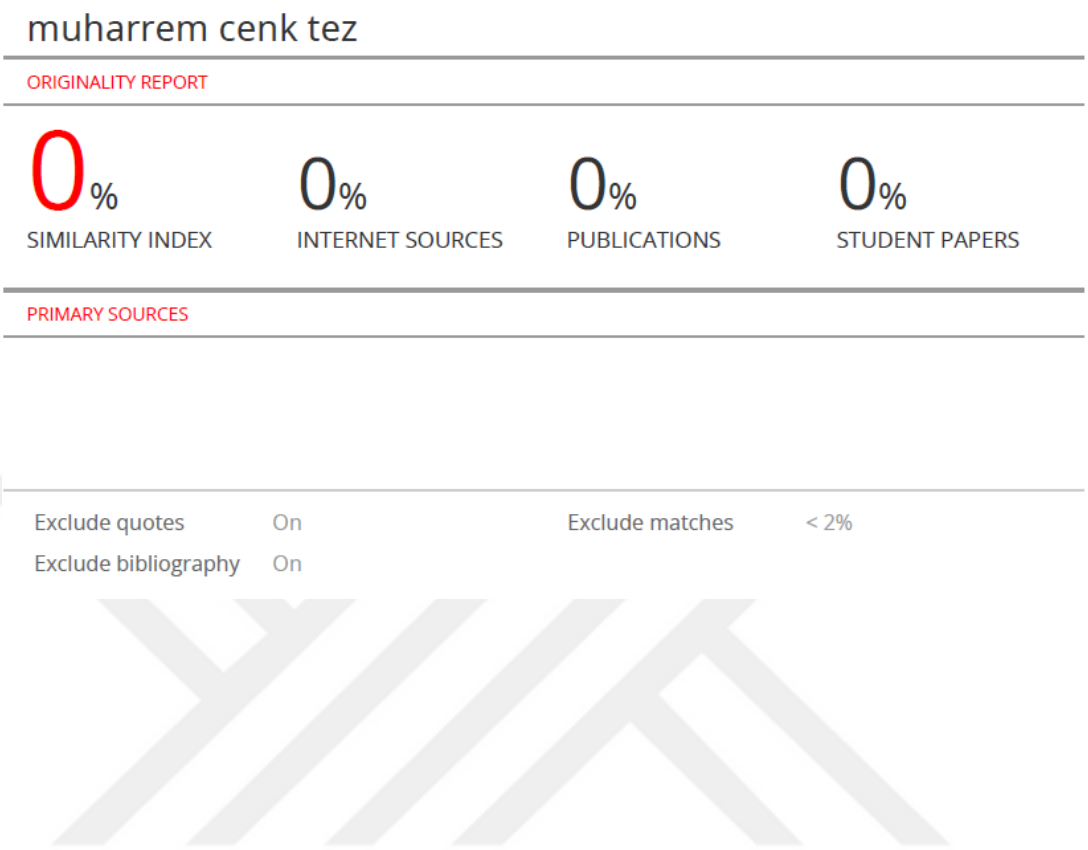


Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde HETETE-Gua'ya ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM



Farklı dozlarda Q ya maruz kalan hücrelerde Gua-ETETE-Gua'ya ait kromatogramlar **A)** 25 µM **B)** 50 µM **C)** 100 µM **D)** 250 µM

Ek-3: Orijinallik Raporu



muharrem cenk tez

ORIGINALITY REPORT

0%	0%	0%	0%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

Exclude quotes	On	Exclude matches	< 2%
Exclude bibliography	On		

Ek-4: Dijital Makbuz

turnitin

Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author:	Muharrem Cenk
Assignment title:	muharrem cenk
Submission title:	muharrem cenk tez
File name:	muharrem_turnitin.pdf
File size:	3.66M
Page count:	168
Word count:	39,104
Character count:	220,923
Submission date:	18-Jul-2025 01:52PM (UTC+0300)
Submission ID:	2716777441

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SESKİMUSTARD MARUZİYETİ SONUCU OLUŞAN
MAKROMOLEKÜLER KATIM ÜRÜNLERİNİN TANIMLANMASI

Uzm. Kim. Muharrem CENK

Farmasötik Toksikoloji Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2025

Copyright 2025 Turnitin. All rights reserved.

9. ÖZGEÇMİŞ