

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ÖĞRENCİ LABORATUVARI

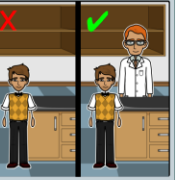
2018-2019





Laboratuvar Kuralları



				
Uzun saçları bağlayın.	Gözlerinizi korumak için güvenlik googles takın.	Bir kırılma veya dökülme varsa, derhal bir öğretmeni bilgilendirin.	Kimya saklama odalarına girmeyin.	Personel olmadan laboratuara girmeyin.
				
Laboratuvarda herhangi bir kimyasalın tadına doymayın.	Laboratuvarda yemek ya da içmeyin. Sakız çiğneme.	Ateşi gözetimsiz bırakmayın.	Laboratuvar masalarına oturmayın.	Eğitmen tarafından talimat verilmedikçe, lavabonun içine kimyasal madde koymayın.

Storyboard That kendi yaratın

<https://www.storyboardthat.com/tr/storyboards/tr-examples/laboratuvar-guvenligi-kurallari>

TOKSİKOLOJİK ANALİZ

Toksikolojik deęerlendirmelerin önemi

- Mesleki, çevresel ve ilaç etkenlerine yönelik akut veya kronik zehirlenmelerin teşhisi
- Terapötik ilaç izlenmesi
- Toksisite araştırmaları
- Bireysel tedavide genetik yatkınlığın tespiti
- Risk deęerlendirmesi

- Adli Toksikoloji
- Çevresel Toksikoloji
- Klinik Toksikoloji
- Analitik Toksikoloji



Toksikolojik Analiz Özellikleri

- **İdeal toksikolojik test;**
 - Valide edilmeli
 - Kapsamı iyi tanımlanmalı
 - Klinik açıdan güvenilir olmalı
 - Sonuçları değerlendirilebilir olmalı
- ✓ Toksisite testleri
- ✓ Toksikolojik analiz

Toksikolojik Analiz

TOKSİKOLOJİK ANALİZ

Hedefli Analiz

Sistematik Analiz

Çabuk Sistematik Analiz

Toksikolojik Analizde Önemli Faktörler



Numunenin;

- seçimi
- alın şekli
- alınan miktar
- saklanma koşulları

Bilginin eksiksiz toplanması

Analizin;

- uygunluğu (süresi, kapsamı, güvenilirliği)
- kullanılan kimyasalların/standartların saflığı
- gerektiğinde ana madde ve metabolitlerin izole edilebilmesi

Şüphelenilen maddenin biyotransformasyonu-postmortem bozunması

Toksikolojik Analizde Önemli Faktörler



• Alınabilecek örnekler;

- Biyolojik örnek
- Olay yeri kalıntıları

Toksikolojik Tam (Sistematik) Analiz

Cesetten Alınan Örnekler

- Mide (içindekilerle beraber)
- İnce barsaklar (en az 20 cm)
- Kalın barsak içeriği (100-200 g)
- Toplardamardan alınmış kan (olabildiğince fazla, en az 20 ml)
- Kalbin içindeki kanın tümü
- Karaciğer (200-500gr)
- Böbrek (en az biri)
- Mesanede ki idrarın tümü (0,5 ml kadar az bile olsa)
- Beyin (300 g)
- Kaslar (300 g)
- Safra (tümü, zorunlu durumlarda boş hali)
- Saçlar (baş derisine yakın kesilmiş)
- El-ayak tırnakları
- Yağ dokusu (uçucu narkotiklerden şüpheleniliyorsa)
- Akciğer (solunum yolu ile alınan zehir)
- Cesetteki enjeksiyon, tahriş v.b. izlerin etrafından

Toksikolojik Tam (Sistematik) Analiz

Hastadan Alınan Örnekler

- Kusmuk veya mide yıkama suyu (ilk yıkama en az 1 L)
- Kan (10-50 mL)
- İdrar (24 saatlik, 200-300 mL)
- Feçes (100 g)
- Saçlar (5 g)
- El ayak tırnak parçaları
- Yağ dokusu (biyopsi ile)
- Hastanın soluğu
- Tükürük
- Safra
- Gözyaşı
- Beyin omurilik sıvısı
- Anne sütü



Analize başlamadan önce;

- Örneğin şekli-büyüklüğü incelenir
- Ambalaj üzerindeki etiket okunur
- Adli vakalarda mühür kontrol edilir
- Net ağırlığı belirlenir
- Örnek temiz kuru bir kap içerisinde karıştırılır
- Örnek analiz amacına göre parçalara ayrılır

Toksikolojik Tam Analizde Örneklerin Bölünmesi



Örneğin 1/3 ü tekrar işlemleri için ayrılır.

Geri kalan kısım 5; eğer, kantitatif analiz yapılacaksa 6 eşit kısma bölünür

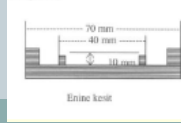
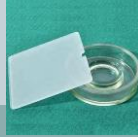
1. Kısım Ön deneyler (fizikokimyasal, kimyasal ön deneyler),
2. Kısım Uçucu zehirlerin analizi,
3. Kısım Uçucu olmayan, tartarik asitli alkol ile ekstre edilebilen ve sulu ortamdan organik çözücülerle tüketilebilen organik maddelerin analizi,
4. Kısım Organometaller ve anorganik bileşiklerdeki metallerin analizi,
5. Kısım Özel vasıflı bileşiklerin analizi,
6. Kısım Kantitatif tayin (isteniyorsa).

2. Kısım: Uçucu zehirler (1.Esas grup)

Mikrodifüzyon yöntemi:

- Az miktarda uçucu zehirlerin izole edilmesinde
- Conway Mikrodifüzyon düzeneği:** Uçucu zehirlerin tanınması ve kantitatif analizinde de kullanılır
- Dış odacık;** biyolojik materyal + uçucu zehri açığa çıkaracak reaktif
- İç odacık;** uçucu zehri adsorbe edecek + renk reaksiyonu verecek reaktif

Aranacak Zehir	DİŞ ODACIK Zehiri açığa çıkaran reaktifler	Absorban reaktifler	İÇ ODACIK Renk reaktifleri ve sonuç
CO	% 10 H ₂ SO ₄	----	PdCl ₂ → Siyah
Siyanür	% 10 H ₂ SO ₄	% 10 NaOH	FeSO ₄ +HCl→mavi ↓
Klorlu hidrokarbonlar	----	1 ml saf toluen	1 ml % 30 NaOH+ saf piridin→kırmızı
Alkoller (etil-metil-, izopropil-)	Doymuş Na ₂ CO ₃	----	Ansties reaktifi→Yeşil (K ₂ Cr ₂ O ₇ +H ₂ SO ₄)
Metil alkol	Doymuş Na ₂ CO ₃	H ₂ SO ₄	Kromotropik asit→violet
Fenoller	% 10 H ₂ SO ₄	% 10 NaOH	Folin-fenolftalein→mavi
Fosfür	Doymuş Na ₂ CO ₃	HNO ₃	% 5 AgNO ₃ →kahverengi ↓ % 10 Amonyum molibdat+ısı→ sarı ↓
Sülfür	% 10 H ₂ SO ₄	% 10 NaOH	a)% 10 Pb asetat→siyah ↓ b)% 10 Cd asetat→ sarı ↓



Deney no 1: Kanda Etil Alkol Tayini

Mikrodifüzyon Yöntemi ile Kanda Etil Alkol Tayini

Deney Protokolü

Çözeltiler:

Doymuş Na₂CO₃ çözeltisi: Na₂CO₃'ün 100 ml suda doymuş çözeltisi hazırlanır.

Ansties reaktifi: 3,70 g potasyum bikromat 150 ml distile suda çözülür. Üzerine 280 ml derişik H₂SO₄ yavaşça karıştırılarak ilave edilir. Distile su ile 500 ml'ye tamamlanır.

Alkol standardı (%160 mg): 0,1 ml %96 etilalkol 50 ml ye su ile tamamlanır.

Deneyin Yapılışı:

Conway mikrodifüzyon düzeneğinin dış odacığına;

- Uçucu zehrin aranacağı biyolojik materyal (1 ml kan) ve uçucu zehri serbest hale geçirecek reaktiften (1 ml doymuş Na₂CO₃ çözeltisi) konur.
- Kantitatif tayin için standart ve kör örnekler de yapılmalıdır.
- Standart örnek için 1 ml biyolojik materyal yerine %160 mg alkol içeren standart çözelti ilave edilir.
- Kör örnek için ise 1 ml biyolojik materyal yerine alkol içermeyen kan örneği kullanılır.

Conway mikrodifüzyon düzeneğinin iç odacığına ise;

- Uçucu zehre reaksiyona girecek olan ansties reaktifinden 2 ml ilave edilir.
- Düzeneğin ağzı derhal kapatılır.
- Difüzyon için 37°C de 1 saat bekletilir.
- Uçucu zehir (alkol) varlığında ansties reaktifi sandan yeşil renge döner.

Kantitatif tayin için:

- Difüzyon tamamlandıktan sonra iç odacıkta çözelti balon joleye alınarak distile su ile 10 ml'ye tamamlanır.
- Çözeltinin absorpsansı 450 nm dalga boyunda suya karşı ölçülür.

Değerlendirme için:

- Standart ve numune çözeltilerinde bulunan alkolle reaksiyona girmeyen potasyum bikromat çözeltisi aşağıda belirtilen formülü ile hesaplanır. (A-A_s) standartta, (A-A_s) ise numunedeki potasyum bikromat miktarını gösterir.
- Alkol konsantrasyonu ile absorpsans ters orantı gösterir (Alkol konsantrasyonu arttıkça potasyum bikromat miktarı azalacağından absorpsansı düşer).
- Alkol miktarı, kalibrasyon eğrisi hazırlanarak hesaplanabileceği gibi, tek standart yöntemi kullanılarak da hesaplanabilir.

14. Tek standart yöntemine göre kantitatif tayinde;

$$C_n = C_s \frac{(A - A_s)}{(A - A_n)}$$

C_n: Kan örneğindeki alkol konsantrasyonu (mg/100 ml kan)

C_s: Alkol standardının konsantrasyonu (mg/100 ml kan)

A: Kör örneğin absorpsansı

A_n: Numunenin absorpsansı

A_s: Standartın absorpsansı

3. Kısım: Uçucu olmayan ve Organik Çözücülerle Tüketilebilen (2.Esas grup)

- Zayıf asit, hidrofob nötr, amfoter ve bazik karakterli maddeler
- Analitik ve adli toksikologların ilgilendiği maddelerin çoğunluğu bu grupta
- Stass-otto yöntemi ekstraksiyon
 - Maddelerin hemen hemen tümü alkolde, asitli veya sıcak suda çözünürler
 - Ortamın reaksiyonuna bağlı olmaksızın (nötrler için) veya pH değeri uygun (zayıf asidik – bazik) halde sulu ortamdan organik çözücülere tüketilebilirler

Deney no: 2 Alkaloidlerin Tayini

- Alkaloid teşhisi için kullanılan renk ve çöktürme reaksiyonları ancak alkaloidler saf ise spesifiktir
 - Damla deneyi
 - Renk deneyi

Deney no: 2 Alkaloidlerin Tayini



- Spot testler; küçük bir tüp, saat camı, kapsül içinde yapılır
- Uygulamada analiz yapılacak alkaloid numune üzerine renk reaktifi damlatılır ve karıştırılır.
- Karakteristik rengin oluşması belirli gruba giren maddelerin varlığını gösterir
- Hiçbir “spot test” tek bir madde için spesifik değildir
- Renk oluşmaması ise o maddelerin yokluğunu gösteren iyi bir indikatördür

Deney no: 2 Alkaloidlerin Tayini



Bazı maddelerin renk reaktifleri ile verdikleri “spot test” sonuçları

Narkotin:

Konsantrite sülfürik asid: derhal limon sarısı
 Marquis reaktifi: mavimsi mor, çabuk koyulaşır, önce kenarları sarımsı yeşil olur, sonra ortası zeytin yeşili kenarları kahverengi olur.
 Mecke reaktifi: yaprak yeşili, koyulaşır, sonra sarı turuncumsu kahverengi ve nihayet turuncu-kırmızı olur.
 Fröhde reaktifi: soluk yeşil
 Mandelin reaktifi: önce pembe, sonra portakal kırmızı

Morfin:

Marquis reaktifi: kırmızı nüanslı mavi
 Oliver testi: kırmızı kahverengi renk
 FeCl₃: yeşil
 Mecke reaktifi: önce zeytin yeşili sonra mavimsi mora döner, daha sonra tekrar zeytin yeşili olur, bu defa kenarları kırmızı
 Fröhde reaktifi: sonra parlak yeşile dönen kırmızı mor

Kodein:

Marquis reaktifi: kırmızı nüanslı mavi
 Oliver testi: renk vermezler.
 Mecke reaktifi: sonra parlak açık maviye dönen yeşilimsi mavi, neticede parlak yeşil.
 Fröhde reaktifi: sonra yeşile dönen sarı, neticede mavi

Dionin:

Marquis reaktifi: kırmızı nüanslı mavi
 Oliver testi: renk vermezler.
 Mecke reaktifi: yeşil, önce kenarları mavi zeytin yeşili, sonra tüm leke zeytin yeşili olur.
 Fröhde reaktifi: sonra yeşile dönen sarı, neticede mavi

Deney no: 2 Alkaloidlerin Tayini



Mikroskop ile inceleme

Maddenin, uygun bir reaktifle verdiği kristal şeklinin mikroskopla incelenmesine dayanır.

	Wagner reaktifi	Pikrik asit çöz.
<i>Atropin</i>	Kristaller	Kristaller
<i>Skopolamin</i>	Yağlı damlalar	Yağlı damlalar
<i>Novokain</i>	Yağlı damlalar	Yağlı damlalar
<i>Anestezin</i>	Çoğu yağlı damla Az rombik kristal	Uzun iğneler
<i>Arekolin</i>	Yağlı damlalar	

Kokain KmnO_4 varlığında kısmen birbiri üzerinde ve ağaç manzarasında birleşmiş dikdörtgen şeklinde plaklar şeklinde gözlenir.

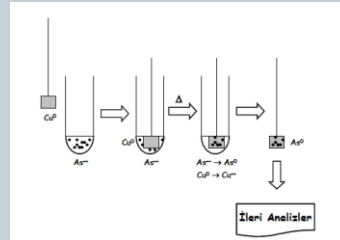
4. Kısım: Metalik Zehirler (3.Esas grup)



- As, Pb, Cd, Hg...
- Organik maddelerin parçalanarak (yaş veya kuru usul ile) uzaklaştırılmasının ardından metallerin analizine geçilir.
- **Kuru usul**; numune yakıldıktan sonra yüksek derecelerde küllendirilir (400-800 °C)-organ örnekleri
- **Yaş usul**; Oksidan, çözücü ve katalizör reaktifler ile kjeldahl balonu içinde yapılan küllendirmedir. Kan ve idrar gibi sıvı örneklerle uygulanır. <2000 °C

Deney no:3 Reinsch Testi

- Parçalanma işlemine gerek duymadan doğrudan biyolojik materyal üzerinde uygulanabilir.
- **Esası:** Metal iyonlarının asit ortamda indirgenerek bakır levha üzerine toplanması
- Bir elementin normal potansiyeli kendininkinden daha az negatif olan element için redüktör etkisi oluşturması sonucu gerçekleşir.



Deney no:3 Reinsch Testi

Deneyin Yapılışı

1. 1 cm² büyüklüğündeki bakır levha önce %50 HNO₃ ve daha sonra distile su ile yıkanarak temizlenir.
2. Temizlenmiş bakır levha, asitli numune çözeltisinin bulunduğu tüpe konarak, kaynar su banyosunda 15-20 dk bekletilir (Bizmut için daha uzun süre beklenmelidir).
3. Aranacak metallerin bakır levha üzerinde toplanması sonucu bazı renkier oluşur. Bakır levhanın rengi, metalik zehrin cinsi hakkında bize ön bilgi verir:

- Gümüşü renk:	Cıva
- Parlak siyah renk:	Bizmut
- Mat gri-siyah renk:	Arsenik
- Mor renk:	Antimon olabileceğini gösterir.

Bakır levha üzerinde toplanan metalin kesin tanımlanması

Ön deneyler ile örnekte var olduğu düşünülen metal ile ilgili aşağıdaki testler yapılır:

- Cıva aranması

1. Saat camına filtre kağıdı yerleştirilir ve üzerine sırasıyla, 1-2 damla %5 KI, 1-2 damla %5 Na₂SO₄ kanşımı ve 1-2 damla %5 CuSO₄ ilave edilir.
2. Distile su ile yıkanmış ve kurutulmuş üzerinde cıva toplandığı düşünülen bakır levha bu kanşım üzerine konur.
3. İkinci bir saat camı ile üzeri kapatılarak yaklaşık 40 dk bekletilir.
4. Cıva varlığında bakır levha üzerinde **sarı-kırmızı** renk belirir.

- Bizmut aranması

Üzerinde bizmut toplandığı düşünülen bakır levha bir tüpe alınır, üzerine sırayla 1 ml %5 Na₂SO₄, 1 ml %15 HNO₃ konur ve 5 dk çalkalanır. Bizmut varsa çözeltiye geçer.

1. Çözelti bir başka tüpe aktarılarak üzerine 1 ml su, 1 ml kinin sülfat-KI reaktif kanşımı ilave edilir.
2. Bizmut varlığında çözeltide **turuncu** renk oluşur.

- Arsenik ve Antimon aranması

Üzerinde arsenik veya antimon toplandığı düşünülen bakır levha bir tüpe 0.5 ml %10 KCN ile çalkalanır. Arsenik varsa çözeltiye geçer, antimon ise bakır levha üzerinde kalır. Bu nedenle antimon aranacaksa KCN ile çalkalama yapılmayacaktır. Arsenik ve antimon aranmasına Gutzeit testi ile devam edilir.

Gutzeit Testi

1. 1 ml çözelti (arsenik varlığından şüphelenen) veya bakır levha (antimon varlığından şüphelenen) bulunan tüp içersine 1 ml %20 H₂SO₄, 1-2 saf granül çinko, 1-2 damla %5 SnCl₂ ilave edilir ve tüpün ağzı sıkıca bir mantar tıpa ile kapatılır.
2. Kapatma esnasında mantarın kenarına 1 damla %5 AgNO₃ emdirilmiş filtre kağıdı yerleştirilir.
3. Arsenik varlığında: AgNO₃ emdirilmiş filtre kağıdında 20-30 dk içinde **siyah** renk görülür.
4. Antimon varlığında: oluşan renk **sarı-siyah** ve daha geç meydana gelir.
5. Ayrıca konsantr HCl dumanları ile temasta, antimon ile oluşan renk kaybolduğu halde arsenik ile oluşan renk sabit kalır.

5.Kısım: Özel vasıflı bileşikler (4.Esas grup)

- Bu grup diğer grupların ayrılması işlemleri esnasında elde edilemezler veya tam olarak hiçbir gruba dahil olamazlar
 - Mineral asitler, yakıcı alkaliler, organik asitler (laktik asit..), kuvvetli organik asitlerin tuzları, protein yağ ve karbonhidratlar, glikozid, enzim, hormon v.s, sülfonamidler, nötr hidrofiller
- Kimyasal maddelerin biyolojik materyalde teşhis ve kantitatif analizlerinde kullanılan teknikler;
 - Spektrofotometrik yöntemler
 - Kromatografik yöntemler
 - İmmünoassay teknikler
 - Diğer (elektrometri, optik kristallografi...)

Çabuk Sistematik Analiz

Kanda yapılan analizler

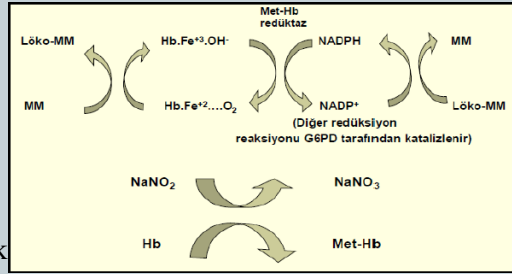
- ✓ Glukoz ve üre tayini
- ✓ Serum kolinesteraz aktivitesi
- ✓ Methemoglobin miktarı
- ✓ Karbonmonoksit-hemoglobin miktarı
- ✓ Alkol konsantrasyonu
- ✓ Salisilat ve barbituratların tayini

İdrarda yapılan analizler

- ✓ *Lange* : Aseton ve diğer keton cisimleri
- ✓ *Fe(III)klorür* : Fenolik bileşikler
- ✓ *Fujiwara* : Alifatik klorlu hidrokarbonlar ve metabolitleri
- ✓ *FPN* : Fenotiyazin türevleri
- ✓ *Forrest* : İmipramin ve desimipramin
- ✓ *Cronheim-Ware* : Bazik ilaçlar
- ✓ *Diazo* : Fenasetin ve parasetamolun metaboliti olan p-aminofenol
- ✓ *Indofenol* : Paration, Klortion, folition vs metaboliti olan p-nitrofenoller
- ✓ *Fehling* : Glukoz ve ketonlar
- ✓ *Dikromat* : Alkol ve aldehitler
- ✓ *Trinder* : Salisilatlar
- ✓ *Krezol-NH₂* : Parasetamol
- ✓ *Difenilamin* : Etiklorvinil
- ✓ *Ditionit* : Paraquat, diquat

Deney no: 4 Kanda Met-Hb Tayini

- Akut zehirlenme vakalarında alınan zehir bilinmiyorsa hekime yardımcı olması açısından çabuk sistematik analizler yapılır.
- Çok sayıda ksenobiyotik ve ilaçların etkisi ile hemoglobin, oksidasyon ürünü inaktif methemoglobine (Met-Hb) dönüşür
- Hb'deki +2 değerlikli Fe iyonu (ferro), oksidan maddelerin etkisi ile +3 değerlikli (ferri) iyonuna yükseltgenir
- Hb dokulara yeterli oksijen taşıyamadığında "methemoglobinemi" hastalık tablosu ortaya çıkar



Deney no: 4 Kanda Met-Hb Tayini

- Normal koşullarda kanda Hb ile Met-Hb oranları arasında denge vardır
- MetHb redüktaz, Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz
- Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz kalıtsal eksikliği yeni doğanda yüksek Met-Hb
- Vücutta %8-10 Met-Hb düzeyi tolere edilebilir
 - %10-15 => siyanoz
 - %20-40 => baş ağrısı, halsizlik solunum kısıtlılığı
 - %60-80 => ölüm
- Kloratlar, perkloratlar, nitritler, nitratlar, aromatik amino ve nitro bileşikler, azot oksitler, sülfonamidler, redoks boyaları (metilen mavisi)

Deney no: 4 Kanda Met-Hb Tayini

- Siyanür metodunun esası;
- Met-Hb nin 630 nm de görülen maksimum absorpsiyon bandının siyanür ilavesi ile kaybolması esasına dayanır.
- Oluşan siyano-Met-Hb bileşiği, bu dalga boyunda çok düşük absorpsiyon gösterir.
- İki absorpsiyon değeri arasındaki fark, çözeltideki Met-Hb konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

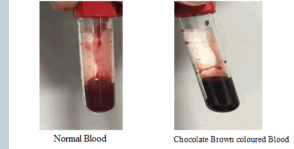
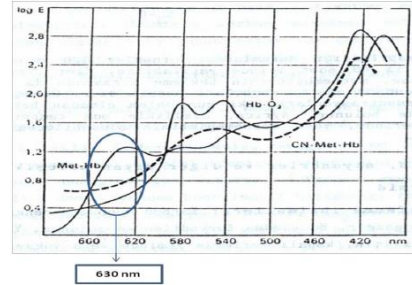


Figure 1: Normal Blood vs. dark brown colored blood due to Methemoglobinemia.



Deney no: 4 Kanda Met-Hb Tayini

Deneyin Yapılışı:

1. Santrifüj tüpüne 5 ml su konur.
2. Parmak ucundan alınan 0,2 ml (yaklaşık 4-5 damla) kan bekletmeden içinde su bulunan santrifüj tüpüne konur, iyice karıştırılır ve 10 dakika bekletilir.
3. Hazırlanan hemolizat üzerine 5 ml fosfat tamponu çözeltisi eklenir, karıştırılır ve 5 dk 1000 devirlik ile santrifüj edilir.
4. Üstteki analiz çözeltisinden iki ayrı spektrofotometre küvetine (1 cm'lik) 1,5 ml konur.
5. Böylece, 1. ve 2. ile 3. ve 4. ölçümlerde kullanılacak çözeltiler hazırlanmış olur.

1. ve 2. ölçüm:

Spektrofotometre küvetindeki 1,5 ml analiz çözeltisine 1 damla su ilave edilir, karıştırılır. Çözeltinin absorbansı 630 nm dalga boyunda suya karşı ölçülür (=A₁). A₁ değeri kandaki methemoglobini ifade eder.

Sonra küvetteki çözeltiye 1 damla KCN çözeltisi ilave edilir ve karıştırılır. Çözeltinin absorbansı 5 dk sonra tekrar ölçülür (=A₂). A₂ değeri kandaki methemoglobinin (A₁ değerinde ölçülen) siyano-methemoglobine çevrilmiş halini ifade eder.

3. ve 4. ölçüm:

Diğer spektrofotometre küveti içerisindeki 1,5 ml analiz çözeltisine ise 1 damla K₃Fe(CN)₆ çözeltisi ilave edilir, karıştırılır. 3 dk sonra çözeltinin absorbansı 630 nm dalga boyunda suya karşı ölçülür (=A₃). A₃ değeri kandaki tüm oksihemoglobinin methemoglobine çevrilmiş halini ifade eder.

Küvetteki çözeltiye 1 damla KCN çözeltisi ilave edilir ve karıştırılır. Çözeltinin absorbansı 5 dk sonra tekrar ölçülür (=A₄). A₄ değeri kandaki tüm methemoglobinin (A₃ değerinde oluşturulan) siyano-methemoglobine çevrilmiş halini ifade eder.

NOT: Spektrofotometrede 1. ve 3. ölçümler ile 2. ve 4. ölçümler paralel olarak ölçülür.

Sonucun hesaplanması:

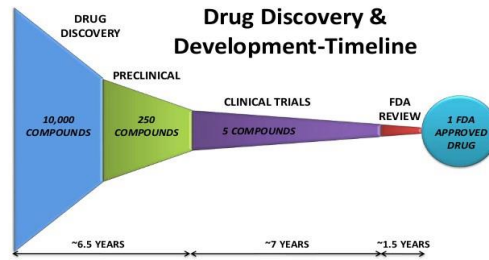
$$\% \text{ Met-Hb} = \frac{(A_1 - A_2) \times 100}{(A_3 - A_4)}$$

* Hemoglobin K₃[Fe(CN)₆] (potasyum ferrisiyanid) ilavesi ile oksitlenerek methemoglobine dönüşür. Methemoglobin ise KCN ilave edilerek ile siyanomethemoglobine dönüşür.

PREKLİNİK ARAŞTIRMALAR

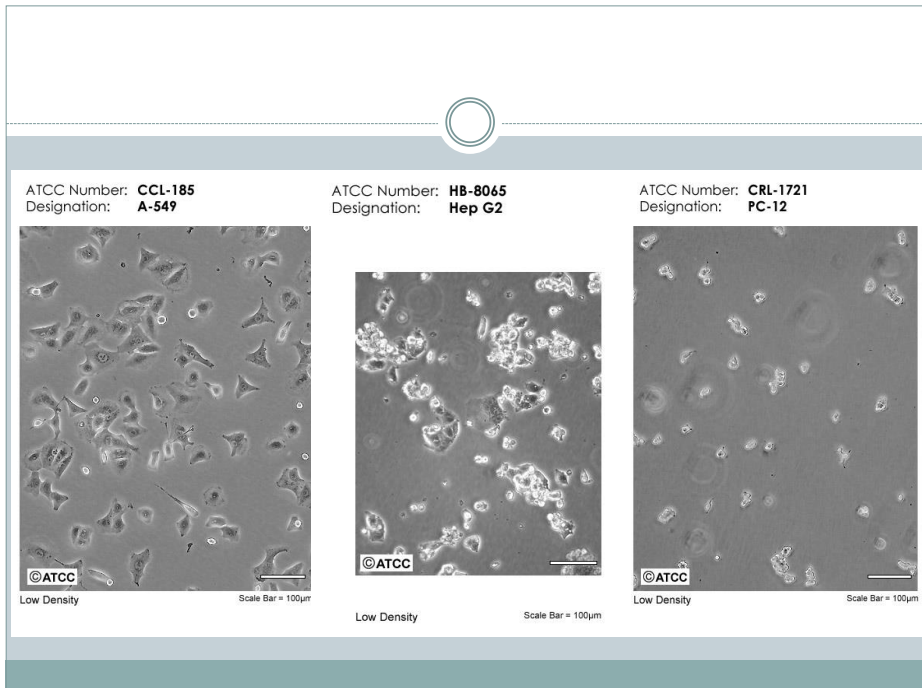
İLAÇLAR PIYASAYA ÇIKMADAN ÖNCE GENELDE ÜÇ AŞAMADAN GEÇER

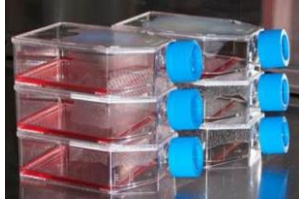
- 1) **İlacın keşfi:** İlaç aday moleküller farmakolojik özelliklerine göre seçilir.
- 2) **Preklinik dönem:** Deney hayvanları ve in vitro çalışmaları içerir (toksisite testleri, farmakokinetik analizler ve formülasyon geliştirilmesi vd).
- 3) **Klinik dönem:** Sağlıklı gönüllü ve hastalarda preklinik aşamadan geçen bileşikler etkinlik ve advers etkiler açısından test edilir.



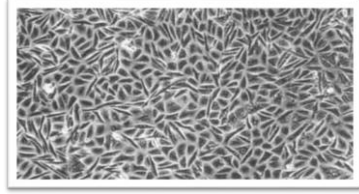
Hücre Kültürü

- Hücrelerin dokudan mekanik yollarla ve çeşitli enzimlerle izole edilerek besiyeri içerisinde in vitro olarak çoğaltılması
- Kökenine göre:
 - Primer Hücre Hatları: Direkt organizmadan alınmış hücreler
 - Sınırlı Hücre Hatları: Hücre bir kez bölündükten sonra sınırlı hücre olur ancak ölümsüz olma potansiyeli de vardır.
 - Transforme Hücre Hatları: Değişmiş işlev, büyüme özellikleri ve morfoloji sergiler.





Flask

%5 CO₂ / nemli inkübatör

Kofluent / adherent hücre



Mikroplakalar

- **Hücre Kültürü:**
Cell Culture Training Video
<http://www.youtube.com/watch?v=WGKoJRNKADY>

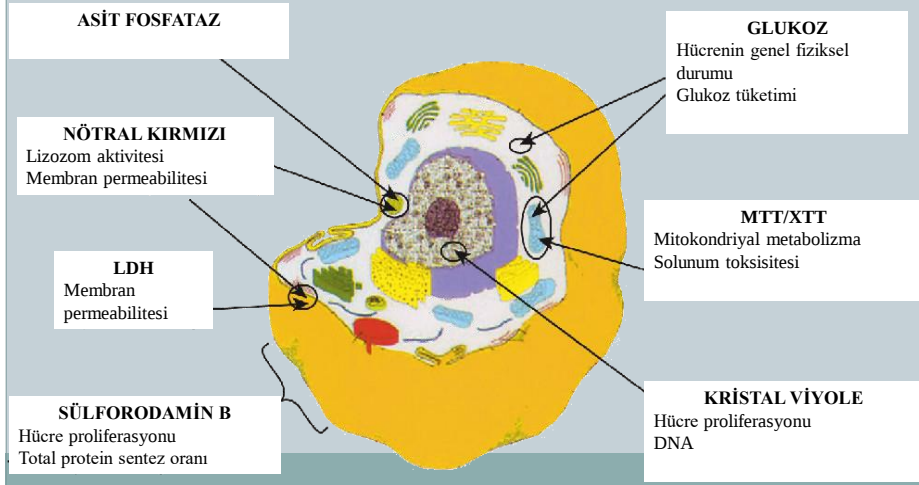
Sitotoksikite Testleri



- Hücresel aktivitenin geri dönüşümsüz durdurulması ve hücresel yapının onarılamaz bozukluğudur.
- Sitotoksik maddeye maruz kalan hücreler çeşitli şekillerde yanıt verir;
 - Nekroz olabilir
 - ✦ Membran bütünlüğü kaybolur ve hücre lizisine bağlı olarak hızla ölür
 - Büyüme ve bölünme durabilir
 - Apoptoz olabilir
 - ✦ Kontrollü hücre ölüm mekanizmaları aktive olabilir

Sitotoksosite Testleri

SİTOTOKSİSİTE TEST SİSTEMLERİ



Deney no:5 MTT Testi

MTT testinin esası: MTT bileşiğinin yapısında bulunan tetrazolyum halkasının canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücrede mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrojenaz enzimi ile formazana dönüşmesi esasına dayanır.

Soluk_sarı renkli MTT, tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu **koyu mavimsi-mor** renkli formazan ürününe dönüşür. Böylece canlı ve mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış hücreler mor renge boyanırken ölü ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş hücreler boyanmaz. Oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 590 nm'de ölçülür.

Yanak epitel hücresinin elde edilmesi:

Ağız suyla çalkalanarak temizlenir. Pamuklu çubukla sürterek ağızdan alınan yanak epitel hücreleri 1,5 ml PBS içersine alınır.

Deneyin yapılışı:

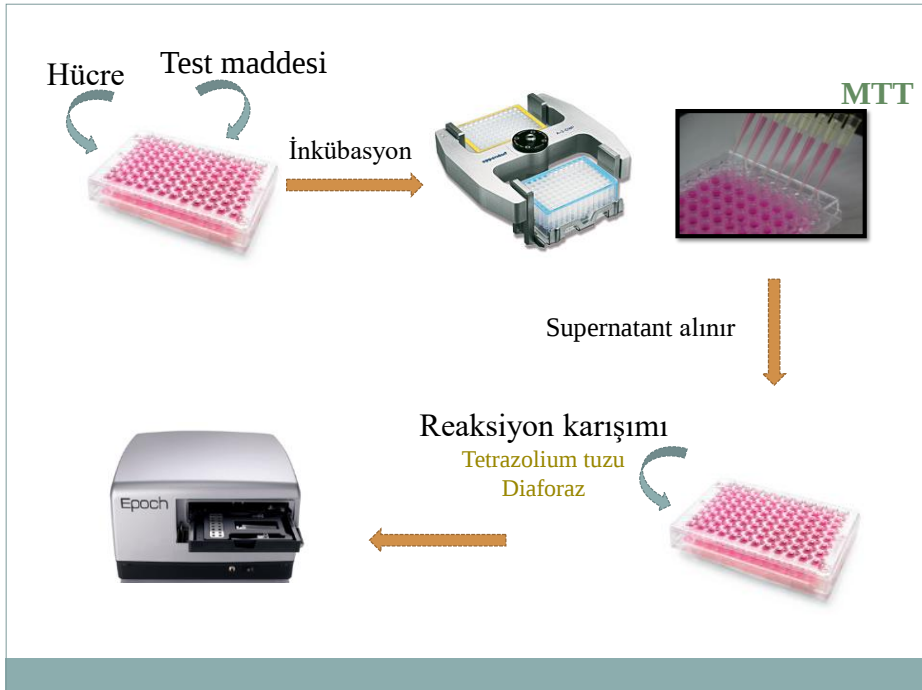
1. Yanak epitel hücrelerinin PBS'deki süspansiyonu 2 ayrı mikrosantrifüj tüpüne her biri 1080 µl olacak şekilde konur.
2. Kontrol grubuna (1. mikrosantrifüj tüpü) 120 µl distile su ilave edilir.
3. Hasar oluşturulacak gruba (2. mikrosantrifüj tüpü) farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan H_2O_2 çözeltisinden 120 µl ilave edilir.

4. Her iki mikrosantrifüj tüpü 37°C'de 30 dk inkübasyona bırakılır.
5. Her iki mikrosantrifüj tüpüne 40 µl MTT çözeltisi eklenir.
6. 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılır.
7. 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek üstteki sıvı atılır (Çökeltinin dökülmemesine dikkat edilmeli).
8. Çökeltiye 1,2 ml "çözündürme karışımı" ilave edilir ve 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
9. 5000 rpm'de 5 dk santrifüj edilir.
10. Oluşan rengin şiddeti 590 nm'de ölçülür.

Sonucun hesaplanması:

Kontrol grubundan elde edilen absorpsan değeri %100 canlılığı ifade eder.

Hasar oluşturulan örnekteki canlı hücre oranı, kontrol grubunun absorpsan değeri ile kıyaslanarak % cinsinden hesaplanır. Bu değer 100'den çıkarıldığında ölü hücrelerin % cinsinden oranı ve hasar oluşturan maddenin IC_{50} değeri hesaplanmış olur.



Deney no:6 Tripan Mavisi Testi

Tripan mavisi testinin esası: Ölü hücrenin bozulmuş hücre membranlarından dolayı tripan mavisi boyasını içerisine alırken, canlı hücrenin boyayı içine almaması esasına dayanır. Işık mikroskobu ile incelendiğinde; canlı hücrelerin sadece membranları soluk mavimsi renkli, ölü hücrelerin ise tamamı mavimsi renge boyanmış halde gözlenirler.

Yanak epitel hücrelerinin elde edilmesi:

Ağız suyla çalkalanarak temizlenir. Pamuklu çubukla sürterek ağızdan alınan yanak epitel hücreleri 1,5 ml PBS içerisine alınır.

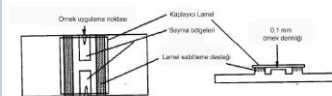
Deneyin yapılışı:

1. Yanak epitel hücrelerinin PBS'deki süspansiyonu 2 ayrı mikrosantrifüj tüpüne her biri 225 µl olacak şekilde konur.
2. Kontrol grubuna (1. mikrosantrifüj tüpü) 25 µl distile su ilave edilir.
3. Hasar oluşturulacak gruba (2. mikrosantrifüj tüpü) farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan H_2O_2 çözeltisinden 25 µl ilave edilir.
4. Her iki mikrosantrifüj tüpü 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakılır.
5. Hücre süspansiyonlarından 15'er µl alınarak iki ayrı temiz mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
6. Üzerlerine 15 µl tripan mavisi çözeltisi eklenir ve iyice karıştırılır.
7. Tripan mavisi ile boyanmış hücre süspansiyonundan 12 µl "Hemasitometre lamı"na yerleştirilir. Yükleme yapılmadan önce hemasitometre lamının (hücre sayım lamı;

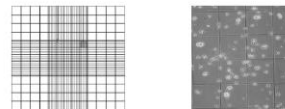
thoma lamı) lameli ile iyi bir şekilde kapatılması gereklidir (Şekil 1).

8. Işık mikroskobu altında canlı ve ölü hücreler sayılır (Çizgilerin üzerinde bulunan hücreler de sayıma dahil edilmelidir) (Şekil 2).

9. Hücre sayımı en geç 30 dk içerisinde tamamlanmalıdır.



Şekil 1: Hemasitometre lamı (özellikli 0,1 mm³ hacimde hücre sayımının yapılabilmesidir)

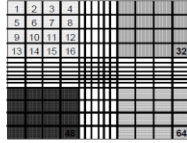


Şekil 2: Hemasitometre lamında hücrelerin mikroskop altındaki görüntüleri

Deney no:6 Tripan Mavisi Testi



Sonucun hesaplanması:



A = 4 köşedeki toplam 64 karede bulunan tüm canlı hücreler (maviye boyanmayan, çekirdeği sağlam)

B = 4 köşedeki toplam 64 karede bulunan tüm ölü hücreler (maviye boyanan)

$$\text{Toplam canlı hücre sayısı (X)} = (A \times 2 \times 10^4) / 4$$

$$\text{Toplam ölü hücre sayısı (Y)} = (B \times 2 \times 10^4) / 4$$

$$\% \text{ Ölümler oranı} = [Y \times 100 / (X + Y)]$$

Toplam canlı/ölü hücre sayısı formüllerindeki:

2 ile çarpım : Tripan mavisi ile 1/2 oranında seyreltmeden dolayıdır.
4'e bölünme : 4 adet 16'lık (toplam 64) kare sayıldığı içindir.
 10^4 : 0,1 mm³'deki sayım sonucunu 1 ml'deki sayıya dönüştürmek ve standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmezdir. 1 ml = 1 cc = 1 cm³ = 1000 x 0,1 mm³



- Bir veya birden fazla parametre değerlendirilebilir.
- Farklı mekanizmalar göz önünde bulundurularak birkaç test bir arada yapılabilir.

In Cytotox - XTT-NR-SRB

3 - Parameter Cytotoxicity Kit

Tetrazolium XTT	-	Mitochondrial Activity
Neutral Red NR	-	Lysosomal Activity
Sulforhodamine B SRB	-	Total Protein Content

5R PRENSİBİ



REPLACEMENT (Yer Değiştirme)

5R

REDUCTION (Azaltma)

REFINEMENT (İyileştirme)

RESPONSIBILITY (Sorumluluk)

RESPECT (Saygı)

Animal Ethics

<http://www.animaethics.org.au/home>

- **REPLACEMENT**

- Doku kültürü
- Perfüze organlar
- Doku parçaları
- Selüler ve subselüler fraksiyonlar

- **REDUCTION**

- Çalışmalar bilimsel ve istatistiksel olarak uygun tasarlanmalı
- En az sayıda hayvan kullanılmalı
- Çalışmalar gereksiz tekrarlanmamalı

- **REFINEMENT**

- Hayvanın en iyi koşulda olması sağlanmalı



OKÜLER İRRİTASYON DRAIZE TEST



HET-CAM

Tavuk Yumurtası Koryoallantoik Zar Testi

- **Amaç**, test maddesinin oküler iritan özelliğinin, tavuk yumurtasının koryoallantoik zarının içindeki advers olayları indükleme yeteneğinin ölçülmesidir.
- Tavşan gözünde uygulanan göz iritasyon testi Draize testine alternatif olarak kozmetolojik ürünler vs de kullanılır.
- Test için kullanılacak olan tavuk yumurtası;
 - ✓ Beyaz Leghorn tavuk yumurtası tercih edilir.
 - ✓ Taze olmalı (maks.7 günlük)
 - ✓ Fertil olmalı
 - ✓ 50-60 g olmalı
- Yumurta önce ışıktaki kontrol edilir. Çapsız, kusurlu, şekilsiz, çatlak, ince kabuklu yumurtalar tercih edilmez.
- Embriyo canlılığının ve gelişiminin etkilenmemesi için çevre koşullarına dikkat edilmeli

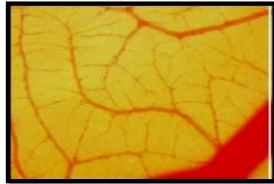
HET-CAM



- Her grup için en az 3 yumurta kullanılmalı.
- 38.3 ± 0.2 °C ve $\%58 \pm 2$ bağıl nemde otomatik olarak veya günde en az beş kez el ile döndürülerek 8. güne kadar inkübe edilir.
- 8. günde ışık altında yumurtalar test edilir. Cansız ya da kusurlu olanlar kullanılmaz.
- Yumurtalar inkübatöre geniş uç yukarı gelecek şekilde yerleştirilir.
- 9. günde test yapılır.
- Yumurtanın hava hücresi işaretlenir.
- İşaretlenmiş bölüm bistüri ile kesilir ve kabuk çıkarılır.
- 300 saniye süre ile CAM tepkileri gözlemlenir. Ortaya çıkan her endpoint (olay) için zaman saniye olarak kaydedilir.
- Dikkate alınması gereken endpointler;
 - ✓ **Hemoraji**
 - ✓ **Lizis**
 - ✓ **Koagülasyon**
- Tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilmesi için referans fotoğrafların kullanılması faydalıdır.
- Deney esnasında gözlemlenen ekstra durumlar da raporlanmalıdır.



Deney Öncesi

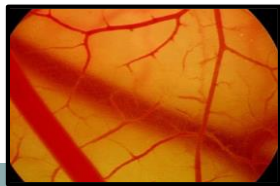


Lizis

(Damarların Parçalanması)



**Hemoraji
(Kanama)**



Koagülasyon

