

YİĞİT SEZER

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL.
ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2018

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**SENTETİK KANNABİNOİD JWH-018'İN TOKSİKOLOJİK
ÖZELLİKLERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI**

YİĞİT SEZER

**DANIŞMAN
PROF. DR. BÜKET ALPERTUNGA**

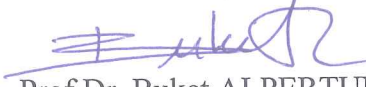
**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

DOKTORA TEZİ ONAYI

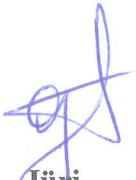
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, DOKTORA Programında Doktora öğrencisi Yiğit SEZER tarafından Prof.Dr. Buket ALPERTUNGA'nın danışmanlığında hazırlanan "Sentetik Kannabinoid JWH'018'in Toksikolojik Özelliklerinin İn Vitro Araştırılması" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 14 /09/ 2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı
Danışman


Prof.Dr. Buket ALPERTUNGA
İstanbul Üniv.Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı


Jüri
Prof.Dr. Münevver AÇIKKOL
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Adli Tıp Enstitüsü


Jüri
Prof.Dr. Gülten Z. OMURTAG
Medipol Üniv.Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı


Jüri
Prof .Dr. Gül ÖZHAN
İstanbul Üniv.Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı


Jüri
Doç.Dr. Eren ÖZÇAĞLI
İstanbul Üniv. Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

YİĞİT SEZER



TEŞEKKÜR

Hayatımın Adli Tıp Kurumunda Adli Tıp Uzmanlığı asistan doktoru olarak ve sonrasında Adli Tıp Kurumu 2. Adli Tıp İhtisas Kurulunda (Çalıştığım zaman diliminde tıbbi uygulama hatalarına bakıyordu.) raportör olarak çalıştığım yoğun ve yorucu yıllarımda aynı zamanda gerçekleştirdiğim doktora çalışmam sürecinde dokunuşlarıyla hayatımın ana eksenini şekillendiren, üzerimdeki emeklerini asla ödeyemeyeceğim annem ve babama, tüm bu süreçte acı tatlı bir çok zorlu süreçlere birlikte göğüs gerdiğim ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim biricik eşime, bilimsel bakış açısı, insani yaklaşımıyla bir akademisyen olarak bende her zaman hayranlık uyandıran, bu zorlu süreçte beni her zaman destekleyen ve hep olumlu teşvik eden, eşsiz nezaket sahibi sayın hocam Profesör Doktor Buket Alpertunga'ya, tez çalışmamda deneyler ve sonraki süreçlerde yoğun çalışma temposuna rağmen bana vakit ayırarak tecrübelerini benden hiçbir zaman esirgemeyen Tarbın Çevik Januzzi'ye, doktora ders dönemimde kendilerinden ders aldığım sevgili hocalarım Profesör Doktor Gül Özhan ve Doçent Dr. Sibel Özden'e ve tüm anabilim dalı çalışanlarına tüm katkılarından dolayı şükranlarımı sunuyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:55841

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİLLER LİSTESİ	VI
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Vİİİ
ÖZET	İX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
4. BULGULAR	45
5. TARTIŞMA.....	56
KAYNAKLAR	61
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	68
ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Kannabinoid ve sentetik kannabinoidlerin tarihçesi

Şekil 2-2: 2005-2013 yılları arasında Avrupa Birliği Erken Uyarı Sistemine bildirilen yeni psikoaktif maddelerin sayısı ve temel grupları

Şekil 2-3: Şekil 2-3: Sentetik kannabinoidlerin ticari ürün formları

Şekil 2-4: JWH-018' in yapısal formülü, fizikokimyasal özellikleri

Şekil 2-5: THC ve JWH-018 ve metabolitlerinin CB1 ve CB2 reseptörleri üzerindeki etkileri

Şekil 4-1: JWH-018'in SH-SY5Y hücreleri üzerine sitotoksitesinin değerlendirilmesi

Şekil 4-2: Protein standart ölçü eğrisi

Şekil 4-3: GSH standart ölçü eğrisi

Şekil 4-4: 24 saat JWH-018 maruziyetleri sonrası SH-SY5Y hücrelerinde GSH seviyesi

Şekil 4-5 GSH-Px standart ölçü eğrisi

Şekil 4-6 : 24 saat JWH-018 maruziyetleri sonrası SH-SY5Y hücrelerinde GSH-Px aktivitesi

Şekil 4-7: 24 saat JWH-018 maruziyetleri sonrası SH-SY5Y hücrelerinde GR aktivitesi

Şekil 4-8: CAT tayini için standart ölçü eğrisi

Şekil 4-9: 24 saat JWH-018 maruziyetleri sonrası SH-SY5Y hücrelerinde CAT aktivitesi

Şekil 4-10: JWH-018 maruziyeti sonrası SH-SY5Y hücrelerinde SOD aktivitesi

Şekil 4-11: Protein Karbonil standart ölçü eğrisi

Şekil 4-12: JWH-018 maruziyeti sonrası SH-SY5Y hücrelerinde protein karbonilizasyon seviyesi

Şekil 4-13: JWH-018 maruziyeti ile SHSY5Y hücreleri üzerindeki lipid peroksidasyon seviyesi

Şekil 4-14: 7JWH-018 maruziyetinin SH-SY5Y hücrelerinde oluşturduğu apoptotik nekrotik etkileri

Şekil 4-15: SH-SY5Y hücrelerinde JWH-018 maruziyeti sonrası Comet tayini sonuçları



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

CB1: Kannabinoid reseptör 1

CB 2: Kannabinoid reseptör 2

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

EDTA: Etilendiamin tetra asetik asit

GDH: Glutamat dehidrojenaz

GPX: Glutasyon peroksidaz

GR: Glutasyon redüktaz

GSH: Glutasyon

HCl: Hidroklorik asit

IC₅₀: %50 İnhibitör Konsantrasyon

LDH: Laktat dehidrojenaz

MDA: Malondialdehit

MTT: [3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazoliumbromide]

NaCl: Sodyum Klorür

NRU: Neutral red uptake

PBS: Fosfat tamponu

PI: Propidyum İyodür

SOD: Süperoksit dismutaz

TBARS: Tiyobarbitürik asit reaktif maddeler

TCA: Trikloroasetik asit

THC: Tetrahidrokannabinol

ÖZET

Sezer, Y. (2017). Sentetik kannabinoid JWH-018'in toksikolojik özelliklerinin *in vitro* araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi/Farmasötik Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Son yıllarda THC gibi beyin ve periferik dokularda kannabimimetik etki gösteren yeni nesil sentetik kannabinoidlerin kullanımı giderek yaygınlaşmakta ve sentetik kannabinoidlere bağlı çok ciddi hatta ölümcül yan etkiler rapor edilmektedir. İlk jenerasyon sentetik kannabinoidlerin temsilcisi olan JWH-018 esrarın öforik ve psikoaktif etkilerinden sorumlu olan CB1 reseptörü üzerinde THC'den 4-5 kat daha yüksek afinite göstermektedir.

Günümüzde sentetik kannabinoidlerin sitotoksisite mekanizmalarını araştıran çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada JWH-018'in insan nöroblastom SH-SY5Y hücre dizisinde sitotoksik, apoptotik, genotoksik etkileri ve oksidatif stres parametreleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Sitotoksisitenin ve IC50 değerinin belirlenmesi amacıyla MTT, NRU ve LDH testleri yapılmıştır. MTT, NRU ve LDH testlerinde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

Oksidatif stres parametrelerini değerlendirilmek üzere maruziyet sonrası glutatyon (GSH), tiyobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) ve protein karbonil seviyeleri; glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri ölçülmüştür. Genotoksisite tayini için Comet analizi, apoptoz/nekroz oranının belirlenmesi için Annexin V/PI boyaması yapılmıştır. Oksidatif stres parametrelerinden GSH seviyesinde anlamlı düşüş, protein karbonilizasyon seviyesinde anlamlı artış, GR ve CAT aktivitelerinde anlamlı düşüşler görülmüştür. Apoptoz/nekroz oranında ve genotoksisite değerlendirilmesinde JWH-018 maruziyetine bağlı olarak anlamlı değişim gözlenmemiştir .

Anahtar Kelimeler: Sentetik kannabinoid, JWH-018, Nöroblastoma SH-SY5Y, *In vitro* sitotoksisite, oksidatif stres

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 55841

ABSTRACT

Sezer, Y. (2017). In vitro assessment of the cytotoxic, genotoxic and oxidative stress effects of a synthetic cannabinoid JWH-018 in human SH-SY5Y neuronal cells. İstanbul University, Institute of Health Sciences, Pharmacy Faculty/Pharmaceutic Toxicology Department. PhD Thesis. İstanbul.

Abuse of new generation synthetic cannabinoids has been increasing due to THC like cannabimimetic effects on Central Nervous System and serious side effects even fatalities due to synthetic cannabinoids abuse have been reported. JWH-018, one of the first generation of new syntethic cannabinoids, shows 4-5 times higher binding affinity to CB1 receptor which is responsible for euphoria and psychoactive effects of marijuhana.

There are very few studies investigating the cytotoxicity mechanisms of synthetic cannabinoids. In this study, JWH-018's cytotoxic, apoptotic, genotoxic effects and effects on oxidative stress parameters on neuroblastoma SH-SY5Y cell line were investigated. Firstly, MTT, NRU and LDH assays were performed to determine cytotoxicity and IC50 value. According to MTT, NRU and LDH test results, there were no statistically significant change in cell viability observed.

Evaluating the oxidative stress parameters, glutathione (GSH), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyl levels and glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) acitivities were measured. For genotoxicity evaluation, Comet assay was performed. For apoptosiz/necrosis ratio determination, Annexin V/PI assay was performed. There was a statistically significant decrease in GSH levels, decrease in glutathione reductase and catalase enzyme activities and increase in protein carbonylation levels. There was no statistically significant change in apoptosis/necrosis ratio and comet assay observed due to JWH-018 exposure.

Key Words: Synthetic cannabinoid, JWH-018, Neuroblastoma SH-SY5Y, In vitro cytotoxicity, Oxidative stress

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 55841

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yeni nesil psikoaktif maddelerin uyuşturucu madde pazarına girmesi Dünyada hemen hemen tüm ülkeleri etkileyen önemli bir halk sağlığı sorununa neden olmuştur. “Yasal kafa yapıcılar” olarak da pazarlanan bu ürünlerin içerikleri anlaşıldıkça bir çok ülkenin yasal otoritelerince düzenli olarak takip edilip yasaklanmaya başlanmıştır. Yeni psikoaktif maddeler tabiri ile genellikle sentetik kannabinoidler (SK’ler) ve katinonlar kast edilmektedir. Sentetik kannabinoidler ilk defa 1970’lerde ağrı ve kanser tedavilerinde endokannabinoid yollarının farmakolojik etkileri araştırılırken sentezlenmiştir (Debruyne ve ark., 2015; Langer ve ark., 2014). Yasa dışı ise ilk defa 2008’de Almanya’da “Spice”, “K2”, “Yucatan”, “Chill”, “Black Mamba” gibi birçok isimle satışa sunulan tütün karışımlarında rastlanmıştır. Ambalajlarında “sigara olarak içilemez”, “insan tüketimi için değildir” şeklinde ibareler bulunmakta olan bu ürünler çoğunlukla bitkisel tütsü şeklinde pazarlanmaktadır (EMCDDA, 2009, 2016). Ülkemizde daha çok “bonzai” ismiyle tanınmakta olan sentetik kannabinoidler kannabinoid reseptör agonisti olarak işlev görmektedirler. Bugüne kadar bilinen en az iki adet sentetik kannabinoid reseptörü (CB1 ve CB2) tanımlanmıştır. Sentetik kannabinoidler, CB1 reseptörü üzerinden gösterdikleri öfori veya diğer psikoaktif etkilerinden dolayı esrarın potansiyel alternatifi olarak sunulmaktadır (Carter ve ark., 2011; Collen, M., 2012; Herkenham ve ark.,1990; Lindigkeit ve ark., 2009; Poso A, 2008; Svíženská ve ark., 2008; Wells ve Ott, 2011). Bu maddelerin insanlarda olası yan etkilerine dair çalışmalar yetersizdir. Toksisitelerine dair mevcut bilgilerin çoğu acil servis olgu sunum ve adli otopsi raporlarından elde edilmiştir. Genellikle “bonzai” kullanıcıları acil servislere hipertansiyon, taşikardi, aritmi, göğüs ağrısı, kan glukoz düzey değişiklikleri, hipokalemi, halüsinasyonlar, nöbetler, myoklonik ajitasyonlar, akut psikotik atak gibi şikayetlerle başvurmakta olup, ölümle sonuçlanan tablolara da rastlanmaktadır (Brewer ve ark.,2014; Gunderson ve ark., 2012; Lapoint ve ark., 2011; Müller ve ark., 2010; Pant ve ark., 2012; Papanti ve ark., 2013; Santacroce ve ark.,2015; Young ve ark., 2012). Kronik sentetik kannabinoid kullanımına bağlı olarak ise tolerans, bağımlılık ve ciddi geri çekilme

sendromları bildirilmeye başlanmıştır (Besli ve ark., 2015; Macfarlane ve ark.,2015; Zimmermann ve ark., 2009).

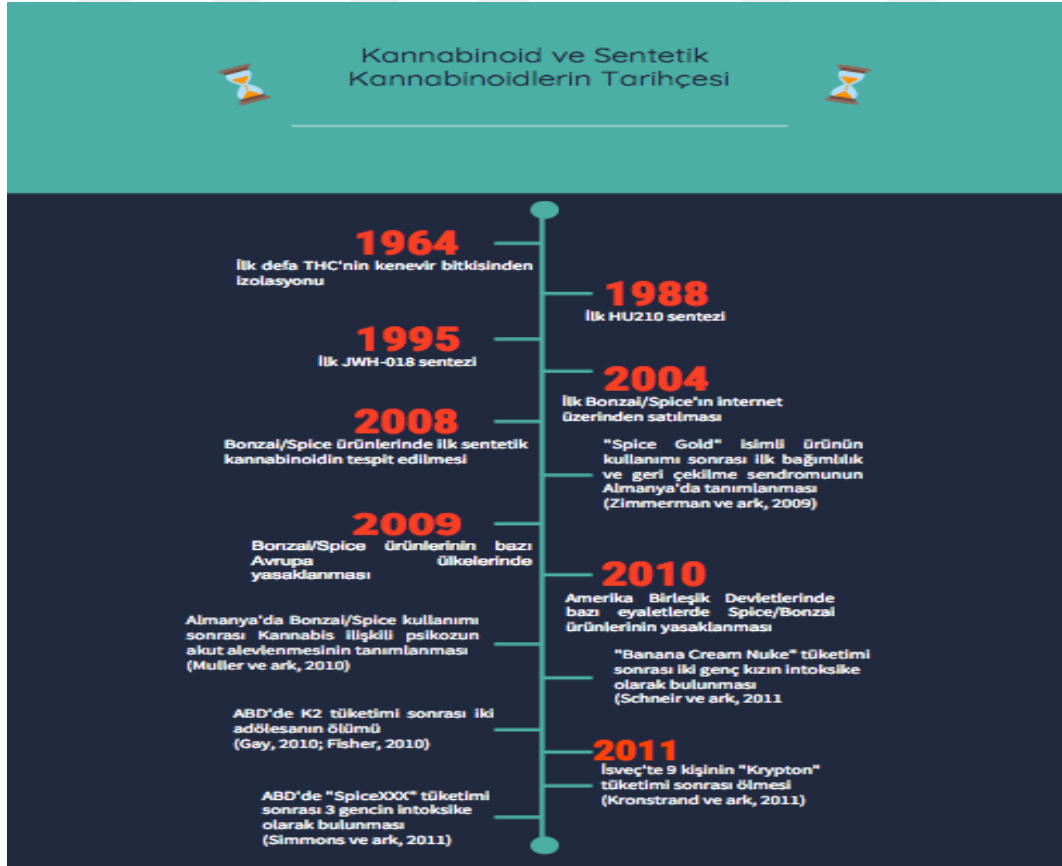
JWH-018 [1-pentil-3-(1-naftoil) indol] yeni nesil yasadışı uyuşturucu maddeler arasında popüler olan ve dönemsel olarak değişmekle birlikte sık rastlanılan maddelerden biridir (EMCDDA, 2016; Lindigkeit ve ark., 2009). İlk defa John W. Huffman tarafından 1990'ların başlarında CB1 ve CB2 reseptörlerinin aktivite ve bağlanma dinamikleri araştırılırken sentezlenen full kannabinoid reseptör agonisti indol türevi bir kannabinoiddir. JWH-018 intoksikasyon olgularında anksiyete, lokal veya jeneralize nöbet, psikoz, paranoya, deliryum, halüsinasyon gibi ciddi nörodavranışsal semptomlara rastlanmaktadır. JWH-018 maddesinin toksikolojik profili ile ilgili yayımlanmış çalışma sayısı azdır.

Bu çalışmada JWH-018'in SH-SY5Y insan nöroblastom hücrelerindeki in vitro nörotoksik etkilerinin aydınlatılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sentetik Kannabinoidler

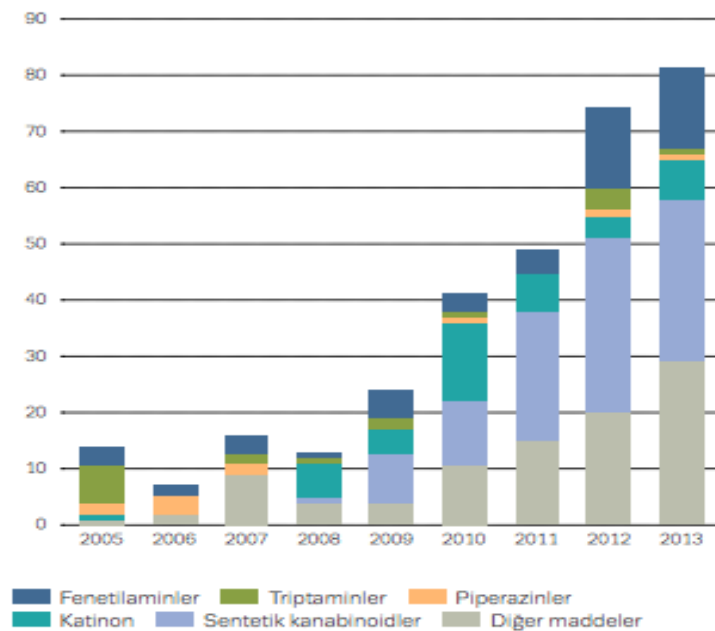
Kannabinoidler CB1 ve CB2 reseptörlerine bağlanıp birçok organ sisteminde çok çeşitli etkiler gösteren moleküllerin ortak adıdır. Üç ana grupta sınıflandırılabilirler; doğal kannabinoidler, endojen kannabinoidler, sentetik kannabinoidler (Khullar ve ark., 2014). En iyi bilinen doğal kannabinoid örneği olan delta-9-tetrahidrokannabinol (THC) esrarın ana psikoaktif bileşenidir. THC parsiyel agonistik etkilerini primer olarak santral sinir sisteminde bulunan CB1 kannabinoid reseptörleri ve perifer yerleşimli olan CB2 kannabinoid reseptörleri aracılığıyla göstermektedir (Koller ve ark., 2013). Endojen kannabinoidlere 2-arahidogliserol ve anandamid örnek verilebilir. Kannabinoidlerin daha etkili terapötik kullanımı amacıyla yapılan uzun süreli araştırmalar sonucu 1970'lerde SK'ler üretilmeye başlanmıştır (Carter ve ark., 2011; Lindigkeit ve ark., 2009; Poso A, 2008; Wells ve Ott, 2011). Şekil 2-1' de Kannabinoid ve Sentetik kannabinoidlerin tarihçesi görülmektedir.



Şekil 2-1: Kannabinoid ve sentetik kannabinoidlerin tarihçesi

Başlangıçta sentetik türevler tamamen yeni bir ilacın farmakolojik olarak değerlendirilmesinde veya spesifik etki mekanizmaları ve bunların kliniğe yansımalarının araştırılmasında kullanılırken, 1970'lerden itibaren sentezlenen madde sayısı ve psikoaktif amaçlı kullanımları hızla artmıştır. "Spice" adı altında solunum yoluyla alınabilir (sigara şeklinde sarım, kova, nargile vb.) bitkisel karışımların internet üzerinden ve çeşitli özelleşmiş mağazalarca 2006'dan beri satıldığı ve metaveri raporlarına göre (Google Insights web searches) bu tarih 2004'lere kadar uzanabilmektedir. 2007'de İsveç Reitox Ulusal Uyuşturucu İzlem Merkezi (NFP) tarafından 10 kadar "Spice" ürünlerine bağlı nöbet öyküsü bildirilmiş, Avrupa Birliği tarafından 2008 yılında yeni nesil psiko aktif maddeler için "erken uyarı sistemi (EWS)" başlatılmış ve yasal olarak bu ürünler izlenmeye başlanmıştır. ABD'de sentetik kannabinoidlerle ilgili ilk resmi rapor 2008'de hazırlanmıştır. 2009'a doğru popülerlikleri tüm dünyada artmış ve günümüzde tüm dünyada esrardan sonra en sık tüketilen madde grubu haline gelmişlerdir. (Atwood ve ark., 2010; EMCDDA, 2009; NIDA, 2012; Spaderna ve ark., 2013).

Sentetik kannabinoidler yasal otoritelerce ele geçirilen yeni nesil psikoaktif maddeler arasında da en önemli grubu oluşturmaktadır (Şekil 2-2).



ŞEKİL 2-2: 2005-2013 yılları arasında Avrupa Birliği Erken Uyarı Sistemine bildirilen yeni psikoaktif maddelerin sayısı ve temel grupları*

* EMCDDA Europol 2015 yıllık raporundan uyarlanmıştır (EMCDDA, 2015).

Ülkemizde ilk defa 2009 yılında “Spice” daha sonraları “Bonzai” sokak ismiyle karşımıza çıkan ve TUBİM (Türkiye Uyuşturucu Bağımlılığını İzleme Merkezi) tarafından yakın takibe alınan sentetik kannabinoidler 07/01/2011 tarihli ve 2011/1310 Sayılı Bakanlar Kurulu Kararıyla 2313 Sayılı Uyuşturucu Maddelerin Murakabesi Hakkında Kanun kapsamına alınmıştır (Resmi Gazete, 2011).

Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi (UNODC) bu maddeleri kimyasal yapılarına göre altı grupta sınıflandırmaktadır (Collen, M., 2012; Wiley ve ark., 2012).

- 1.Klasik kannabinoidler (THC, kannabisin diğer bileşenleri ve bunların yapısal olarak ilişkili sentetik analogları, örn; HU-210, AM- 906 vb.)
- 2.Klasik olmayan kannabinoidler (siklohekzilfenoller veya 3-aril siklohekzanoller; CP-47,497, CP-55,940 vb.)
- 3.Hibrid kannabinoidler (klasik ve klasik olmayan kannabinoidlerin yapısal özelliklerinin kombinasyonu, örn; AM-4030 vb.)
- 4.Aminoalkilindoller (AAI); JWH-018, JWH-073, JWH-398 vb.
- 5.Eikazanoidler (anandamid gibi endokannabinoidler ve bunların metanandamid gibi sentetik analogları)
- 6.Diğerleri; diarilpirazoller (selektif CB1 antagonisti Rimonabant), JWH-307, naftilmetilindenler veya naftalen-1-il-(4-pentoksinaftalen-1-il) metanon türevleri.

Sentetik kannabinoidler çoğunlukla farklı bitkilerden oluşan karışımlara çözünmüş şekilde püskürtülmekte ve bu şekilde hazırlanan ürünler “Bonzai, K2, Spice, Spice Silver, Spice Gold, Spice Diamond” ve daha birçok farklı isim ve ambalajlarla “insan tüketimi için değildir”, “tütsü”, “potpori” veya “yalnızca aromaterapi için” gibi etiketlerle pazarlanmakta ve genel olarak nargile veya

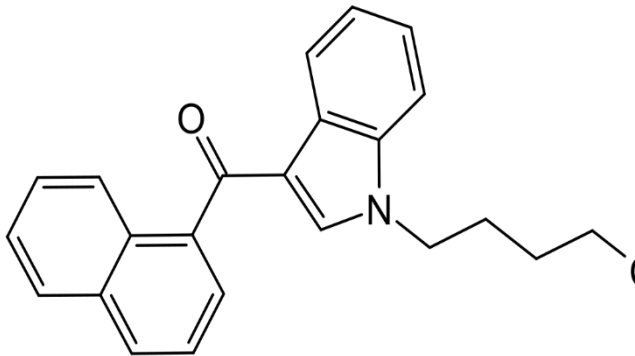
sigara kağıdına sarılarak inhalasyon yoluyla kullanılmaktadırlar (Şekil 2-3) (Bebarta ve ark., 2012; Gurdal ve ark., 2013; Seely ve ark., 2012).



Şekil 2-3: Sentetik kannabinoidlerin ticari ürün formları

2.2. JWH-018

JWH-018 (Şekil 2-4) Avrupa Uyuşturucu Ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (EMCDDA) tarafından Erken Uyarı Sistemi (EWS) ile rapor edilmiş ilk sentetik kannabinoiddir.



Moleküler Formül; C₂₄H₂₃NO
Molekül Ağırlığı; 341,445 g/mol
Çözünürlük; suda, 4,31X10⁻³ mg/L (25 °C)
Erime derecesi; 54-60 °C

Şekil 2-4: JWH-018' in yapısal formülü, fizikokimyasal özellikleri

JWH-018 [1-pentil-3-(1-naftoil)indol], diğer birçok indol- pirol- türevi kannabinoid gibi John W. Huffman ve ekibi tarafından 1990'ların başlarında CB1 ve CB2 reseptör bağlanma ve aktivasyon dinamiklerini belirleme amaçlı sentezlenmiştir (Hurst ve ark., 2011). JWH-018, bitkisel materyaller içerisinde en sık rastlanan sentetik kannabinoidlerden biridir (Seely ve ark., 2013).

2.2.1. Metabolizması

Sentetik kannabinoidlerin toksisiteleri değerlendirilirken THC ile olan farmakokinetik/farmakodinamik farklılıklar da göz önüne alınmalıdır. THC yaygın olarak önce sitokrom P450 enzimleri tarafından metabolize edilip, sonrasında konjugasyona uğrayıp idrar yoluyla atılır. THC özellikle hepatik ve intestinal CYP2C9 ve CYP3A4 enzimleri tarafından aktif psikoaktif metaboliti olan 11-hidroksi-THC ve diğer biyolojik aktif olmayan ara ürünlerine dönüştürülür. 11-hidroksi-THC metaboliti kısa ömürlüdür ve biyolojik olarak inaktif ara ürünler oluşturmak üzere okside edilir. 11-hidroksi -THC'nin direkt olarak oksidasyonu ise inaktif metaboliti olan THC-COOH (11-nor-9-karboksi-THC) 'yi oluşturur. İnsan idrarındaki ana metaboliti THC-COOH ve glukuronid konjugatıdır.

Sentetik kannabinoidlerin farmakokinetik özellikleri ve metabolitleri ile ilgili çok az bilgi mevcuttur. Yapılan çalışmalar JWH-018 ve diğer benzer yapısal özellikleri olan aminoalkilindol, sikloheksilfenol ve benzoilindol yapısındaki SK'lerin sitokrom P450 enzimleri tarafından okside edildiğini, ve UDP-glukuroniltransferazlarla (UGT) konjuge edildiğini göstermiştir. JWH-018'in oksidasyonunda rol oynayan sitokrom P450 enzim izoformları CYP2D6, CYP2C9 ve CYP1A2'dir. THC'nin aksine CYP3A4 enzimlerinin SK'lerin metabolizmasında küçük bir rolü olduğu, oral yolla alımları halinde JWH-018'in detoksifikasyonuna katılmadıkları bildirilmiştir. Akciğerlerde çok miktarda bulunan ve yüksek indüklenebilme özelliğine sahip CYP1A2 enziminin inhalasyon (sigara şeklinde sarım vb) şeklinde alımında, metabolizmada önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir. Nöronal hücrelerde çok az eksprese olan CYP3A4, CYP2C9 ve CYP1A2'nin SK'lerin ve THC'nin santral sinir sistemindeki

metabolizmasında bir rolü olmadığı düşünülmektedir. CYP2D6 enziminin THC metabolizmasında görece katkısı pek bilinmemekle birlikte bu izoform SK'lere karşı aktif olduğu için, SK'ler ve diğer aktif metabolitlerinin beyin konsantrasyonlarının düzenlenmesinde önemli bir rolü bulunabileceği bildirilmiştir. CYP2D6, karaciğer sitokrom P450 içeriğinin %1-5'ini oluştursa da serebral korteks, hipokampus ve serebellumda ciddi konsantrasyonlarda bulunmaktadır. İlginç olarak bu bölgelerde CB1 reseptörü ekspresyonu da yüksektir. SK'lerin nöronal metabolizması ve buna CYP2D6' nın katkılarını aydınlatılacak ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu bildirilmektedir. Diğer bir önemli nokta ise, SK'lerin metabolizmasında rol aldığı tanımlanmış tüm sitokrom P450 enzimlerinin, SK'lerin toksisitesine bireysel yatkınlıkları ciddi şekilde arttırabilecek genetik polimorfizmlere sahip olduklarıdır (Chimalakonda ve ark., 2012; Zhou ve ark., 2009).

Sitokrom P450 oksidasyonu sonrası SK metabolizmasındaki bir sonraki aşama glukuronidasyon (konjugasyon) basamağıdır. JWH-018 kullanan bireylerin idrar örneklerinin analizinde yüksek konsantrasyonlarda glukuronid metabolitleri olduğu gösterilmiştir. JWH-018'in metabolizmasında rol alan izoformları belirlemek için rekombinant UGT'ler kullanan bir çalışmada karaciğer metabolizmasında rol alan majör izoformların UGT1A1, UGT1A3, UGT1A9, UGT1A10 ve UGT2B7 olduğu tespit edilmiştir. Çalışmalara göre UGT1A3 ve UGT2B7, JWH-018 metabolizmasında rol alan baskın izoformlar olarak tespit edilmiştir (Chimalakonda ve ark., 2011). İnsan beyinde hem sitokrom P450 hem de UGT enzimleri bulunduğu için bu izoformların santral sinir sistemindeki konsantrasyonları da CB1 reseptörlerine bağlanan ve bu reseptörleri aktive eden SK konsantrasyonlarını etkileyecektir (Fantegrossi ve ark., 2014).

Sentetik kannabinoidlerin metabolizmasında etkili enzimlerin belirlenmesinin yanında metabolizma sonucu ortaya çıkan aktif ara ürünlerin tespiti de çok önemlidir. 11-hidroksi-THC hariç, THC metabolitlerinin önemli biyolojik aktiviteye sahip olmamaları göz önüne alındığında THC oksidasyonu ve bunu izleyen konjugasyonu THC'nin klasik detoksifikasyon metabolik yolu olarak değerlendirilir. Sentetik kannabinoidler açısından bakıldığında ise metabolitlerin biyolojik aktivitelerini kaybetmeyişi, bu maddelere bağlı ciddi

reaksiyonların gelişimine katkıda bulunuyor olabilir. Sentetik kannabinoidlerin birçok metaboliti ve okside türevleri CB1 reseptörü üzerinde agonist, nötral antagonist, ve/veya invers agonist etki gösterebilmektedir. Örneğin JWH-018'in insan kanında tespit edilebilen bir metaboliti olan omega hidroksil metaboliti CB1 agonisti olup THC ile benzer affinite göstermektedir. İlginç olarak omega hidroksil metabolitinin glukuronik asit konjugatı da CB1 afinitesine sahip olmakla birlikte nötral antagonist etkileri tespit edilmiştir (Fantegrossi ve ark., 2014). Bu konjugat primer olarak idrarda tespit edilebilmekle birlikte, antagonist etkilerinin JWH-018'e tolerans geliştirilmesinde rol alıp almadığı bilinmemektedir. Kronik olarak THC ve sentetik kannabinoid tüketen bireylerde tolerans ve çapraz tolerans tespit edilmiş olup, bu durumun büyük olasılıkla CB1 reseptör desensitizasyonu ve azaltarak regülasyonuna (downregülasyon) bağlı geliştiği bildirilmiştir (Su ve ark., 2015).

2.2.2. Etki mekanizması

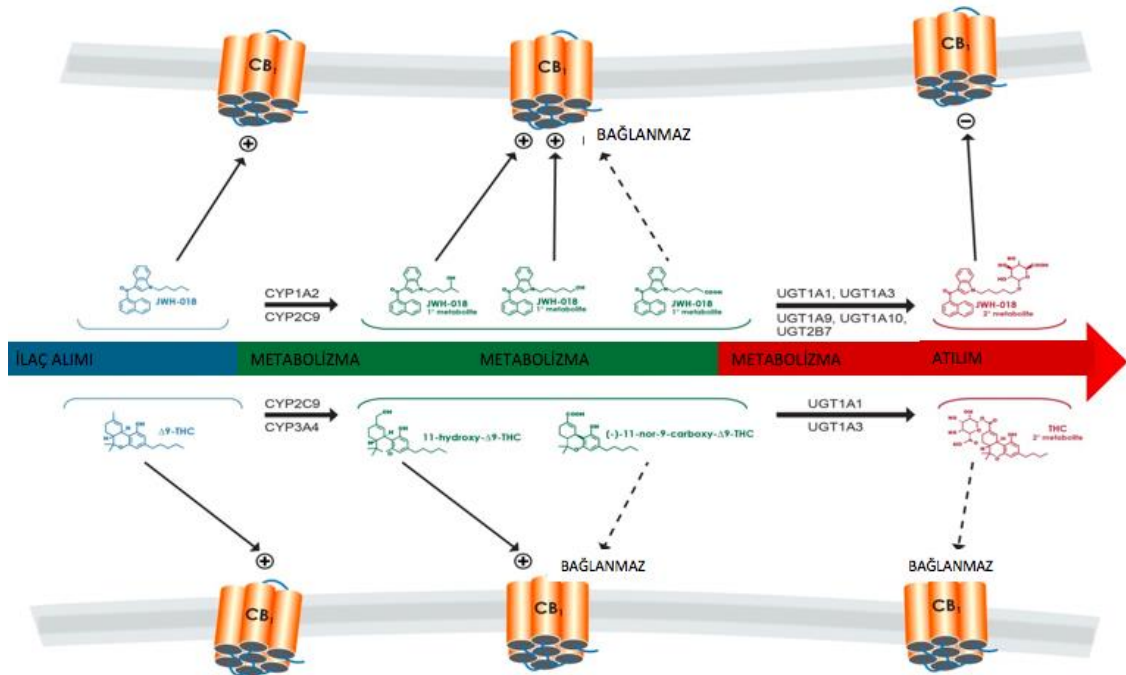
Bu maddeler etkilerini daha çok THC gibi kannabinoidlerin psikoaktif özelliklerinden sorumlu CB1 reseptörleri ve ayrıca kannabinoidlerin immünomodülatör etkilerinden sorumlu olan CB2 reseptörleri aracılığıyla göstermektedirler (Koller ve ark., 2014; Koller ve ark., 2013; Lindigkeit R, 2009). CB1 reseptörleri merkezi ya da periferik sinir sistemi, kemik, kalp, karaciğer, akciğer, vasküler endotelyum ve üreme sisteminde bulunmaktadır. CB2 reseptörleri başlıca immun sistemde yoğunlaşmış olmakla birlikte az miktarda merkezi sinir sisteminde de bulunurlar. Sentetik kannabinoidler çoğunlukla presinaptik terminaller üzerine yerleşmiş olan G-protein bağlı CB1 reseptörlerini uyarırlar. CB1 reseptör aktivasyonu hücresel siklik adenosin monofosfat (cAMP) miktarını düşürür ve kannabimimetik cevap oluşmasını sağlar. Sentetik kannabinoid reseptör agonistleri, voltaj-kapılı iyon kanalları ile etkileşime girerek potasyum, sodyum ve N ile P/Q tip kalsiyum kanallarını inhibe eder ve membran potansiyelini düşürürler (Ashton ve ark., 2009; Gerra ve ark., 2010; Koller ve ark., 2013; Van Sickle ve ark., 2005).

Birçok farklı sentetik kannabinoidin organizma üzerindeki ortak dört ana etkisi; hipotermi, analjezi, katalepsi ve lokomotor baskılamadır. Bu etkilere

kannabinoid tetradı adı verilir ve bu etkilerin derecelendirilmesi ile farklı maddelerin reseptörler üzerindeki etkileri karşılaştırılır. THC ile kıyaslandığında bazı sentetik kannabinoidler CB1 reseptörüne 4-5 kat daha fazla bağlanma afinitesine sahiptir.

JWH-018'in de dahil olduğu kannabinoidlerin ana kullanım nedeni öfori ve benzeri psikoaktif etkilerdir, ancak diğer klinik ve advers etkileri çok iyi bilinmemektedir. JWH-018 maddesi THC ile karşılaştırıldığında CB1 reseptörü için 4, CB2 reseptörü için ise 10 kat daha yüksek bir reseptör afinitesine sahiptir.

Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda JWH-018 maddesinin lokomotor aktiviteyi azalttığı, analjezi, hipertermi ve katelepsi gibi THC'nin neden olduğu etkilere benzer etkilere neden olduğu görülmüştür. Ayrıca JWH-018 ve diğer bazı sentetik kannabinoidlerin zayıflama üzerinde etkili olduğu düşünülmekte ve konu ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (Ashton ve ark., 2009; Gerra ve ark., 2010; Koller ve ark., 2013; Van Sickle ve ark., 2005). Şekil 2-6'da THC, JWH-018 ve metabolitlerinin kannabinoid reseptörleri üzerine olan etkisi özetlenmiştir (Su ve ark., 2015).



Şekil 2-5: THC ve JWH-018 ve metabolitlerinin CB1 ve CB2 reseptörleri üzerindeki etkileri

Su ve arkadaşlarının (2015) çalışmasından uyarlanmıştır.

*(+)Agonist, (-) Antagonist bağlanma afinitesini ve (X) Bağlanma afinitesi olmadığını işaret eder.

2.2.3. Toksik Etkileri

Sentetik kannabinoidlerin toksik etkilerine ilişkin bilgilerin çoğu yayınlanmış olan vaka çalışmalarının derlenmesiyle veya internet üzerinden paylaşımda bulunan bloglardan elde edilmiştir. En fazla rapor edilen etkiler anksiyete, öfke patlaması, paranoya, göz temasından kaçınma, ajitasyon, delüzyonlar, psikozlar, kusma ve tepkisizlik gibi santral sinir sistemi etkileri yanında taşikardi, hipertansiyon, göz iltihabı, terleme, göğüs kafesinde ağrı ve ağız kuruluğudur. Buna ek olarak bazı kaynaklar sentetik kannabinoid kullanımının intihara meyli arttırdığını belirtmişlerdir. Bazı vaka raporlarında, hafif hipokalemi, miyokard infarktüsü, böbrek yetmezliği ve konvülsiyonlar rapor edilmiştir. Bu ciddi toksik etkiler reseptör afinitesinin yüksek olmasıyla ilişkilendirilmektedir. Ancak toksik etki mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (Cohen ve ark., 2012; Hurst ve ark., 2011; Mir ve ark., 2011; Müller ve ark., 2010; Nicholson ve ark., 2010; Schneir ve ark., 2011; Vearrier ve ark., 2010).

Sentetik kannabinoidler ile ilgili bir diğer önemli nokta ise bitkisel ürünlere püskürtülen sentetik kannabinoid miktarlarındaki farklılıkların kullanıcılarda beklenmeyen farklı kan düzeylerine yol açması ve bunun sonucunda ciddi akut toksisite, hatta ölümcül komplikasyonların görülmesidir (Abel, E.L, 2013; Ameri, A., 1999; Gurdal ve ark., 2013; Seely ve ark., 2012; Seely ve ark., 2011; UNODC, 2011). Bazı olgularda ciddi geri çekilme ve bağımlılık bildirilmiştir (ACMD, 2009; Spaderna ve ark., 2013; Vardakou ve ark., 2010). Sentetik kannabinoid kullanımı sonucu ajitasyon/panik atak, paranoid reaksiyonlar, intihar düşünceleri, halüsinasyonlar ve duyarlı kişilerde psikozlar görülebilmektedir (Ashton ve ark., 2009; Bebartta ve ark., 2012; Gerra ve ark., 2010; Poso A, 2008; Van Sickle ve ark., 2005). Sentetik kannabinoid kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan sersemlik hissi, titreme, nöbetler gibi

nörolojik bulgular ile ajitasyon, agresyon, katatoni, paranoya, halüsinasyon, depersonalizasyon, disosiasyon, algısal değişiklikler gibi psikiyatrik bulguların THC kullanımına bağlı oluşan semptomlardan daha ağır seyrettiği bildirilmektedir (Atwood ve ark., 2010; EMCDDA, 2009; NIDA, 2012; UNODC, 2011). Ayrıca son yıllarda dünyada sentetik kannabinoid kullanımına bağlı hastane başvurularında büyük artış görülmüştür (EMCDDA, 2016). Birçok yan etkisine rağmen tek başına esrar kullanımına bağlı ölüm vakasına rastlanmaz iken, psikoaktif ve diğer istenmeyen etkilerinin yanında sentetik kannabinoidlere bağlı birçok ölüm olgusu bildirilmiş olup sayıları her geçen gün artmaktadır (Wells, 2011; J. L. Wiley ve ark., 2012). Sentetik kannabinoidlerin lokomotor depresan etkileri olduğu ve THC'e göre farelerde düşük dozlarda farklı bir tetrad profiline sahip oldukları tespit edilmiştir (Couceiro, 2016; Koller ve ark., 2014; Koller ve ark., 2013; Tomiyama ve Funada, 2011, 2014; J. L. Wiley ve ark., 2014). Uzun süreli sentetik kannabinoid kullanımına bağlı kronik etkiler hala tam olarak aydınlatılamamıştır (Seely ve ark., 2012).

Sentetik kannabinoidlerin akut istenmeyen etkilerine dair çalışmalar her geçen gün artmakla birlikte kronik istenmeyen etkilerine dair literatür bilgisi bulunmamaktadır. Ancak uzun dönem yoğun esrar kullanımına ait bilinen istenmeyen etkilerden çıkarımda bulunulabilir. Uzun süreli esrar kullanımı gençlerde artmış psikoz riski ile ilişkilendirilmiş olup (McGrath ve ark., 2010) bu etkinin yaş ve doz bağımlı olduğu bildirilmiştir (Arseneault ve ark., 2002; D'Souza ve ark., 2009). "Spice/Bonzai" ürünleri tüketimi psikoz nüksü ile ilişkilendirilmiştir (Every-Palmer,S., 2011; Every-Palmer,S., 2010). "Spice" isimli başka bir ürünün tekrarlayan psikotik atakları olan bir hastada psikotik semptomları tetiklediği raporlanmıştır (Müller ve ark., 2010). Yine 2011 yılında birden fazla sentetik kannabinoid kullanım öyküsü (sıklığı en az 3 hafta içinde 4 kez kullanım öyküsü ile 1,5 yıldır günlük kullanım aralığında değişen) olan on sağlıklı erkek hastada yeni başlangıçlı psikoz teşhisi konulmuştur. Bu on bireyin semptomları işitsel ve görsel halüsinasyonlar, paranoid delüzyonlar, düşünce blokajları, dezorganize konuşma, anksiyete ve uykusuzluk, stüpor ve intihar düşünceleri gibi çok çeşitlilik arz etmektedir (Hurst ve ark., 2011; Seely ve ark., 2012). Tüm bu vaka bildirimleri sentetik kannabinoidlerin esrar gibi psikozu tetikleyebildiğini göstermektedir. Ayrıca Spice/Bonzai kullanımına bağlı

ilk geri çekilme sendromu 8 ay boyunca her gün “Spice Gold” kullandığını bildiren 20 yaşında bir erkekte raporlanmıştır. Kişi Spice’ı rahatlatici, sakinleştirici ve esrar benzeri psikoaktif etkili olarak tanımlamıştır, ancak iç huzursuzluk, aşırı terleme, aşırı madde isteği, gece kabusları, titreme ve bir süre madde almayınca ortaya çıkan baş ağrıları nedeniyle tıbbi tedaviye başvurmuştur (Zimmermann ve ark., 2009).

2.3. İn Vitro Toksisite

İn vitro toksisite testleri, çeşitli kimyasalların toksisiteleri hakkında temel bilgiler verir ve daha sonra yapılacak hayvan denemeleri veya ileri mekanistik çalışmalar için kaynak oluşturur. Hücre temelli toksisite araştırmaları, gerek uygulama kolaylığı, gerekse in vivo çalışmalardan elde edilen verilerle uyum göstermesi nedeniyle, hayvan deneylerine alternatif olarak tercih edilmektedir (Riss ve Moravec, 2004). İn vitro toksisite testlerinde ilk adım sitotoksisite araştırmasıdır. Sitotoksisiteyi çoğunlukla oksidatif hasarın, DNA hasarının ve apoptotik etkinin araştırılması izlemektedir.

2.3.1. Sitotoksisite

Sitotoksisite yalnızca bir reseptör ve ilişkili hücrel fonksiyonun geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz durdurulması olabileceği gibi, hücrel aktivitenin geri dönüşümsüz durdurulması veya hücrel yapının onarılamaz bozukluğu olarak da tanımlanabilir. Hücre kültürlerine uygulanan sitotoksisite testlerinde test edilen maddenin hücre canlılığı ve ölümü, hücre membranı, hücre organelleri, protein veya DNA sentezi ve hücre bölünmesi üzerine etkileri ile ilgili bilgilere ulaşılır. Kolorimetrik, lüminometrik ve enzimatik olarak uygulanabilen sitotoksisite çalışmaları sonucunda ortamdaki canlı/ölü hücre miktarı belirlenir.

Kolorimetrik metodlarda, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT), 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid (XTT), 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum (WST) gibi çeşitli tetrazolyum tuzları kullanılarak oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülür, veya kristal viyole, nötral

kırmızısı gibi boya maddeleri kullanılarak hücrelerin spesifik boyanması esasına dayalı ölçüm yapılır.

Başlıca sitotoksisite testleri;

MTT testi: Sitotoksisite testleri içerisinde en sık kullanılanlardan biri olan MTT testi kantitatif kolorimetrik bir testtir. Bu testte sarı tetrazolyum tuzu MTT yaşayan hücrelerce mavi formazan kristallerine dönüştürülür. Önceleri tetrazolium tuzlarının mitokondriyal süreçlerde hücresel solunum zincirinin iki farklı bölümünde indirgendiği düşünülürken, formazan oluşumunda mikrozomal ve sitozolik ünitelerinde rol aldığı gösterilmiştir. MTT testi geniş hücre yoğunluğu spektrumlarında linearite gösteren hassas bir testtir. Mitokondriyal fonksiyonları bozulmamış ve canlı hücreler mavi formazan kristalleri oluştururken mitokondriyal fonksiyonu bozulmuş, ölü hücreler formazan kristalleri oluşturamazlar. Oluşan mavi renkli formazan kristalleri izo-propanol/DMSO ile çözülerek oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak 590 nm’de ölçülür (Bopp ve Lettieri, 2008; van Meerloo ve ark., 2011).

Laktat dehidrojenaz (LDH) testi: Hasarlanmış veya parçalanmış hücrelerin sitozollerinden salınan LDH aktivitesinin belirlenmesi esasına dayanan kolorimetrik bir testtir. Laktat dehidrojenaz, tüm hücrelerde bulunan sitoplazmik bir enzimdir. Hücreler, toksik etkilere maruz kaldığında plazma membran bütünlükleri bozulur ve LDH enzimi hücrelerden sızarak ortama geçer. Maruziyet sonrası LDH enzim aktivitesi ölçülerek hücre hasarı değerlendirilebilir (Bopp ve Lettieri, 2008; Fotakis ve Timbrell, 2006).

Nötral kırmızı testi: Nötral kırmızı, canlı hücrelerin içerisinde biriken kırmızı vital bir boyadır ve yaşayan hücrelerin tespitinde kullanılır (Fotakis ve Timbrell, 2006).

2.3.2. Oksidatif hasar oluşturma potansiyeli tespiti

Sağlıklı ve normal işleyen bir hücrenin oksidasyon redüksiyon dengesinde antioksidan kapasiteyi aşacak şekilde prooksidanların artması oksidatif stres olarak tanımlanmakta ve hücrede oksidatif hasara neden olabilmektedir. Serbest radikal ise tanım olarak son yörüngesinde bir adet eşlenmemiş elektron bulunduran moleküllere verilen isimdir. Ancak bu

moleküller stabilitelerini sağlayabilmek için bir elektron verme ya da alma konusunda yüksek aktiviteye sahiptirler. Endojen ve ekzojen kaynaklarca hücrede oluşturulan en önemli serbest radikal türlerinden olan reaktif oksijen türleri (ROS) oksidatif hasara ve hücresel fonksiyonların değişimine neden olabilmektedir. Hedef hücresel bileşenler içerisinde proteinler, lipid membranlar ve DNA en korumasız yapılardır. Tüm hücresel membranlar yapılarındaki yüksek konsantrasyondaki doymamış yağ asitlerine bağlı olarak özellikle korumasızdırlar (Evans ve Halliwell, 1999; Riss ve Moravec, 2004).

Reaktif türlerin hücresel bileşenlerle reaksiyonu sonucunda birtakım ürünler oluşmaktadır. Bu ürünler oksidatif hasarın derecesinin tayininde biyolojik göstergeler olarak kullanılmaktadır. Lipidlerde oluşan oksidatif hasarın tespiti için araştırılan ürün malondialdehid (MDA)' dir (Evans ve Halliwell, 1999).

Organizmadaki reaktif oksijen türleri süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri ve glutatyon (GSH) gibi düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar tarafından uzaklaştırılır. SOD, süperoksit radikallerinin H_2O_2 'ye spontan dismutasyonunu sağlar. H_2O_2 glutatyon peroksidaz gibi peroksidaz enzim ailesinin bir üyesi olan katalaz tarafından elimine edilir. Glutatyon peroksidaz H_2O_2 'ye çok yüksek affinite gösterir ve H_2O_2 'i düşük konsantrasyonlarda olsa bile elimine edebilir. GSH insanlarda, hayvanlarda, bitkiler ve aerobik bakterilerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan, H_2O_2 elimine edilirken glutatyon peroksidaz enziminin kofaktörü olarak elektron donörü rolünü üstlenen bir antioksidandır. ROS'lar vücudun antioksidan dengesini de etkilemek suretiyle oksidatif hasara yol açmaktadırlar. Oksidatif hasarın değerlendirilmesinde antioksidan moleküllerin aktivitelerindeki değişikliklerden de yararlanılmaktadır (Evans ve Halliwell,1999; Riss ve Moravec, 2004).

Protein oksidasyonu, proteinlerin organizmada çok miktarda bulunmasından dolayı önemli bir oksidatif hasardır. Reaktif türlerin proteinlerdeki amino asitlerde yaptığı modifikasyonlar, proteinlerin aktivitelerini kaybetmelerine neden olur. Erken aşamada oluşan stabil protein karbonil ürünleri okside proteinlerin tayininde ve oksidatif stres göstegesi olarak en sık kullanılan ürünlerdir (Cohen ve Nyska, 2002; Levine ve ark., 1990).

2.3.3. DNA hasarının tespiti

Reaktif türlerin, DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, abazik bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir (Cooke ve ark., 2003; Williams ve Jeffrey, 2000). Oksidatif DNA hasarı birçok yöntemle belirlenebilmektedir. Tek hücre jel elektroforezi (Single cell gel electrophoresis, SCGE) veya Comet yöntemi, DNA hasarını ölçmek ve analiz etmek amacıyla kullanılan, hızlı, basit, duyarlı ve yaygın kullanım alanına sahip bir tekniktir. İlk defa 1978 yılında DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kullanılan teknik daha sonra nötral pH'daki lizing şartlarında DNA çift sarmal kırıklarını tayin etmek üzere geliştirildi. Sonrasında protokole birtakım değişiklikler yapılarak yöntem alkali lizing koşullarında uygulandı. Günümüzde comet yöntemi protokolu küçük değişikliklerle dünya genelinde en yaygın kullanılan protokoldur. Yöntemin en önemli avantajlarından bir tanesi çok çeşitli hücre tiplerinde çalışma olanağı sağlamasıdır (Collins, A., 2002; Møller, P., 2006; Sasaki ve ark., 2007).

2.3.4. Apoptotik etkinin tespiti

Apoptoz, çeşitli metabolik ve fizyolojik işlemlerle hücrenin kendi kendisini yok etmesidir. Çok hücreli organizmaların gelişim ve devamlılığında, organ ve dokuların şekillenmesinde çok önemli rolleri olan programlı hücre ölümüne verilen isimdir. Hasar görmüş sağlam ve zararlı hücrelerin uzaklaştırılması, bağışıklık sisteminin düzenlenmesi ve sağlıklı fonksiyon görmesi, proliferasyon/homeostazis dengesi, hücresel gelişme ve farklılaşma gibi çok geniş biyolojik süreçlerde çok önemli roller üstlenir. Apoptoz süreçlerinde meydana gelen bozukluklar kanser, nörodejeneratif hastalıklar, otoimmünite, iskemi gibi ciddi patolojik süreçlerde rol almaktadır. Erken apoptotik süreçlerde ışık mikroskopunda hücresel büzüşme ve piknozis görülür. Kromatin kondensasyonu sonucu oluşan piknozis apoptosisin en karakteristik özelliğidir. Apoptotik süreç inflamasyonu tetiklemez, çünkü apoptotik hücre etrafına herhangi bir hücresel içeriğini salmaz, apoptotik hücre etrafındaki hücrelerce fagosite edilerek temizlenir. Apoptoz intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik yollar olmak üzere iki yolla gerçekleşir. Ekstrinsik yolda hücre

yüzeyindeki ölüm reseptörlerine ölüm sinyal moleküllerinin bağlanması ile kaspaz 8 ve kaspaz 3 yolları aktive edilir. İntrinsik yolda ise hücre içi sinyallerle apoptozis uyarısı alınmasıyla mitokondriyal sitokrom C salınımı ile kaspaz 3 aktive edilir (Archana ve ark., 2013; Coşkun ve Özgür, 2011). Nekroz ise yine bir hücre ölüm şekli olmakla birlikte apoptozdan histopatolojik ve fizyolojik farklılıklar gösterir. Yangı olayının eşlik ettiği bir süreç olan nekrozda hücreler şişer, parçalanır ve hücre içeriği hücre dışına salınır. Polimorfonükleer lökositler ve makrofajlar nekrotik dokuya göç eder ve fagositoz işlemi gerçekleştirilir (Coşkun ve Özgür, 2011). Apoptozu saptamak için farklı biyokimyasal yöntemler esas alınarak çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Apoptozun tespitinde morfolojik görüntüleme yöntemleri olarak ışık mikroskobu, hematoksin ve gimesa boyama yöntemleri, floresan mikroskobu/lazerli konfokal mikroskop ile propidium iyodür (PI), Hoechst dye boyama yöntemleri, elektron mikroskobu, faz kontrast mikroskobu, immunohistokimyasal yöntemler olarak anneksin V yöntemi, TUNEL yöntemi, ve kaspaz-3 yöntemi, biyokimyasal olarak agaroz jel elektroforezinde DNA fragmentasyonu ve Western Blotting yöntemleri kullanılabilmektedir (Coşkun ve Özgür, 2011).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Apoptoz tespit kiti (Annexin V-FTIC/PI) (Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen, pH 7,4; 10X)	Santa Cruz
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Biomatik
Eagle'in minimum esansiyel besiyeri (EMEM)	Gibco
EnzyChrom Glutasyon peroksidaz tayin kiti	Bioassay Systems
EnzyChrom Glutasyon redüktaz tayin kiti	Bioassay Systems
Etil alkol	Merck
Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)	Sigma-Aldrich
Fetal sığır serum (FBS)	Gibco
Fosfat tampon çözeltisi (PBS)	Gibco
GSH ELISA kiti	Bioassay Technology Laboratory
Ham's F12 Besiyeri	Gibco
Hidroklorik asit (HCl)	Merck
JWH-018 ($\geq 98,5$)	Lipomed
Katalaz tayin kiti	Sigma-Aldrich
LDH tayin kiti	RayBiotech, Inc.
MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazol-2-il)-2,5-difenil-2H tetrazolyum bromür]	Biomatik
Nötral kırmızısı boyası	Sigma-Aldrich
Penisilin-Streptomisin çözeltisi	Gibco
Protein Karbonil ELISA tayin kiti	Bioassay Technology Laboratory

Protein tayin kiti	iNtRON Biotechnology, Inc.
QuantiChrom TBARS kiti	Bioassay Systems
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma Aldrich
Süperoksit Dismutaz tayin kiti	Sigma-Aldrich
Tripan mavisi	Fluka
Tripsin	Multicell
Triton X-100	Biomatik

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Ayarlanabilir otomatik pipet (0,1-2,5 µL; 0,5-10 µL; 10-100 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	Eppendorf
Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik dispenser pipet (15-300 µL)	Eppendorf
Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik pipet (1-10 µL; 30-300 µL)	Eppendorf
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik
Derin dondurucu (-80 °C)	Wisecry Daihan Scientific
Elektroforez güç kaynağı	Thermo Scientific (EC300 XL)
Elektroforez tankı	Thermo Scientific
Etüv	Nüve (ES 500)
Faz-kontrast invert mikroskop	Olympus (CKX4)
Floresan mikroskop	Olympus (BX 53)
Hassas terazi	Mettler (H20)
Mikroskop ataçmanlı Kamera	Marlin-Allied Vision Technologies
Karbondioksitli inkübatör	Thermo Scientific (Heracell 150i)
Laminar akımlı kabin (biyogüvenlik seviyesi 2)	Tezsan

Mikrodalga fırın	Beko
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Biotek (Epoch)
Milli-Q saf su cihazı	Millipore-Gradient
Orbital çalkalayıcı	Stuart (SSM1)
Otoklav	Hirayama (HV-50L)
pH metre	Hanna (PH 211)
Soğutmalı mikrosantrifüj	Hettich (Micro 200)
Soğutmalı santrifüj	Hettich (Universal 32R)
Ultrasonik banyo	Elma (Transsonic T460/H)
Vorteks	Ika (NC 28405)

3.3. Deneysel İşlemler

3.3.1. Hücre Kültürü

Çalışmada ATCC (American Type Culture Collection)'den tedarik edilen insan nöroblastoma (SH-SY5Y) hücre hattı kullanıldı. SH-SY5Y hücreleri %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin katkılı EMEM:F12 besi yeri ile T75 hücre kültürü flakslarında 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde büyütüldü. Bir gün aralıkla medyum değişimi yapıp, hücreler, flask yüzeyini kapladıkça rutin olarak pasajlandı.

3.3.1.1. Hücre kültüründe kullanılan çözeltiler

Hücre kültüründe kullanılacak tüm çözeltiler steril şartlarda hazırlandı. Çözeltilerin hazırlanması için kullanılan Milli-Q saf su otoklavlanarak sterilize edildi. İnaktif edilmiş olarak temin edilen FBS 0,22 µm'lik filtrelerden süzülerek 50 ml'lik falkonlara porsiyonlandı. Kullanım zamanına kadar -20 °C'de saklandı. Tripsin-EDTA çözeltisi 0,22 µm'lik steril filtreden geçirilerek sterilize edildi. Kullanım zamanına kadar -20 °C'de saklandı.

Hücre kültüründe kullanılan çözeltiler aşağıda belirtilen oranlara göre hazırlandı;

PBS çözeltisi (1x):

PBS çözeltisi (10x) 10 mL

Steril su 90 mL

Tripsin-EDTA çözeltisi (%0,2):

Tripsin 0,2g
EDTA 0,04g
PBS çözeltisi (1X) 100 mL

Hücre stoklama besiyeri:

FBS çözeltisi 5 mL
Antibiyotik çözeltisi 0,5 mL
DMSO 2,5 mL
EMEM:F12 besiyeri 42 mL

SH-SY5Y hücreleri için besi yeri:

FBS çözeltisi 10 mL
Antibiyotik çözeltisi (%1) 1 mL
EMEM besiyeri 44,5 mL
Ham's F12 besiyeri 44,5 mL

3.3.1.2. Hücre Dizisinin Açılması ve Kültüre Edilmesi

Sıvı azot buharında soğuğa dayanıklı vialde saklanan hücreler alınarak ($\sim 10^6$ hücre/mL) 37 °C'lik su banyosunda bekletildi ve çözünmeleri sağlandı. Hücreler derhal 15 mL'lik falkona alındı ve 37 °C'de ısıtılmış 5 mL serumlu besiyeri hücrelerin üzerine damla damla ilave edildi. Hücreler nazikçe pipetlenerek süspande edildi ve hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek, içinde DMSO içeren dondurma besiyeri bulunan süpernatant atıldı. Hücreler tekrar 37 °C'de ısıtılmış 7 mL serumlu besiyeri ile süspande

edildi ve hücre süspansiyonu 25 cm²'lik flaska alındı. Flask 37 °C'de, %5 CO₂ ve %90 bağıl nem koşullarına sahip inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi ve süre sonunda yapışmayan hücreler süpernatantın atılması ile uzaklaştırıldı ve ortama yeni serumlu besiyeri eklendi. Faz-kontrast invert mikroskop aracılığıyla kontrol edilerek hücre yoğunluğunun ~%90 konfluent (bitişik) hale geldiği tespit edilince hücreler ya kültürün devamlılığı için pasajlandı veya deneylerde kullanıldı.

Pasajlama işleminde ilk olarak hücre kültür kabındaki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Hücrelerin yüzeyi PBS (1x) ile yıkanarak hücresel atıkların ve tripsin aktivitesinde azalmaya sebep olabilecek serum artıklarının uzaklaşması sağlandı. Kültür ortamına tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde yaklaşık 5 dakika bekletilerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Mikroskop altında yüzeyden ayrıldığı görülen hücrelerin üzerine tripsin aktivitesini inhibe etmek için kültür kabına eklenen tripsin hacminin iki katı kadar serumlu besiyeri ilave edildi. Elde edilen hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.

Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine 1 mL serumlu besiyeri ilave edildi ve hücreler pipetlenerek homojen bir süspansiyon elde edildi. Elde edilen homojen hücre süspansiyonundan 15 µL mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 1:1 hacimde tripan mavisi ile karıştırıldı. Elde edilen boyalı hücre karışımından 12 µL alınarak Thoma Lamı üzerinde sayıldı. Yapılacak deneye uygun şekilde mL'deki hücre sayısı ayarlanarak hücreler mikrolakalara veya uygun hücre kültür kaplarına aktarıldı. Üzerlerine taze serumlu besiyeri ilave edilerek 37 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilerek kültüre edildi.

Hücreler belli pasaj numaralarında dondurularak hücre kültüründe meydana gelebilecek olası risklere karşı korunarak saklandı. Saklanacak olan hücre pelletinin üzerine 1 mL hücre stoklama besiyeri ilave edilip pastör pipeti ile iyice pipetlenerek karıştırıldı. Yaklaşık 10⁶ hücre/mL olacak şekilde hazırlanan hücre stokları soğuğa dayanıklı kriyo viallere porsiyonlandı ve sırasıyla -20 °C'de 1 saat, -80 °C'de 16-24 saat bekletildikten sonra sıvı azot içeren tanka aktarılarak uzun süre muhafaza edildi.

3.3.2. JWH-018 Stoklarının Hazırlanması

Toz şeklinde temin edilen JWH-018 steril DMSO ile çözüldü. Aşağıda belirtilen oranlarda ana ve ara stoklar hazırlandı.

100 mM JWH-018 ana stok

JWH-018 (341,45 gr/mol)	17,072 mg
DMSO	0,5 mL

30 mM JWH-018 ara stok

100 mM JWH-018	75 uL
DMSO	175 uL

3.3.3. Sitotoksosite Testleri

Tüm sitotoksosite testleri için 96'lı mikrolaka kuyucuklarına 100 µL'de 1×10^4 hücre içeren hücre süspansiyonu eklendi. Hücrelerin yapışması için JWH-018 maruziyetinden önce 24 saat süreyle 37 °C'de %5'lik CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklardaki besiyeri atılıp, 99'ar µL taze besiyeri eklendi ve üzerlerine son konsantrasyon 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM ve 150 µM olacak şekilde DMSO içinde hazırlanmış JWH-018 ara stoğundan eklendi. Daha yüksek konsantrasyonlara maddenin ortamda çökmesi nedeniyle çıkılamadı. Tüm kuyucuklardaki DMSO konsantrasyonu %1 olarak ayarlandı. Her deneyde negatif kontrol olarak, çözücü konsantrasyonu %1 DMSO olan ve sadece besiyeri içeren büyüme kontrolü de çalışıldı. Mikrolakalar 24 saat süreyle JWH-018 konsantrasyonlarına maruz bırakıldı ve 37 °C'de %5'lik CO₂'li inkübatörde inkübe edildi. Her konsantrasyon için aynı koşullarda 3 farklı günde ve 3 tekrar olacak şekilde çalışıldı.

3.3.3.1. MTT Testi

Kullanılan çözeltiler

MTT çözeltisi (5mg/mL)

MTT	250 mg
PBS (1x)	50 mL

Çözelti +4 °C'de ve karanlıkta saklandı.

Testin yapılışı

24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında kuyucuklara 15 uL MTT çözeltisi eklendi ve 37 C'de %5'lik CO₂'li inkübatörde 2 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonrası tüm besiyeri atılıp oluşan formazan kristalleri 100 uL DMSO ile çözüldü. Mikroplakalar orbital çalkalayıcıda 150 rpm'de 5 dakika çalkalandı. Çözelti absorbansı 590 nm ve 690 nm'de mikrolaka okuyuculu spektrofotometre ile okundu.

Değerlendirme

%1 DMSO içeren negatif kontrol absorbansı %100 canlılık olarak kabul edildi ve JWH-018 maruziyetine bağlı olarak ortaya çıkan inhibisyon aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon konsantrasyonu (IC)} = 100 - (\text{ort. OD}_{\text{madde}} \times 100 / \text{ort. OD}_{\text{negatif kontrol}})$$

3.3.3.2. Nötral Kırmızı Testi

Kullanılan çözeltiler

Nötral kırmızısı stok çözeltisi (10 mg/mL)

Nötral kırmızısı boyası 100 mg

Besiyeri 10 mL

Çözelti 22 µm selüloz asetat filtreden geçirilerek -20 °C'de saklandı.

Nötral kırmızısı çalışma çözeltisi (100 µg/mL)

Nötral kırmızısı boyası stok çözeltisi 80 µL

Besiyeri 8 mL

Çözelti taze olarak kullanıldı.

Çözme solüsyonu [asetik asit: etanol: su (1:50:49)]

Asetik asit 80 µL

Etanol 4,21 mL

Steril su 3,71 mL

Çözelti taze olarak kullanıldı.

Testin yapılışı

JWH-018 maruziyetleri sonunda kuyucuklardaki besi yerleri atıldı ve 50 µg/mL nötral kırmızı boya içeren 150 µL'lik besi yeri ile değiştirildi. Canlı hücrelerin boyayı almasına izin vermek için hücreler 37 °C'de 3 saat inkübe edildi. FBS yıkamasını takiben, nötral kırmızı boyasını çözündürmek için kuyucuklara 150 µL glasiyal asetik asit: etanol: su (1:50:49) çözeltisi ilave edildi ve 150 rpm'de 20 dakika çalkalandı. Optik yoğunluk mikropilaka okuyuculu spektrofotometre ile 540 nm'de okundu.

Değerlendirme

%1 DMSO içeren negatif kontrol absorbanı %100 canlılık olarak kabul edildi. JWH-018 maruziyetine bağlı olarak ortaya çıkan inhibisyon 3.3.3.1 deki formüle göre hesaplandı.

3.3.3.3. LDH testi

Kitin içeriği

Katalist	1 mL
Boya solüsyonu	45 mL

Testin yapılışı

JWH-018 maruziyetleri sonrasında maruziyet ortamından 100 µL alınarak yeni bir mikropilakaya eklendi. Pozitif kontrol olarak %1 Triton X-100 kullanıldı. Tüm kuyucuklara 100 µL reaksiyon karışımı eklenip 30 dakika oda sıcaklığında ışıktan korunarak bekletildi ve sonrasında absorbanlar mikropilaka okuyuculu spektrofotometre ile 490 nm'de okundu.

Değerlendirme

Hesaplamalar aşağıdaki formüle göre yapıldı.

$$\text{Sitotoksisite (\%)} = \left[\frac{(\text{ort.OD}_{\text{madde}} - \text{ort.OD}_{\text{negatif kontrol}})}{(\text{ort.OD}_{\text{pozitif kontrol}} - \text{ort.OD}_{\text{negatif kontrol}})} \right] \times 100$$

şeklinde hesaplandı.

3.3.4. Oksidatif Hasarın Tespiti

Oksidatif hasarın değerlendirilmesi için ticari olarak satılan kolorimetrik veya ELISA esasına dayanan kitler kullanıldı. Tüm gruptaki protein miktarı bikinkoninik asit BCA protein miktarı tayini metodu ile belirlendi. Test sonuçları protein konsantrasyonlarına göre normalize edildi. Tüm antioksidan enzim aktiviteleri için hücreler 75 cm²'lik flasklarda büyütüldü. Sonrasında 24 saat süreyle 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM ve 150 µM JWH-018 maruziyetleri gerçekleştirildi. Süre sonunda hücreler tripsinizasyon ile kaldırılıp buz üzerinde 10 dakika bekletildi ve sonikasyon ile homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası 14000 g'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatant yeni eppendorf tüplere aktarıldı. Tüm enzim aktiviteleri için hazırlanan bu süpernatant kullanıldı. Her konsantrasyon için aynı koşullarda 3 farklı günde ve 3 tekrar olacak şekilde çalışıldı.

3.3.4.1. Protein tayini

Protein konsantrasyonlarının belirlenmesi için bikinkoninik asit (BCA) yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde alkali ortamda BCA maddesi ile bakır iyonlarının reaksiyonu sonucu mor renk oluşur. Oluşan bu mor rengin 562 nm verdiği absorbansın şiddeti ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Kitin içeriği

BSA çözeltisi (2 mg/mL)	1 mL
Komponent A	250 mL
Komponent B	10 mL

25; 125; 250; 500; 1000 ve 2000 µg/mL BSA içeren standart çözeltilerden ve örneklerden 10'ar µL alınarak 96'lık mikropalakaya aktarıldı. BCA tayin kitinin içerisinde bulunan komponent A ile komponent B 1:50 oranında karıştırıldı. Karışımdan standartların ve örneklerin üzerine 200'er µL eklenip karıştırıldı. 30 dakika 37 °C'de inkubasyon sonunda oluşan rengin şiddeti 562 nm'de

mikroplaka okuyuculu spektrofotometre ile ölçüldü. Hazırlanan BSA standart eğrisinden örneklerin protein konsantrasyonu hesaplandı.

3.3.4.2. Glutasyon Tayini

Örneklerin GSH seviyeleri, biyotin çift antikor sandviç teknolojisine dayanan enzim bağlı immünosorbent test (ELISA) kiti aracılığıyla ölçüldü. GSH-monoklonal antikor ile kaplı kuyucuklarda standart ve örneklerin inkübasyonu sonrasında ilave edilen streptavidin-horseradish peroksidaz (HRP) immun kompleks oluşturur. Inkübasyon sonrası bağlı olmayan enzimlerin yıkanarak uzaklaştırılmasından sonra kromojen çözeltiler (A,B) ilave edilerek rengin asit ortamın etkisiyle maviden sarıya dönüşmesi izlenir. Renk değişimi ile örnekteki GSH konsantrasyonu doğru orantılıdır.

GSH ELISA kiti içeriği

Kaplanmış Elisa mikroplaka (96'lık)

Standart çözelti (48 ng/mL)	0,5 mL
Standart dilüsyon çözeltisi	3 mL
Streptavidin-HRP	6 mL
Stop çözeltisi	6 mL
Kromojen çözeltisi A	6 mL
Kromojen çözeltisi B	6 mL
Yıkama çözeltisi (30X)	20 mL
Biotinle işaretlenmiş anti GSH antikor	1 mL

Testin yapılışı

1,5; 3; 6; 12 ve 24 ng/mL konsantrasyonda GSH standartları hazırlandı. Standart kuyucuklarına 50 µL standart çözelti ve 50 µL streptavidin- HRP ilave edildi. Örnek kuyucuklarına ise 40 µL örnek, 10 µL GSH antikor ve 50 µL

streptavidin-HRP ilave edilerek 60 dakika 37 °C' de inkübe edildi. Mikroplaka seyreltik yıkama çözeltisi ile her defasında 30 saniye bekletilerek 5 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa 50 µL kromojen A çözeltisi, ardından 50 µL kromojen B çözeltisi ilave edilerek dikkatlice karıştırıldı ve ışıktan korunarak 10 dakika 37 °C' de inkübe edildi. Reaksiyonu sonlandırmak için her bir kuyucuğa 50 µL stop çözeltisi ilave edildi ve mavi rengin sarıya dönüşmesi izlendi. Çözeltinin absorbansı 10 dakika içerisinde 450 nm'de mikroplaka okuyuculu spektrofotometrede ölçüldü.

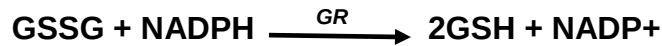
Değerlendirme

GSH standart konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri ile ölçü eğrisi hazırlandı. Her bir örnek için GSH miktarı ölçü eğrisine göre hesaplandı. Elde edilen sonuçlar BCA ile ölçülen protein konsantrasyonlarına göre normalize edilerek ng/mg protein olarak verildi.

3.3.4.3. Antioksidan Enzim Aktiviteleri

Glutasyon peroksidaz tayini

Glutasyon peroksidaz, peroksidaz enzim ailesinden organizmayı oksidatif hasardan koruyan önemli biyolojik rolü olan bir enzimdir. Hücrede oluşan serbest peroksiti ortadan kaldırarak hücre membranlarında görülen lipid peroksidasyonun önüne geçilmiş olur. GSH-Px, GR ile birlikte aşağıdaki reaksiyonu katalize eder.



GSH-Px tayininde, GSH-Px aktivitesi sonucu tüketilen NADPH miktarı ölçülür. 340 nm optik dansitede ölçülen NADPH miktarındaki azalma numunedeki enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır (Paglia ve Valentine, 1967).

Kolorimetrik GSH-Px kiti içeriği

Tampon çözelti

25 mL

GR enzim	250 µL
GSH	Toz
NADPH	Toz
Kalibratör	Toz
Peroksit çözeltisi	50 µL

Testin yapılışı

NADPH 400 µL distile su ile en son 35 mM olacak şekilde, ve glutatyon 540 µL distile su ile en son 100 mM olacak şekilde çözüldü. Kalibratör 100 µL distile su ile en son 10 mM olacak şekilde çözüldü. Tüpler karışması için vortekslenerek buz üzerinde muhafaza edildi. Kalibrasyon için 12 µL kalibratör ile 188 µL distile su karıştırılarak 6 mM NADPH çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözelti su ile seyreltilerek 6,0; 3,6; 1,8; 0 mM NADPH standart çözeltileri hazırlandı. Standartlardan 10'ar µL 96'lık mikrolakalara aktarıldı. 190 µL tampon çözelti tüm standart kuyucuklara eklendi.

Bir diğer 96'lık mikrolakaya 10'ar µL örnek ve kontrol olarak da 10 µL tampon çözelti konuldu. Çalışma reaktifi 90 µL tampon çözeltisi, 5 µL GSH, 3 µL 35 mM NADPH ve 2 µL GR enzimi karıştırılarak hazırlandı. Çalışma reaktifinden 90 µL hızlıca tüm örnek ve kontrol kuyucuklarına eklendi ve karıştırıldı. Diğer taraftan 5 µL peroksit solüsyonu boş bir 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne konuldu, 1495 µL distile su eklendi, karışması için 30 saniye vortekslendi ve derhal 1x substrat solüsyonu elde edebilmek için 1:10 oranında distile su ile seyreltildi. Çok kanallı bir pipetle 100 µL 1x substrat solüsyonu tüm örnek ve kontrol kuyucuklarına eklenerek derhal 340 nm'de optik dansite ölçümü yapıldı (0. dakika OD₀), dört dakika sonra ölçüm tekrarlandı (4. dakika OD₄).

Değerlendirme

NADPH standartlarına ait OD₄ değerlerinden köre ait değerler çıkartıldı ve ΔOD ve konsantrasyon arasında ölçü eğrisi çizildi ve eğimi hesaplandı.

GSH-Px aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplandı:

GSH-Px aktivite (U/L) =

$$[(OD_0 - OD_4)_\text{ö} - (OD_0 - OD_4)_\text{k} / \text{Eğim (mM}^{-1}\text{) x 4 (dakika)}] \times 1000 \times n$$

n: örnek dilüsyon faktörü, ö: örnek, k: kontrol ve 1000 ise mmolü μmole dönüştürme faktörüdür.

Elde edilen sonuçlar BCA ile ölçülen protein konsantrasyonlarına göre normalize edildi.

Glutasyon redüktaz tayini

Glutasyon redüktaz, okside glutasyonu (GSSG) redükte sülfidril formu olan GSH'a indirgeyen enzimdir. Yüksek GSH/GSSG oranı oksidatif strese karşı önemli koruyucu bir faktördür. Dolayısıyla GR aktivitesi hücre için önemli oksidatif stres belirteçlerinden birisidir. Kolorimetrik GR testinin esası, GSSG'nin GR ile redüksiyonu sonucu oluşan GSH'ın DTNB ile reaksiyona girerek sarı renkli bir ürün oluşturmasıdır. Ürünün 412 nm'de ölçülen optik dansitesindeki değişikliğin oranı numunedeki GR aktivitesiyle doğru orantılıdır (Smith ve ark., 1988).

Kolorimetrik Kinetik Glutasyon redüktaz kit içeriği

Tampon çözeltisi	10 mL
GDH	120 μL
Substrat	1 mL
DTNB	60 μL
Ko-substrat	1 mL

Kalibratör

1,5 mL

Testin yapılışı

Her bir 96'lık mikrolakada ayrı kuyucuklara 100'er µL kalibratör ve tampon çözeltisi eklendi. Bir 96'lık mikrolaka için gerekli olan ve 8 µL substrat, 8 µL ko-substrat, 1 µL GDH, 0,5 µL DTNB ve 70 µL tampon çözeltiden oluşan çalışma reaktifinden yeterli miktarda hazırlandı. Maruziyetler sonrasında elde edilen süpernatantlardan 96'lık mikrolakaların her bir kuyucuğuna 20 µL konuldu ve 80 µL çalışma reaktifi her bir kuyucuğa eklenerek karıştırıldı. Mikrolakalar 10 dakika boyunca 37 °C'de inkübe edildi ve 412 nm'de optik dansite ölçüldü (OD₁₀). 30 dakika sonra ölçüm tekrarlandı (OD₃₀).

Değerlendirme

GR aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{GR aktivite (U/L)} = [440 / t (\text{dakika}) \times \Delta \text{OD}_{\text{örnek}} / (\text{OD}_{\text{kalibratör}} - \text{OD}_{\text{tampon}})] \times n$$

$$\Delta \text{OD} = \text{OD}_{30} - \text{OD}_{10}$$

n: örnek dilüsyon faktörüdür.

Elde edilen sonuçlar BCA ile ölçülen protein konsantrasyonlarına göre normalize edilerek U/mg protein olarak verildi.

Katalaz tayini

Katalaz, hidrojen peroksite su ve oksijene dönüşümünü katalize eder. Test, katalaz aktivitesinden sonra kalan hidrojen peroksit substrat miktarının ölçümüne dayanmaktadır. Katalaz önce hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştürür (katalitik yolak), daha sonra bu enzimatik reaksiyon sodyum azid ile durdurulur. Analiz edilecek karışımda reaksiyon sonucu halen var olan hidrojen peroksit kolorimetrik olarak tayin edilir. Kolorimetrik tayinde; hidrojen peroksit, peroksidaz ve kromojen ajanın reaksiyonu sonucu oluşan kırmızı kinonimin boyasının (N-(4-antipirin)-3-kloro-5-sulfonat-p-benzokinon-monoimin) absorbansı 520 nm'de ölçülür.

Katalaz kiti içeriği

Tampon özelti 10x	100 mL
(500 mM potasyum fosfat tamponu, pH 7,0)	
Kromojen ajan	1 vial
(0.25 mM 4- aminoantipirin ve 2 mM 3,5-dikloro-2-hidroksibenzensulfonik asit, 150 mL potasyum fosfat tamponu, pH 7,0 tamponunda)	
Stop özeltisi (15 mM sodyum azid/su)	100 mL
Katalaz pozitif kontrol	0,25 mL
Hidrojen peroksit %3 (w/w)	10 mL
Peroksidaz	5 mg
Enzim dilüsyon tamponu	100 mL
(%0,1 Triton X-100 içeren 50 mM Potasyum fosfat tamponu, pH 7,0)	

Testin yapılışı

1x Tampon özelti hazırlamak için 10x tampon çözeltisinden 2 ml alınarak 20 ml'ye su ile tamamlandı. Peroksidaz özeltisi hazırlamak için 1 mg peroksidaz 1,45 mL 1x tampon çözeltisinde çözündürüldü. 2 hafta boyunca 4 °C'de saklandı. 200 mL kromojen çözeltisi hazırlamak için, 60 mL 10x tampon çözeltisi ve 140 mL su 250 mL'lik bir beherde karıştırıldı. Seyreltilmiş tampon çözeltisinden 10 mL kromojen ajan vial e aktarılıp tamamen çözününceye kadar karıştırıldı. Kromojen özeltisi vialden tampon çözeltisi içeren behere aktarılıp iyice karıştırıldı ve uygun porsiyonlara bölündü. Renk reaktifi her kullanımdan önce 30 mL kromojen çözeltisine 30 µL peroksidaz solüsyonu eklenerek hazırlandı.

Katalaz suda süspanisyon şeklinde bulunmakta olup kristaller tübün dibine çökmektedir. Homojen bir katalaz kontrol çözeltisi hazırlamak için katalaz

tüpü vortekslendi ve içinden 20 µL alınarak hızlı bir şekilde seyreltildi. 10 000 kat seyreltme için 20 µL enzim süspansiyonu enzim seyreltme tamponu ile 400 µL'ye (1:20) seyreltildi. Bu dilüsyon çözeltisinden 20 µL alınarak 400 µL'ye seyreltildi (1:400) ve bu çözeltiden alınan 20 µL 500 µL'ye seyreltildi (1:10 000). Her bir reaksiyonda bu son çözeltiden 2 -5 µL kullanıldı. Katalaz kontrol çözeltisi hergün taze hazırlandı.

Kolorimetrik test substrat çözeltisi 200 mM H₂O₂' dir. Kit içerisindeki H₂O₂'nin konsantrasyonu %3-%4 aralığında olabilmektedir. Spektrofotometrik olarak H₂O₂ çözeltisinin gerçek konsantrasyonunun ölçülmesi ve kolorimetrik test substrat çözeltisi olarak kullanılabilmesi için 200 mM olarak düzeltilmesi gerekmektedir. %3'lük H₂O₂'den 200 µL 1 mL 1x tampon çözeltisi ile seyreltildi. Substrat çözeltisinin gerçek konsantrasyonunun belirlenebilmesi için seyreltilen çözeltinin 50 µL'si 1x tampon çözelti ile 1 ml olacak şekilde 20 kat seyreltildi. Beklenen konsantrasyon 10-15 mM aralığındadır. Gerçek konsantrasyonu belirlemek için 240 nm'deki absorbanı ölçüldü. Kör olarak 1x tampon çözeltisi kullanıldı. Gerçek H₂O₂ konsantrasyonu Beer's kanununa göre aşağıdaki şekilde hesaplandı ($\epsilon^{mM}=0,0436$)

$$[H_2O_2] \text{ (mM)} = A_{240}/0,0436$$

Katalaz aktivitesi tayininde kullanılacak kalibrasyon eğrisi için 200 mM H₂O₂' çözeltisi 4 mL 1x tampon çözeltisi ile seyreltilerek 10 mM H₂O₂ çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 1,25; 2,5; 5,0; 7,5 mM H₂O₂ standart çözeltiler hazırlandı. Her bir standart çözeltisinden 10 µL bir tüpe alınarak 1ml renk reaktifi eklendi ve 15 dakika sonunda 520 nm'de absorbanları okundu. Standart seri çözeltileri hergün taze hazırlandı. H₂O₂'nin reaksiyon karışımlarındaki son konsantrasyonu sırasıyla; 12,5; 25; 50; 75 µM oldu. Konsantrasyona karşı okunan absorbanas değerleri ile ölçü eğrisi çizildi.

Örneklerde katalaz aktivitesi tayini için, 3'er µL örnek mikrosantrifüj tüpüne alındı, 72 µL 1x tampon çözeltisi ve 25 µL kolorimetrik test substrat çözeltisinden (200 mM H₂O₂) eklenerek reaksiyon başlatıldı. İyice çalkalanıp 5 dakika inkübe edildikten sonra 900 µL stop çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı. Bu çözeltiden 15 dakika içerisinde 10 µL mikrosantrifüj tüpüne alındı ve üzerine

1 mL renk reaktifi eklendi. En az 15 dakika renk değişiminin gelişmesi oda sıcaklığında beklendikten sonra 520 nm’de absorbansı ölçüldü.

Değerlendirme

Kolorimetrik reaksiyon karışımında kalan H₂O₂’nin (μmol) miktarının belirlenmesi için H₂O₂ standart eğrisi kullanıldı.

CAT aktivitesi aşağıdaki formüller yardımıyla hesaplandı:

$$A_{520}(\text{kör}) = \text{Kördeki H}_2\text{O}_2 (\mu\text{mol})$$

$$A_{520}(\text{örnek}) = \text{Örnekteki H}_2\text{O}_2 (\mu\text{mol})$$

$$\Delta \mu\text{mol (H}_2\text{O}_2) = \text{Kördeki H}_2\text{O}_2 (\mu\text{mol}) - \text{Örnekteki H}_2\text{O}_2 (\mu\text{mol})$$

Δ μmol (H₂O₂), Kör ve örnek arasındaki kolorimetrik reaksiyona eklenen H₂O₂ miktarı farkını vermektedir.

$$\text{CAT aktivitesi } (\mu\text{mol/dakika/mL}) = [\Delta \mu\text{mol (H}_2\text{O}_2) \times d \ 100] / (Vxt)$$

d= Katalaz reaksiyonu için orjinal örneğin seyreltilme sayısı

t= Katalaz reaksiyon süresi (dakika) 5 ???

V= Katalaz reaksiyonundaki örnek hacmi (3 μL= 0,003 mL)

100= Kolorimetrik reaksiyondaki katalaz reaksiyonundan seyreltilen alikot (1 mL’den 10μL)

Elde edilen sonuçlar BCA ile ölçülen protein konsantrasyonlarına göre normalize edildi.

Süperoksid dismutaz tayini

Test, bir tetrazolyum tuzu olan WST-1’in (2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfobenil)-2H- tetrazolyum, mono sodyum tuzu) süperoksit anyonu ile suda çözünen bir formazan boya oluşturması esasına dayanır.

SOD kiti içeriği

WST çözeltisi	5 mL
Enzim çözeltisi	100 µL
Tampon çözeltisi	100 mL
Seyreltme tamponu	50 mL

1 mL WST çözeltisi 19 mL tampon çözelti ile seyreltilti. Enzim çözeltisi 5 saniye santrifüj edildi, 15 µL'si 2,5 mL seyreltme tamponu ile seyreltilti.

Testin yapılışı

Maruziyet gerçekleştirilmiş hücrelerde SOD aktivitesinin ölçülebilmesi için örneklerden 20'şer µL 96'lık mikrolakaya eklendi. Kör 1 için 20 µL bidistile su kör 2 için 20 µL dilüsyon tamponu ayrı kuyucuklara eklendi. 200 µL WST çalışma solüsyonu her bir örnek ve kör kuyucuklarına eklenerek karıştırıldı. Sonrasında 20 µL enzim çalışma solüsyonundan örnek ve kör 1 kuyucuklarına, 20 µL seyreltme tamponu kör 2 kuyucuğuna eklenerek karıştırıldı. Mikrolaka 37 °C'de 20 dakika inkübe edilip 450 nm'de absorbansı ölçüldü. Sonuçlar (%) SOD aktivitesi olarak verildi.

Değerlendirme

SOD inhibisyon oranı aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{SOD aktivite (\%)} = \{[(A1-A2) - (AA)] / (A1-A2)\} \times 100$$

A1:Kör 1 absorbansı

A2: Kör 2 absorbansı

AA:Örnek absorbansı

3.3.4.4. Protein Karbonil Tayini

Nöroblastom SH-SY5Y hücrelerinin protein karbonil seviyesi biyotin çift antikor sandviç teknolojisine dayanan enzim bağlı immünosorbent test (ELISA) kiti aracılığıyla ölçüldü. Protein karbonil-monoklonal antikor ile kaplı kuyucuklarda standart ve örneklerin inkübasyonu sonrasında ilave edilen streptavidin-horseradish peroksidaz -(HRP) immün kompleks oluşturur. İnkübasyon sonrası bağlı olmayan enzimlerin yıkanarak uzaklaştırılmasından sonra kromojen çözeltiler (A,B) ilave edilerek rengin asit ortamın etkisiyle maviden sarıya dönüşmesi izlenir. Renk değişimi ile örnekteki protein karbonil konsantrasyonu doğru orantılıdır.

PC ELISA kiti içeriği

Kaplanmış Elisa mikropłaka (96'lık)

Standart çözelti (48 ng/mL)	0,5 mL
Standart dilüsyon çözeltisi	3 mL
Streptavidin-HRP	6 mL
Stop çözeltisi	6 mL
Kromojen çözeltisi A	6 mL
Kromojen çözeltisi B	6 mL
Yıkama çözeltisi (30X)	20 mL
Biotinle işaretlenmiş anti PC antikor	1 mL

Testin yapılışı

Deney için hücreler 25'lik flasklarda büyütölerek maruziyetler uygulandı. Maruziyetler sonrasında hücrelerin konsantrasyonları 1×10^6 hücre/1ml olacak şekilde ayarlandı. Sonikasyon ile homojenizasyonun ardından 3000 g'de 10 dakika santrifüj sonrası elde edilen süpernatant deneyler için kullanıldı. Ayrıca 20; 40; 80; 160 ve 320 ng/mL standartlar ile hazırlanmış ölçü eğrisi oluşturuldu. Standart kuyucuklarına 50 µL standart ve 50 µL Streptavidin-HRP ilave edildi.

Örnek kuyucuklarına 40 µL örnek, 50 µL Streptavidin-HRP ve 10 µL PC antikoru konularak, 37 °C'de 60 dak.inkübe edildi. Yıkama çözeltisi su ile seyreltildi. Kuyucuklar boşaltılıp yıkama solüsyonu ile her seferinde 30 saniye bekletilerek beş kez yıkandı. Kör kuyucukları biotinle işaretlenmiş anti PC antikorundan oluşturuldu. Yıkama işleminden sonra her kuyucuğa önce Kromojen çözeltisi A sonra Kromojen çözeltisi B eklendi, ışıktan korunarak 10 dakika 37 °C' de inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak için 50 µL stop çözeltisi eklendi, çözeltinin mavi renginin sarıya dönüşmesi izlendi. Renk değişiminin yoğunluğu spektrofotometrede 450 nm'de mikropılaka okuyucuda ölçüldü.

Değerlendirme

Her bir örnek için protein karbonil miktarı, protein karbonil standart çözeltileri ile hazırlanan ölçü eğrisine göre ng olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar BCA ile ölçülen protein konsantrasyonlarına göre normalize edildi.

3.3.4.5. Lipid Peroksidasyon Testi

Testin esası

Hücre membranının lipoprotein yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS) denilen düşük moleküler ağırlıklı son ürünler ve genellikle malondialdehit (MDA) oluşur. Test MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği reaksiyon sonucu oluşan pembemsi renk değişiminin spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (Stocks ve Dormandy, 1971).

TBARS test kiti içeriği

TBA reaktifi	25 mL
Standart	20 µL 6 M MDA
%10 TCA (trikloroasetik asit)	25 mL

Testin yapılışı

Deney için hücreler 25'lik flasklarda büyütülerek maruziyetler uygulandı. Maruziyetler sonrasında 5×10^6 hücre 200 μ L (buzlu) soğuk PBS çözeltisine alınarak hücrelerin parçalanması için sonike edildi. Sonrasında her bir 100 μ L örneğe (buzlu) soğuk %10 TCA'dan 200 μ L ilave edildi. Buz üzerinde 5 dakika inkübasyon sonrası mikrosantrifüj tüplerinde 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra berrak süpernatanttan 200 μ L alınarak yeni bir tüpe konuldu ve 200 μ L TBA reaktifi eklendi. Karışması için tüpler vortekslenip 100 °C'de 60 dakika inkübe edildi ve sonrasında oda sıcaklığına soğumaya bırakıldı. Her bir tüpten 100'er μ L ikişer kuyucuğa eklenip, 535 nm'de absorbansları okundu.

Değerlendirme

Sonuçlar negatif kontrole göre artış-azalış yönünden değişim oranı olarak değerlendirildi.

3.3.5. Annexin V/PI Boyaması ile Apoptoz ve Nekroz Oluşumunun Değerlendirilmesi

Testin esası

Apoptoz sırasında hücrelerin plazma membranlarında bulunan fosfatidilserinler, hücre içi yönlendirmeden rastgele bir yönlenebilir. Dışa yönlendirilmiş kısım Anneksin V ile boyanır. Anneksin V fosfatidilserine bağlanan 36 kDa ağırlığında bir kalsiyum bağlayıcı proteindir. Apoptotik hücreler nekrotik hücrelerden anneksin V yanında propidiyum iyodür (PI) boyası ile de boyanmak suretiyle ayırt edilebilir. PI nekrotik hücrelerin içine girip boyar, ancak apoptotik hücrelerin içine giremez. Anneksin V bağlanması ve PI alımı sonrası akış sitometrisi ile apoptotik ve nekrotik hücrelerin sayımı gerçekleştirilir (Crowley ve ark., 2016).

Kit içeriği

<i>Anneksin V-FITC</i>	<i>0,5 mL</i>
<i>Propidium iyodür</i>	<i>1 mL</i>
<i>Anneksin V bağlayıcı tamponu</i>	<i>50 mL</i>

Testin yapılışı

6'lık mikrolakalarda büyütülen hücrelere 5 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM ve 150 µM olacak şekilde 24 saat süreyle maruziyet uygulandı. Maruziyetler sonrası hücreler tripsinizasyon ile kaldırıldı ve soğuk PBS ile 3000 rpm'de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak bağlayıcı tampon çözelti içinde 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde süspande edildi. 100 µL hücre süspansiyonu üzerine 2 µL Annexin V-FITC boyası eklenerek karıştırıldı, 9 µL PI eklenerek 10 dakika karanlıkta buz üzerinde bekletildi. Hücrelerden 50'şer µL lam üzerine alınıp üzerine lamel kapatılarak floresan mikroskop altında değerlendirildi.

Değerlendirme

Anneksin V-FITC (yeşil floresans) ve PI (kırmızı floresans) ile boyama sonucunda canlı hücreler (FITC⁻/PI⁻); erken apoptotik hücreler (FITC⁺/PI⁻); geç apoptotik hücreler (FITC⁺/PI⁺) ve nekrotik hücreler (FITC⁻/PI⁺) olarak değerlendirildi. Apoptoz veya nekroz pozitif hücrelerin toplam hücre sayısına oranı preparatlardan rastgele seçilen alanlarda 500 hücre sayılarak belirlendi. Negatif kontrol olarak JWH-018'e maruz bırakılmamış hücreler üzerinde aynı analizler gerçekleştirildi. Her konsantrasyon için aynı koşullarda 3 farklı günde ve 3 tekrar olacak şekilde çalışıldı.

3.3.6. DNA Hasarının Belirlenmesi-Comet Yöntemi

Testin esas

Comet yöntemi, DNA içeren tek hücrelerin DNA'larının lam üzerinde hazırlanan agaroz jelde ve alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine göre elektriksel alanda farklı hızda göç etmeleri esasına dayanır. Hasarsız DNA'lar bütünlüğünü kaybetmeden yürürler ve comet yani kuyruk oluşturmazlar. Hasarlı DNA'ların fragmentleri oluşan hasardan dolayı farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olduklarından elektriksel alanda farklı hızda hareket eder ve kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar. Oluşan DNA göç görüntüleri değerlendirilerek bir fikir oluşturulur (Collins, 2002; Cooke ve ark., 2003; Møller, 2006; Sasaki ve ark., 2007; Williams ve ark., 2000).

Kullanılan çözeltiler

LMA çözeltisi (%0,65)

LMA	32,5 mg
PBS (1X)	5 mL

Çözelti mikrodalga fırında ısıtılarak taze hazırlandı.

NMA çözeltisi (%0,65)

NMA	0,65 g
Steril su	100 mL

Çözelti mikrodalga fırında ısıtılarak taze hazırlanmıştır.

NaOH çözeltisi (10M)

NaOH	200 g
Steril su	500 mL'ye tamamlandı.

EDTA çözeltisi (0,2M)

EDTA	37,2 g
Steril su	500 mL'ye tamamlandı.

+ 4 °C'de saklandı.

Lizis stok çözeltisi

NaCl	146,1 g
EDTA	37,2 g
Trisma baz	1,2 g
Steril su	1000 mL'ye tamamlandı.

10 M NaOH çözeltisi ile pH 10'a ayarlandı ve +4 °C'de saklandı.

Lizis çözeltisi

Lizis stok çözeltisi	66,75 mL
DMSO	7,5 mL
Triton-X 100	0,75 mL
Çözelti taze olarak hazırlandı.	

Nötralizasyon tamponu (0,4M)

Trisma baz	24,25 g
Steril su	500 mL'ye tamamlandı.
10 N HCl ile pH 7,5'e ayarlandı.	

Elektroforez tamponu

10 M NaOH	30 mL
0,2 M EDTA	5,4 mL
Steril su	1000 mL

Etidium bromür stok çözeltisi (%0,01)

EtBr	5 mg
Steril su	50 mL'ye tamamlandı.

EtBr çözeltisi (%0,002)

EtBr stok çözeltisi	100 µL
Steril su	400 µL

Testin yapılışı

Comet yöntemi Singh ve arkadaşlarının (1988) tarif ettiği temelde, bazı modifikasyonlarla (da Silva ve ark.,2000) gerçekleştirildi. 24 saat maruziyet sonrasında her bir kuyucuk 1 mL PBS (1X) ile yıkandı. %0,2 tripsinden 0,5 mL ilave edilerek tripsinizasyon gerçekleştirildi. Hücreler tripsinizasyon sonrası mikrosantrifüj tüplerine toplandı ve PBS ile 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde ayarlandı. Uç kısmı rodajlı olan lamalar 50 mL'lik falkon içerisindeki yaklaşık 40 °C'deki normal erime sıcaklığına sahip agaroz çözeltisine daldırıldı. Agarozun fazlası temizlendikten sonra lamalar bir gece oda sıcaklığında agarozun donması için bekletildi ve buzdolabında +4 °C'de deney boyunca (yaklaşık bir ay) saklandı.

Önceden ılık olacak şekilde ısıtılmış düşük erime ısı 100 µL agaroz ile 100 µL örnek yavaşça pipetajlanarak hücrelere zarar vermeyecek şekilde karıştırıldı. Daha sonra bu karışım normal erime sıcaklığına sahip agaroz ile kaplı mikroskop lamı üzerine yayıldı ve üzeri lamel ile kapatıldı. +4 °C'de 20 dakika bekletilerek solidifiye olması sağlandı. Agaroz solidifiye olduktan sonra lameller dikkatlice kaldırıldı ve lamalar -hücre ve çekirdek zarı eritilerek DNA sarmallarının agaroz jeli içerisinde serbestleşmesini sağlamaya yönelik olarak bir saat +4 °C'de (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA ve 10 mM (Tris)-HCL, pH 10) ve %10 dimetil sülfoksit ve %1 Triton X-100 içeren lizis solüsyonunda inkübe edildi.

Lizis sağlandıktan sonra DNA'nın çift ipliğinin alkali ortamda açılmasını sağlamak için elektroforez işleminden önce 20 dakika boyunca taze hazırlanmış elektroforez solüsyonunda (0,3 M NaOH, 1 mM EDTA, pH 13) +4 °C'de beklendi. Sonrasında elektroforez güç kaynağı yardımı ile 20 volt ve 300 mA akımda, +4 °C'de 20 dakika boyunca agaroz üzerinde DNA'nın anoda doğru hareketi sağlandı. Elektroforez sonrasında lamalar 0,4 M Tris-HCl solüsyonu içeren nötralizasyon tamponu içerisinde 10 dakika boyunca nötralize edildikten sonra saf alkolde fikse edildi. Negatif kontrol olarak JWH-018'e maruz bırakılmamış hücreler ile aynı şekilde çalışıldı. Pozitif kontrol (PK) olarak 100 µM hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanıldı ve hücreler üç saat pozitif kontrole maruz bırakıldı. Her konsantrasyon için aynı koşullarda 3 farklı günde ve 3 tekrar olacak şekilde çalışıldı.

Değerlendirme

Floresan mikroskopunda (Olympus BX53, Tokyo, Japan) incelenmeden hemen önce her bir lam üzerine 100 µL taze etidyum bromür konulmak suretiyle lamalar boyanmış ve lamel ile kapatılmıştır. Floresan mikroskopunda 400x büyütmede otomatik imaj analiz sistemiyle (Comet Assay IV, Perceptive Instruments, Suffolk, UK) analiz edilmiştir. Her bir lamelden 50 hücre olmak üzere her bir numuneden 100 hücre skorlanmıştır ve her bir hücre için oluşan DNA hasarı kuyruktaki DNA oranı ile ifade edilmiştir (DNA_T%). DNA_T% nükleer çekirdek kütlelerinden göç eden DNA'nın oranıdır ve DNA hasarının miktarını değerlendirmemizi sağlamaktadır.

3.4. İstatistiksel Analizler

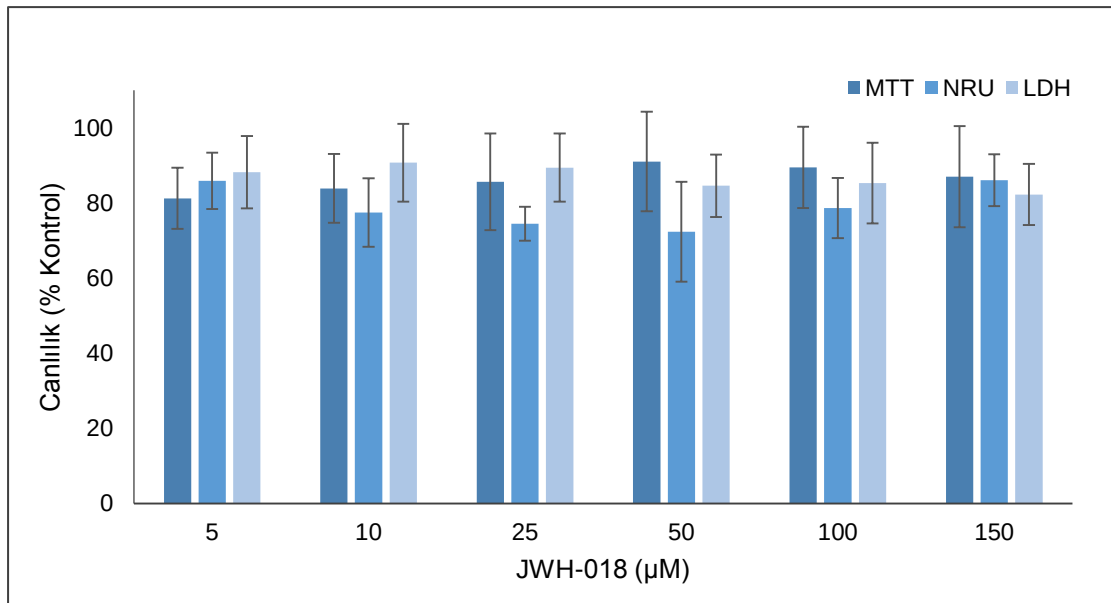
Tüm deneyler 3 tekrarlı şekilde çalışılmış olup, $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar, one way ANOVA (Tukey test) yapılarak değerlendirilmiş ve p-değeri <0,05 olanlar anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışmada JWH-018 molekülünün insan nöroblastoma SH-SY5Y hücreleri üzerine sitotoksik (MTT, NRU ve LDH testleri ile), oksidatif hasar (GSH, GPx, GR, CAT, SOD, PC, TBARS parametrelerinin tayini ile), apoptoz (Annexin V-FITC/PI apoptoz testi ile) ve genotoksik (Comet testi ile) hasar oluşturma potansiyelleri in vitro olarak araştırılmıştır.

4.1. Sitotoksikite Bulguları

MTT, NRU ve LDH çalışmaları esnasında içerisinde 1×10^6 SH-SY5Y hücresi bulunan mikropılaka kuyucuklarına 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M ve 150 μ M konsantrasyonlarda JWH-018 eklenmiştir. 24 saat maruziyet sonrasında yukarıda bahsedildiği şekilde MTT, NRU ve LDH testleri uygulanmıştır. Üç deney sonucuna göre JWH-018 maddesinin uygulanan tüm konsantrasyonlarının hücrelerde anlamlı bir sitotoksik etki artışına neden olmadığı belirlenmiştir ($p > 0,05$). Bu nedenle IC₅₀ değerine ulaşılamamıştır (Şekil 4-1).

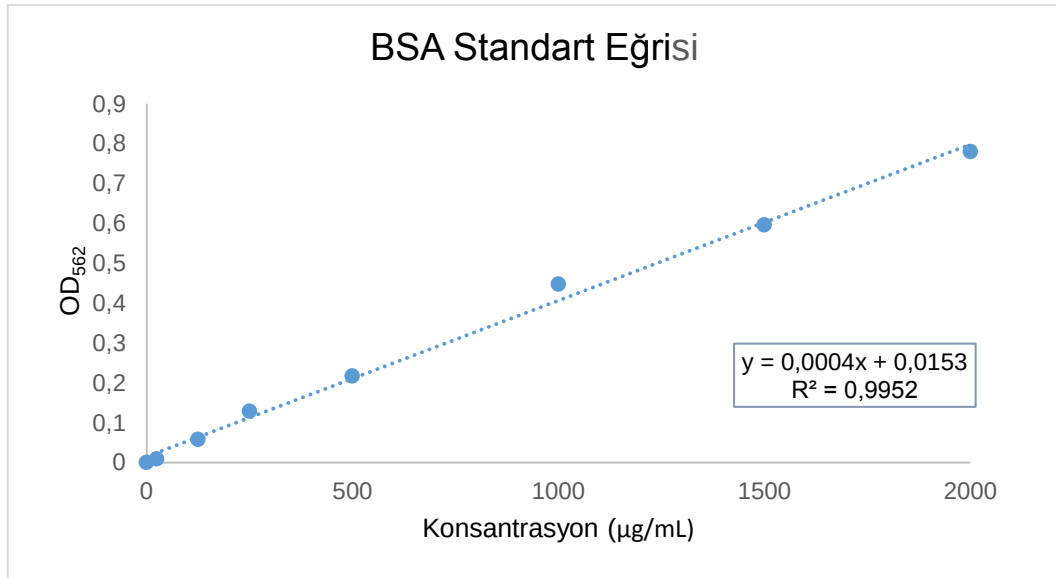


Şekil 4-1: JWH-018'in SH-SY5Y hücreleri üzerine sitotoksikitesinin değerlendirilmesi

4.2. Oksidatif Hasar Bulguları

4.2.1. Protein Konsantrasyonu Tayini Değerleri

Bölüm 3.3.4.1’de belirtildiği şekilde hazırlanan ve reaksiyon ortamındaki son konsantrasyonları 25;125; 250; 500; 1000 ve 2000 µg/mL olan BSA çözeltileri ile çizilen ölçü eğrisi Şekil 4-2’de gösterilmiştir. Elde edilen BSA standart ölçü eğrisi ile örneklerdeki protein miktarı µg/mL olarak hesaplanmış ve oksidatif stres parametreleri protein konsantrasyonlarına göre normalize edilmiştir.

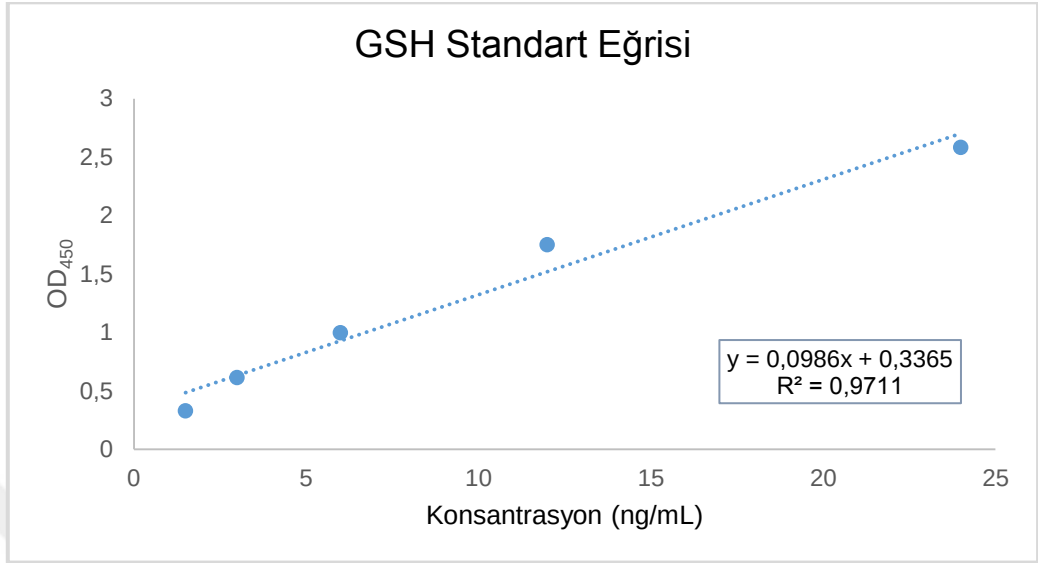


Şekil 4-2: Protein standart ölçü eğrisi

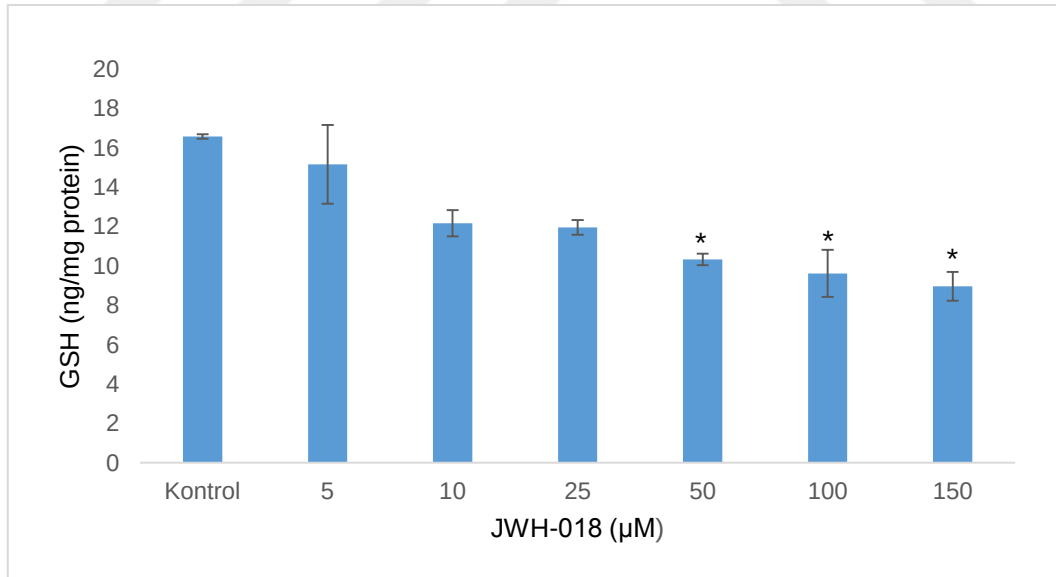
4.2.2. GSH Düzeyi

Bölüm 3.3.4.2’de açıklandığı şekilde hazırlanan ve reaksiyon ortamındaki son konsantrasyonları 1,5; 3; 6;12; 24 ng/mL olan GSH standart çözeltileri ile çizilen ölçü eğrisi Şekil 4-3’de verilmiştir. Hücrelerdeki GSH miktarları standart eğri yardımıyla ng/mL olarak belirlenmiştir. Elde edilen GSH değerleri protein seviyelerine göre ng/mg protein olarak hesaplanmıştır. JWH-018 maruziyetinin GSH düzeylerine etkisi incelendiğinde; kontrol grubunda 16,56 ng/mg protein olan GSH seviyesi 50, 100 ve 150 µM konsantrasyonlarda istatistiksel olarak

anlamlı şekilde sırasıyla 10,32, 9,61 ve 8,96 ng/mg protein seviyelerine düşmüştür ($p<0,05$), (Şekil 4-4).



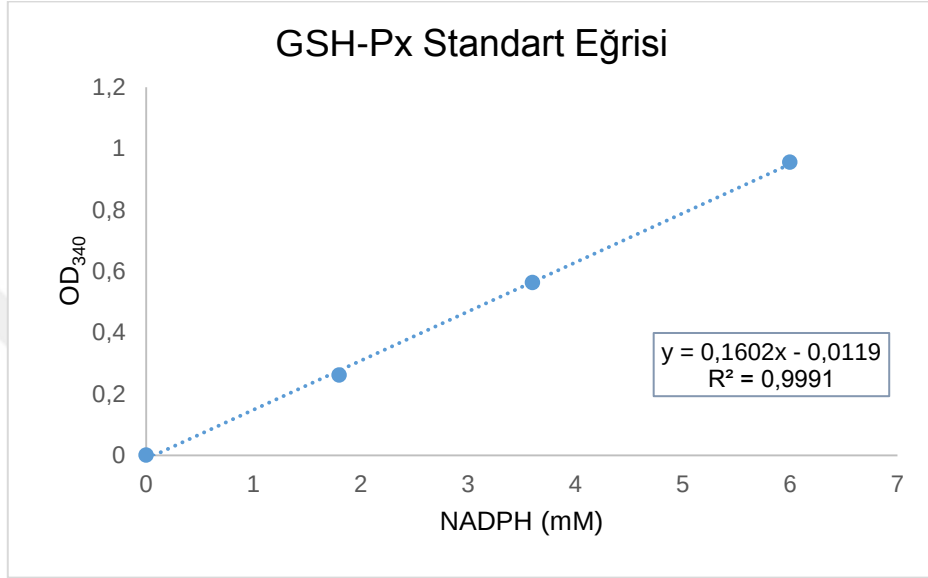
Şekil 4-3: GSH standart ölçü eğrisi



Şekil 4-4: 24 saat JWH-018 maruziyetleri sonrası SH-SY5Y hücrelerinde GSH seviyesi

4.2.3. Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi

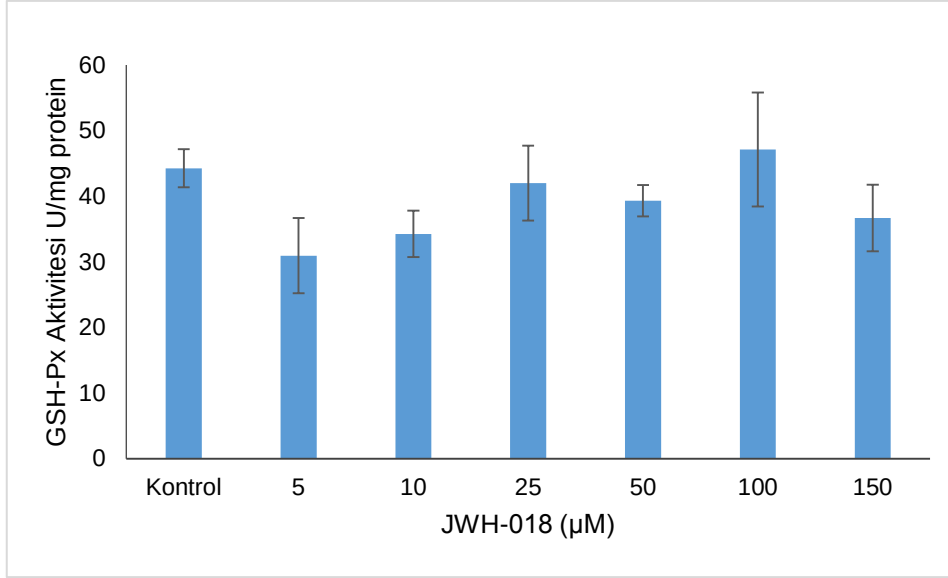
Bölüm 3.3.4.3'de açıklandığı şekilde hazırlanan ve reaksiyon ortamındaki son konsantrasyonları 0, 1,8, 3,6, 6 mM olan NADPH standart çözeltileri ile çizilen ölçüm eğrisi Şekil 4-3'te gösterilmiştir.



Şekil 4-5 GSH-Px standart ölçü eğrisi

Maruziyet ortamındaki GPx aktivitesi sonucu tüketildikten sonra geriye kalan NADPH miktarları 3.3.4.2.'deki formülde belirtildiği şekilde U/L olarak hesaplanmıştır. Formül yardımı ile hesaplanan sonuçlar hücre lizatlarındaki protein konsantrasyonlarına normalize edilmiştir ve sonuçlar U/mg protein olarak verilmiştir.

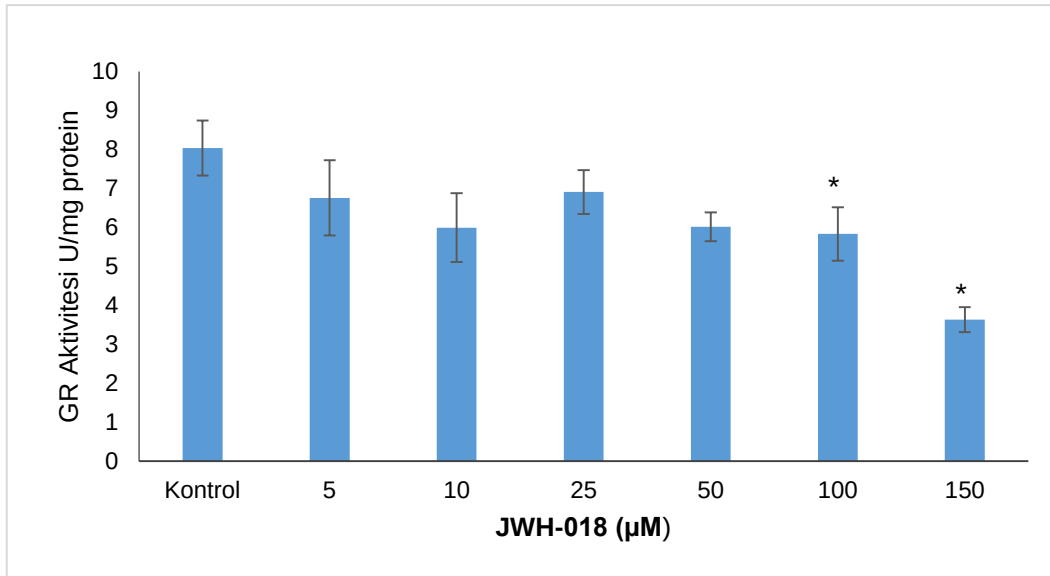
JWH-018'e çeşitli konsantrasyonlarda maruziyet sonucunda GSH-Px enzim aktivitesinde belirli bir oranda düşüş görülmesine karşın izlenen düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$), (Şekil 4-6).



Şekil 4-6 : 24 saat JWH-018 maruziyetleri sonrası SH-SY5Y hücrelerinde GSH-Px aktivitesi

4.2.4. Glutasyon Redüktaz Aktivitesi

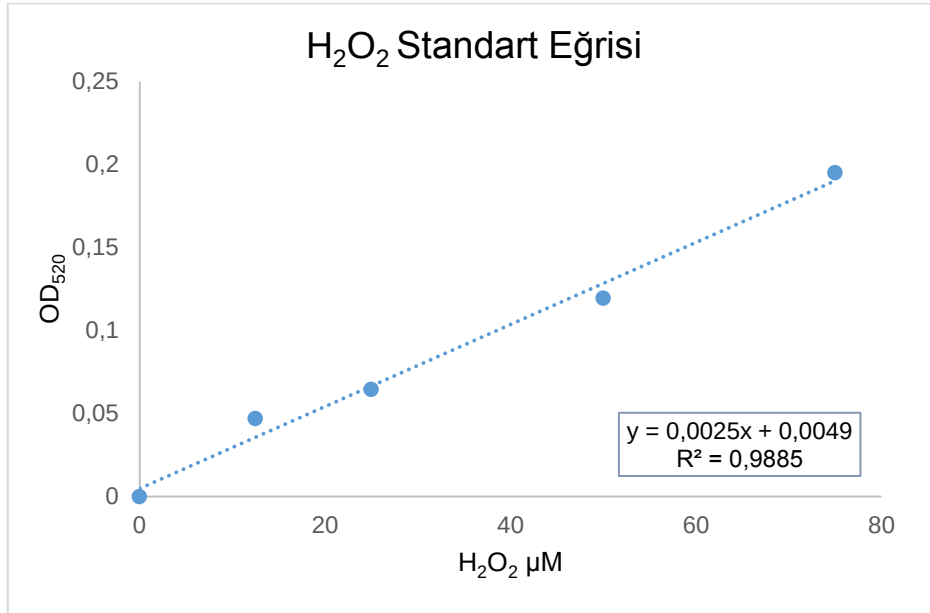
Bölüm 3.3.4.3'de açıklandığı şekilde elde edilen absorbanslardan formüle göre GR aktivitesi hesaplanmıştır. JWH-018, SH-SY5Y hücrelerinde 24 saat maruziyet sonucunda GR aktivitesinde düşüşe neden olmuştur. Bu düşüş 100 ve 150 µM JWH-018 konsantrasyonlarında anlamlıdır (sırasıyla %25, %56,25) ($p < 0,05$), (Şekil 4-7).



Şekil 4-7: 24 saat JWH-018 maruziyetleri sonrası SH-SY5Y hücrelerinde GR aktivitesi

4.2.5. Katalaz Aktivitesi

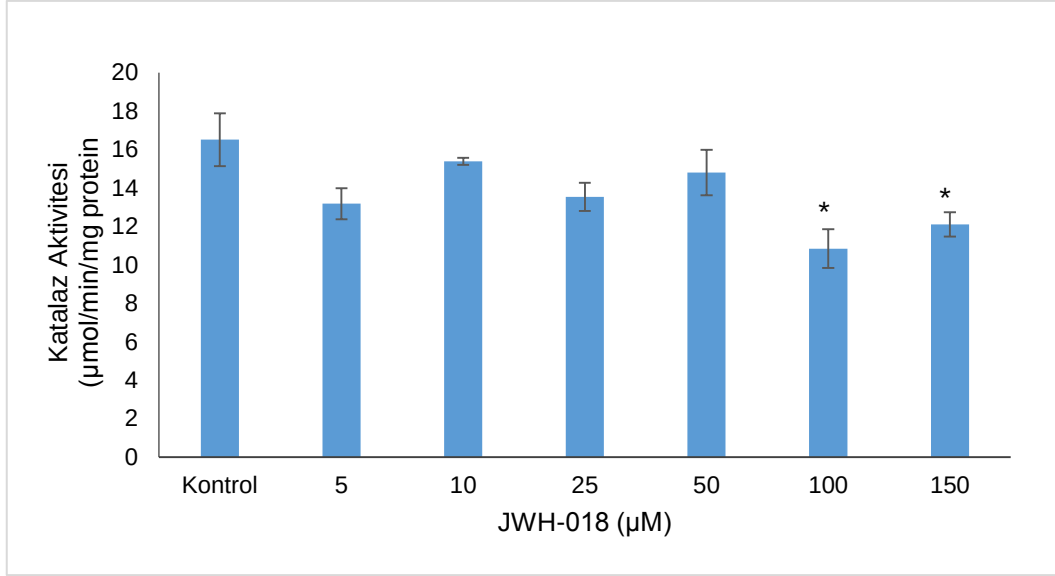
Bölüm 3.3.4.3’de belirtildiği üzere hazırlanan ve reaksiyon ortamındaki son konsantrasyonları 12,5; 25; 50; 75 μM olan H_2O_2 standart solüsyonları ile çizilen ölçü eğrisi Şekil 4-8’de gösterilmiştir.



Şekil 4-8: CAT tayini için standart ölçü eğrisi

JWH-018 maruziyet ve negatif kontrol örneklerinin kolorimetrik reaksiyon karışımında kalan H_2O_2 (μmol) miktarı ölçü eğrisinden hesaplanmıştır. Elde edilen bu değerlerden katalaz aktivitesi Bölüm 3.3.4.3’ de bahsedildiği şekilde formülden hesaplanıp sonuçlar örneklerin protein konsantrasyonlarına normalize edilmiştir.

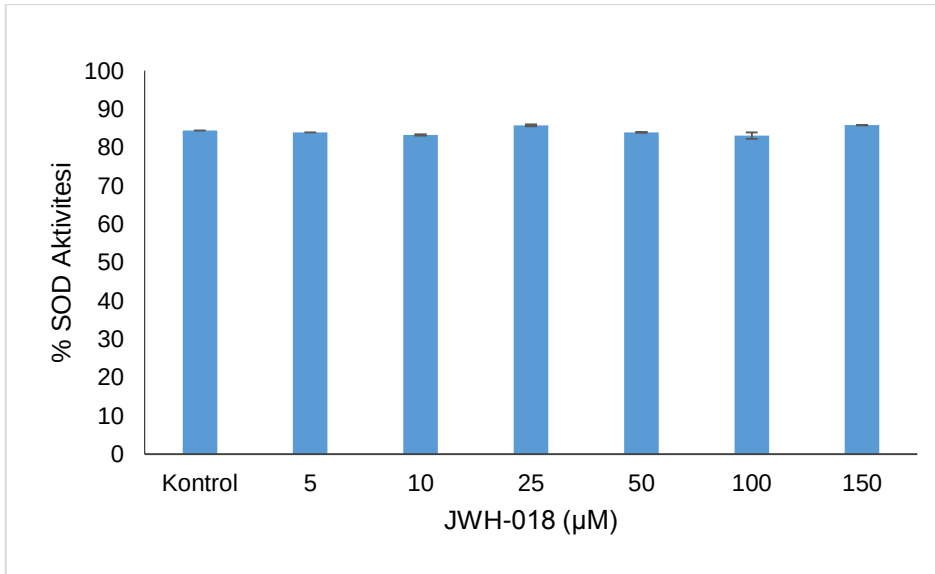
JWH-018 maruziyeti sonrası katalaz enzim aktivitesi incelendiğinde; JWH-018’e maruziyet SH-SY5Y hücrelerinin katalaz aktivitelerinde düşüşe neden olmuştur. Bu düşüş 100 μM ve 150 μM JWH-018 konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlıdır (sırasıyla %31,25, %25) ($p < 0,05$), (Şekil 4-9).



Şekil 4-9: 24 saat JWH-018 maruziyetleri sonrası SH-SY5Y hücrelerinde CAT aktivitesi

4.2.6. Superoksit Dismutaz Aktivitesi

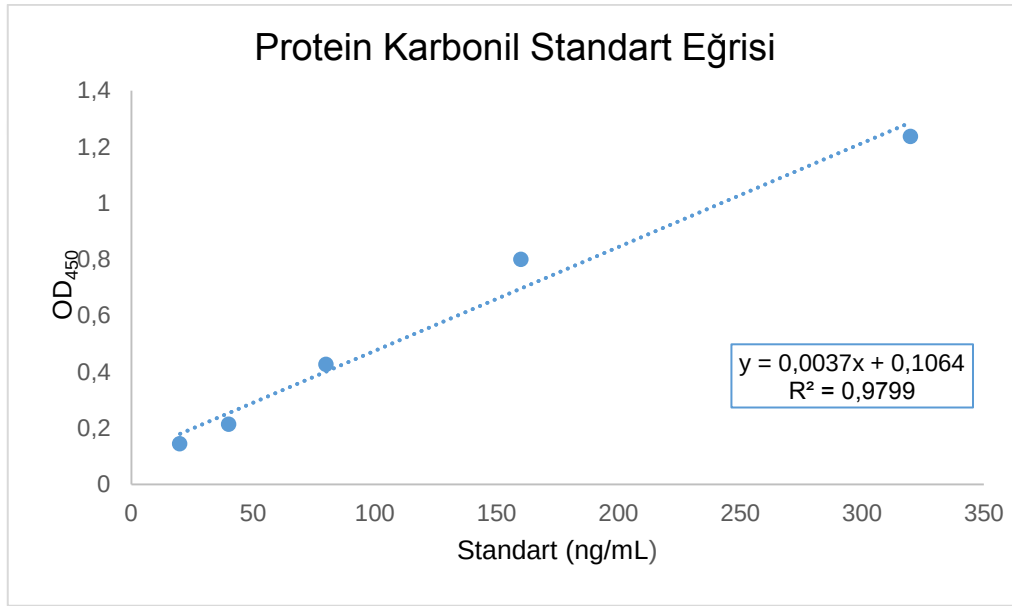
Bölüm 3.3.4.3'de açıklanan şekilde gerçekleştirilen tayininde, JWH-018 maruziyeti sonrası SOD aktivitesinde hiçbir konsantrasyonda kontrole göre anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p>0,05$), (Şekil 4-10).



Şekil 4-10: JWH-018 maruziyeti sonrası SH-SY5Y hücrelerinde SOD aktivitesi

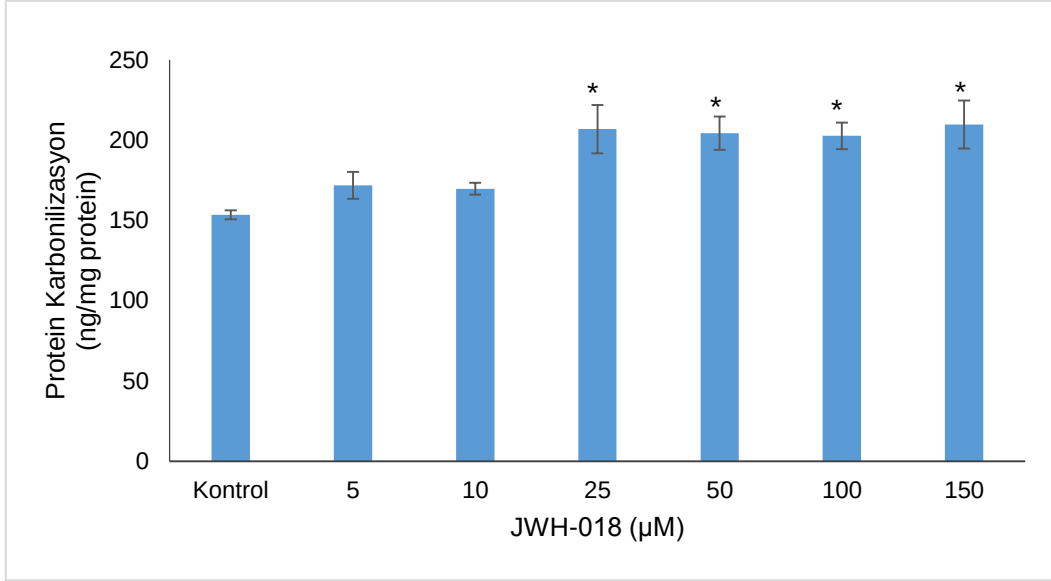
4.2.7. Protein Karbonil Düzeyi

Bölüm 3.3.4.4’de açıklandığı şekilde hazırlanan ve reaksiyon ortamındaki son konsantrasyonları 20; 40; 80; 160 ve 320 ng/mL olan Protein Karbonil standart çözeltileri ile hazırlanan ölçü eğrisi Şekil 4-11’de gösterilmiştir.



Şekil 4-11: Protein Karbonil standart ölçü eğrisi

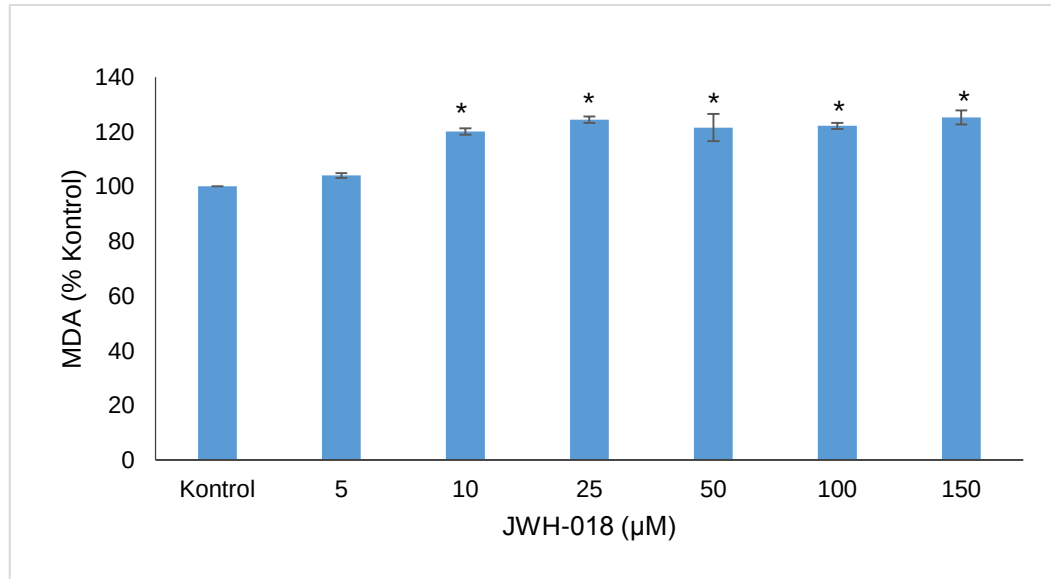
JWH-018 maruziyetleri sonrasında protein karbonilizasyon seviyelerinde 25 µM ve üzeri konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir yükseliş (%33,3-%40) tespit edilmiştir ($p < 0,05$), (Şekil 4-12).



Şekil 4-12: JWH-018 maruziyeti sonrası SH-SY5Y hücrelerinde protein karbonilizasyon seviyesi

4.2.8. Lipid Peroksidasyon Seviyesi

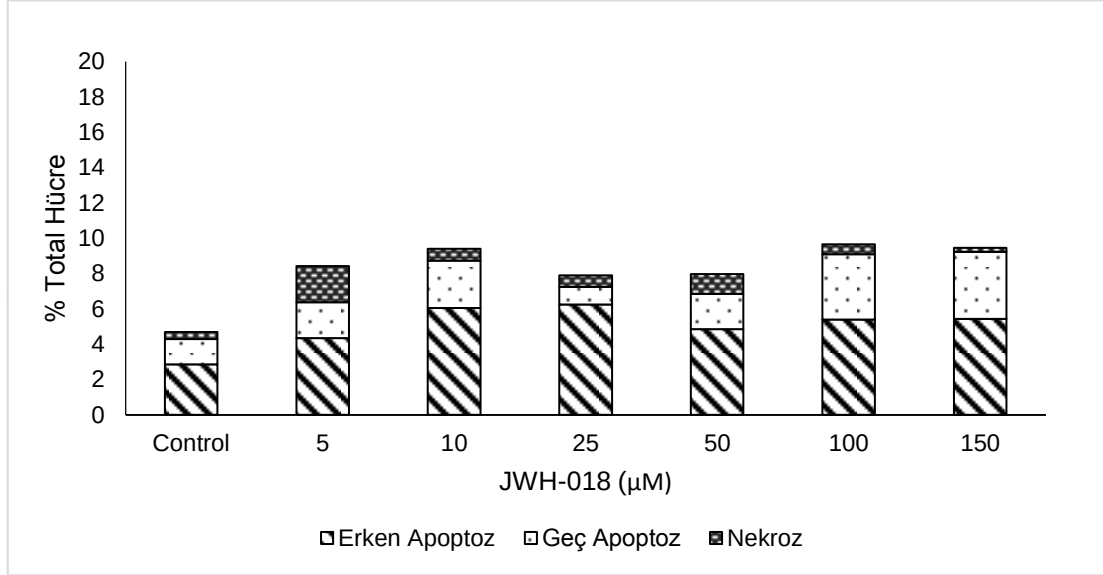
Bölüm 3.3.4.5'de açıklandığı şekilde yapılan tayinde, JWH-018 maruziyetleri sonrasında, 10 µM ve üzeri konsantrasyonda MDA miktarlarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim (%20-%30) gözlenmiştir ($p < 0,05$), (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: JWH-018 maruziyeti ile SHSY5Y hücreleri üzerindeki lipid peroksidasyon seviyesi

4.3. Apoptoz/Nekroz Bulguları

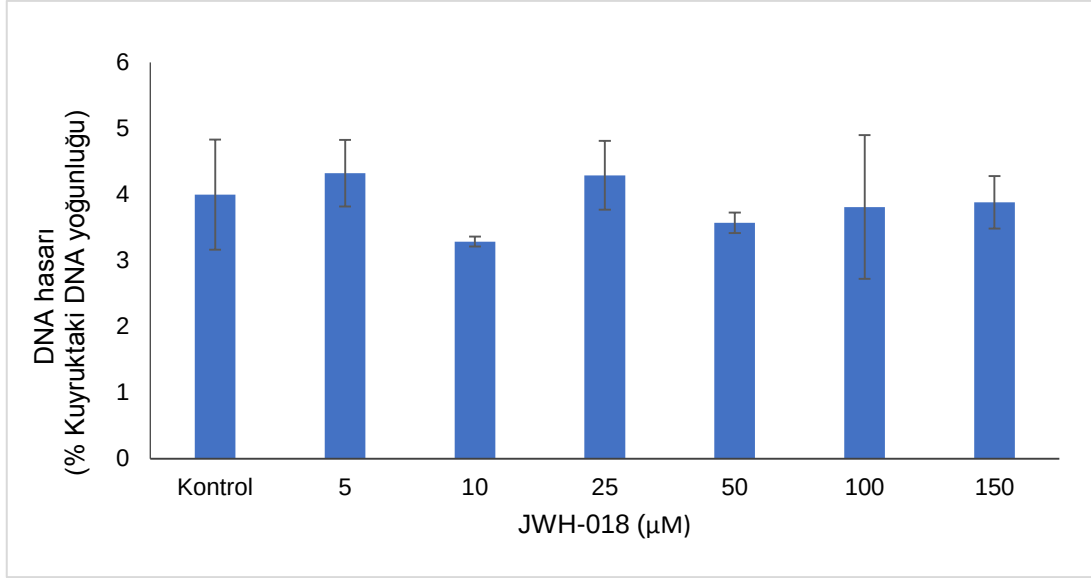
Bölüm 3.3.5’de açıklandığı şekilde Annexin V/PI boyama sonuçlarına göre JWH-018 maruziyetinin SH-SY5Y hücreleri üzerinde 5-150 μM konsantrasyon aralığında Annexin V ve/veya PI pozitif hücre sayısında istatistiksel anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür ($p>0,05$), (Şekil 4-8).



Şekil 4-14: JWH-018 maruziyetinin SH-SY5Y hücrelerinde oluşturduğu apoptotik nekrotik etkileri

4.4. DNA Hasarı bulguları

Bölüm 3.3.6’da açıklandığı şekilde uygulanan Comet yönteminde JWH-018 maruziyetinin SH-SY5Y hücreleri üzerinde 5-150 μM konsantrasyon aralığında DNA hasarı oluşturmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$), (Şekil 4-15).



Şekil 4-15: SH-SY5Y hücrelerinde JWH-018 maruziyeti sonrası Comet tayini sonuçları

5. TARTIŞMA

Ülkemizde sentetik kannabinoid kullanımı özellikle genç nüfus arasında giderek yaygınlaşmakta olup çok ciddi bir toplumsal sorun haline gelmiştir. Sentetik kannabinoid kullanıcılarında ortaya çıkan santral sinir sistemi ile ilgili toksik etkilerin ön planda olmasından hareketle; planlanan tez çalışmasında yasal otoritelerce yapılan analizlerde hala sık rastlanan sentetik kannabinoidlerden olan JWH-018 maddesinin sitotoksitesisi, DNA hasarı, apoptoz/nekroz ve oksidatif hasar oluşturma potansiyeli insan nöroblastom SH-SY5Y hücrelerinde araştırılmıştır.

Bir aminoalkilindol türevi sentetik kannabinoid olan JWH-018, CB1 reseptörüne ful agonistik etkisinden dolayı esrarın ana etken maddesi THC'den çok daha düşük dozlarda bile hayatı tehdit edebilecek düzeyde ciddi istenmeyen etkilere yol açabilmektedir. JWH-018'in ana kullanım amacı öfori etkisidir, diğer advers etkileri çok iyi bilinmemektedir. En fazla rapor edilen etkileri anksiyete, öfke patlaması, paranoya, göz temasından kaçınma, ajitasyon, delüzyonlar, psikozlar, intihara meyil, kusma ve tepkisizlik gibi santral sinir sistemi ile ilgili karmaşık etkilerdir. Bu ciddi toksik etkiler CB1 reseptör afinitesinin yüksek olmasıyla ilişkilendirilmektedir.

Çalışmada kullanılan insan nöroblastom SH-SY5Y hücresi, metastatik kemik tümör biyopsisinden üretilmiş bir hücre dizisi olup dopamin reseptörleri, tirozin hidroksilaz, dopamin-p-hidroksilaz, dopamin taşıyıcı proteinler ve özellikle çalışma konumuz olan CB1 ve CB2 reseptörlerine sahiptir. Parkinson ve diğer nörolojik hastalıklarla ilgili yapılan araştırmalarda kullanılan bu hücreler ortam özelliklerine bağlı olarak gelişmiş nöronal fenotipe dönüşebilmektedir (Kovalevich ve Langford, 2013).

Literatürde JWH-018'in toksikolojik özellikleri ile ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Koller ve arkadaşları (2014) tarafından JWH-018'in MCF-7, TR146 ve HepG2 hücre dizilerinde toksikolojik etkileri araştırılmış ve JWH-018 maruziyetine bağlı olarak MCF-7 ve TR146 hücrelerinde LDH salınımı tespit edilmiş, XTT testine göre ise sadece HepG2 hücre dizisinde hücresel canlılıkta azalma gözlenmiştir. NRU testi her üç hücre dizisi için negatif sonuç

vermiştir. Ancak söz konusu çalışmada kullanılan hücre dizilerinin hiçbirinde CB1 reseptörü bulunmadığı bildirilmiştir .

Çalışmamızda JWH-018'in 5-150 µM konsantrasyon aralığında SH-SY5Y hücreleri üzerinde hücre canlılığında anlamlı bir değişikliğe yol açtığı tespit edilmemiştir. Benzer şekilde Couceiro ve arkadaşları (2016) tarafından yapılan çalışmada HEK293T ve SH-SY5Y hücre dizilerinde MTT testi sonucunda hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlemlenmemekle birlikte, JWH-018'in faz I metaboliti olan JWH-018 - N-(3-hidroksipentil) her iki hücre dizisi için de sitotoksik bulunmuştur. Çalışmamızda JWH-018'in SH-SY5Y hücrelerinin membran bütünlüğü üzerine etkilerini değerlendirmek üzere yapılan LDH testi sonucunda Couceiro ve arkadaşlarının aynı hücre dizisinde yaptığı test sonuçlarına paralel olarak JWH-018'e bağlı LDH seviyelerinde hücre membran bütünlüğünde bozulma anlamına gelebilecek bir artış tespit edilmemiştir. Bu sonuçlardan farklı olarak Tomiyama ve Funada (2014) fare ön beyin hücre kültüründe JWH-018'in 30 µM konsantrasyonunda sitotoksisiteyi indüklediğini tespit etmişlerdir. Bu durum fare ön beyin hücre kültürünün JWH-018'in toksik etkilerine karşı immortalize SH-SY5Y hücre dizisinden daha hassas olduğunu düşündürmüştür. Ayrıca Tomiyama ve Funada'nın çalışmasında CB1 reseptör inhibisyonunun sitotoksisiteyi baskıladığı bildirilmiştir.

Oksidatif stres, nörodejenerasyonda rol oynayan önemli bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Oksidatif stres, serbest oksijen radikallerinin ve diğer reaktif bileşiklerin oluşumu ile organizmanın doğal antioksidanları olan enzimlerin değişikliğe uğraması ve/veya enzimatik olmayan antioksidanların düzeylerinin azalması durumunda ortaya çıkar. Oksidatif stresin neden olduğu en önemli hücresel hasarlardan birisi lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve biyolojik membranların bileşeni olan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif değişimi/bozunması ile sonuçlanan bir dizi reaksiyonu tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Oksidatif stres oluşumu ile CB1 endokannabinoid reseptör sistemi arasındaki ilişki ile ilgili birbiriyle çelişen yayınlar bulunmaktadır (Han ve ark., 2009; Mukhopadhyay ve ark., 2010; Rajesh ve ark., 2012; Vendel ve ark., 2014; Zhuang ve ark., 2017).

Mukhopadhyay ve arkadaşları (2010), CB1 aktivasyonunun, artmış inflamasyon ve/veya oksidatif/nitrozatif stres aracılığıyla oksijen/nitrojen bileşikleri ilişkili MAPK aktivasyonlu hücre ölüm yollarını aktifleştirerek çeşitli kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisinde rol oynayabileceğini bildirmişlerdir. Zhuang ve arkadaşları (2017) CB1 reseptörünün endojen serbest radikal süpürücülerinin aktivitelerini arttırarak antioksidan dengeye katkıda bulunduğunu ve nöroprotektif etkileri olabileceğini göstermişlerdir.

Çalışmamızda JWH-018'in SH-SY5Y hücre dizisinde oksidatif stres potansiyelini ölçmek için MDA, GSH ve protein karbonilasyon seviyeleri ile GPx, GR, katalaz ve SOD enzim aktiviteleri değerlendirilmiştir. MDA, artmış oksidatif stresin neden olduğu lipid peroksidasyon düzeyini tespit etmek için kullanılan önemli bir parametredir. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid bozunma ürünlerindeki artış MDA düzeyi ile orantılıdır. Çalışmamızda JWH-018 maruziyetine bağlı olarak MDA miktarında doz bağımlı bir artış gözlemlenmiştir. Bu artışın, JWH-018'in hücrede meydana getirdiği hasara bağlı olarak artan serbest radikallerden kaynaklandığı düşünülebilir.

Glutatyon, hücredeki makromolekülleri serbest oksijen radikalleri ve diğer reaktif türlere karşı koruyan en önemli antioksidan moleküldür. Çoğu zaman artan lipid peroksidasyonu GSH tüketimi ile sonuçlanmaktadır. Çalışmamızda JWH-018, SH-SY5Y hücrelerinde anlamlı bir şekilde ve doz bağımlı olarak GSH tüketimine neden olmuştur. GSH düzeyindeki düşüş, okside glutatyonun (GSSG) indirgenmesinde önemli rol oynayan antioksidan enzimlerden GR aktivitesinde gözlemlediğimiz düşüş ile de ilişkilendirilebilir.

JWH-018 maruziyeti sonucu SH-SY5Y hücrelerinde katalaz aktivitesinde gözlemlediğimiz anlamlı düşüş, JWH-018'in katalazın H_2O_2 'yi detoksifiye etme yeteneğini kısıtladığını düşündürmektedir. Diğer antioksidan enzimlerden GPx ve SOD aktivitelerinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir.

Proteinler oksidan birçok ürün için önemli hedeflerdir. Protein oksidasyonu organizma için önemli bir hasardır. Çünkü proteinlerde oluşabilecek oksidatif hasardan reseptörlerin, sinyal ileti mekanizmalarının, yapısal proteinlerin, taşıma sistemlerinin ve enzimlerin rol oynadığı birçok hücresel olay etkilenir. Protein hasarı serbest oksijen radikalleri ve reaktif

türlerinin etkisi sonucu oluşabileceği gibi, lipid peroksidasyonunun son ürünleri olan MDA, 4-hidroksynonenal (HNE) ve isoketallerin etkisi ile de oluşabilmektedir (Halliwell, B., 2007). Proteinlerin oksidasyonu sonucu oldukça erken aşamada stabil protein karboniller oluşmaktadır. Bu nedenle protein oksidasyon göstergesi olarak protein karbonil tayini en fazla kabul gören yöntemdir. Deneysel şartlarımızda, protein karbonil seviyelerindeki anlamlı artış JWH-018'in hücresel proteinlerde oksidatif hasar oluşturduğunu göstermektedir.

JWH-018'in yüksek CB1 reseptör afinitesinden dolayısıyla daha ciddi yan etkilere yol açabileceği düşünülmektedir. Ayrıca JWH-018'in beş hidroksil metabolitinin in vivo ve in vitro CB1 reseptör aktivitesini koruduğu da gösterilmiştir (Brents ve ark., 2011). Seely ve arkadaşları (2012) ise JWH-018'in glukuronik asit ile konjuge olan ana omega hidroksil metabolitinin CB1 reseptör afinitesini koruduğunu ve nötral antagonist olarak davranabildiğini göstermişlerdir. Ancak JWH-018 ve diğer sentetik kannabinoidlerin farmakokinetik ve farmakodinamik profilleri hakkında çok az literatür bilgisi bulunmaktadır. JWH-018'in insanlardaki farmakokinetik profilinin aydınlatılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Diğer taraftan JWH-018'in biyotransformasyonunda rol oynadığı kabul edilen CYP1A2 ve/veya CYP2C9 enzim sistemlerindeki olası genetik polimorfizmlerin JWH-018'in farmakokinetiğini ve toksisitesini etkileyebileceği ve bu özelliğin ilaç - JWH-018 veya madde - JWH-018 etkileşimleri açısından da önemli olabileceği belirtilmektedir (WHO, 2014).

Oksidatif stresin hücrede apoptoza veya nekroza yol açtığı bilinmektedir. Genel olarak şiddetli oksidatif stresin nekroz ile, şiddetli olmayan oksidatif stresin apoptoz ile sonuçlandığı kabul edilmektedir. JWH-018'in nekroz veya apoptoz aracılığıyla hücre ölümü üzerindeki etkilerini açıklamak için yapılan floresan Anneksin V ve FTC ikili boyama yöntemi anlamlı sonuçlar göstermemiştir, ancak Couceiro ve arkadaşları (2016) JWH-018-N-(3-hidroksipentil)'in nekroz aracılığıyla hücresel ölümü tetiklediğini aynı boyama yöntemi ile göstermişlerdir.

DNA hasarını belirlemek için uygulanan comet yönteminde JWH-018'in SH-SY5Y hücrelerinde genotoksisiteyi indüklediği görülmüştür. Benzer bir sonuç Koller ve arkadaşları (2014) tarafından 50, 75 ve 100 µM konsantrasyonlarda JWH-018 ile MCF-7, TR146 ve HepG2 hücre dizilerinde yapılan çalışmada da gözlemlenmiştir.

Araştırmalarımıza göre bu çalışma, JWH-018'in toksikolojik profiline ilişkin oksidatif stres parametrelerinin ve DNA hasarının araştırıldığı ilk kapsamlı in vitro çalışmadır ve in vivo çalışmalar ile desteklendiğinde JWH-018'in toksikolojik özelliklerinin açıklanmasına önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Abel, E. L. (2013). Marihuana: the first twelve thousand years: Springer Science & Business Media. Erişim Tarihi 20.06.2018, <http://cannabis-truth.yolasite.com/resources/Abel.%20marihuana%20the%20first%20two%20thousand%20years.pdf>.
- ACMD. (2009). Consideration of the major cannabinoid agonists-ACMD.pdf. Erişim Tarihi 25.06.2015, https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/119149/acmd-report-agonists.pdf.
- Ameri, A. (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in neurobiology*, 58(4), 315-348.
- Archana, M., Yogesh, T.Kumaraswamy, K. (2013). Various methods available for detection of apoptotic cells-A review. *Indian journal of cancer*, 50(3), 274-283.
- Arseneault, L., Cannon, M., Poulton, R., Murray, R., Caspi, A.Moffitt, T. E. (2002). Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: longitudinal prospective study. *BMJ : British Medical Journal*, 325(7374), 1212-1213.
- Ashton, C. H.Moore, P. B. (2009). Regulation of synthetic cannabinoids. *The Lancet*, 374(9701), 1595. doi: 10.1016/s0140-6736(09)61949-8
- Atwood, B. K., Huffman, J., Straiker, A.Mackie, K. (2010). JWH018, a common constituent of 'Spice'herbal blends, is a potent and efficacious cannabinoid CB1 receptor agonist. *British Journal of Pharmacology*, 160(3), 585-593.
- Bebarta, V. S., Ramirez, S.Varney, S. M. (2012). Spice: a new "legal" herbal mixture abused by young active duty military personnel. *Substance Abuse*, 33(2), 191-194.
- Besli, G. E., Ikiz, M. A., Yildirim, S., and Saltik, S. (2015). Synthetic cannabinoid abuse in adolescents: a case series. *J. Emerg. Med.*, 49, 644-650.
- Bopp, S. K.Lettieri, T. (2008). Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *BMC pharmacology*, 8(1), 8. Erişim Tarihi 20.06.2018, <https://bmcpharma.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2210-8-8>.
- Brents, L. K., Reichard, E. E., Zimmerman, S. M., Moran, J. H., Fantegrossi, W. E., and Prather, P. L. (2011). Phase I hydroxylated metabolites of the K2 synthetic cannabinoid JWH-018 retain in vitro and in vivo cannabinoid 1 receptor affinity and activity. Erişim tarihi 20.06.2018, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021917>.
- Brewer, T. L., and Collins, M. (2014). A review of clinical manifestations in adolescent and young adults after use of synthetic cannabinoids. *J. Spec. Pediatr. Nurs.*, 19, 119-126.
- Carter GT, F. A., Earleywine M, Abrams DI, Aggarwal SK, Grinspoon L. (2011). Cannabis in palliative medicine: improving care and reducing opioid-related morbidity. *Am J Hosp Palliat Care*(28), 297-303.
- Chimalakonda, K. C., Bratton, S. M., Le, V.-H., Yiew, K. H., Dineva, A., Moran, C. L. ve ark. (2011). Conjugation of synthetic cannabinoids JWH-018 and

- JWH-073, metabolites by human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metabolism and Disposition*, 39(10), 1967-1976.
- Chimalakonda, K. C., Seely, K. A., Bratton, S. M., Brents, L. K., Moran, C. L., Endres, G. W. ve ark. (2012). Cytochrome P450-mediated oxidative metabolism of abused synthetic cannabinoids found in K2/Spice: identification of novel cannabinoid receptor ligands. *Drug Metabolism and Disposition*, 40(11), 2174-2184.
- Cohen, J., Morrison, S., Greenberg, J.Saidinejad, M. (2012). Clinical presentation of intoxication due to synthetic cannabinoids. *Pediatrics*, 129(4), e1064-1067. doi: 10.1542/peds.2011-1797
- Collen, M. (2012). Prescribing cannabis for harm reduction. *Harm Reduction Journal*, 9, 1. Erişim tarihi 20.06.2018, <https://doi.org/10.1186/1477-7517-9-1>.
- Collins, A. (2002). The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, 203, 163-177.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M.Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195-1214.
- Coşkun, G.Özgür, H. (2011). Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(3).
- Couceiro, J., Bandarrraa, S., Sultana H., Bellc S., Constantinod S., Quintasa, A. . (2016). Toxicological impact of JWH-018 and its phase I metabolite N-(3-hydroxypentyl) on human cell lines. *Forensic Sci Int*, 264, 100-105.
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P.Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(11), pdb. prot087288.
- D'Souza, D. C., Sewell, R. A.Ranganathan, M. (2009). Cannabis and psychosis/schizophrenia: human studies. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, 259(7), 413-431. doi: 10.1007/s00406-009-0024-2
- da Silva J. de Freitas, T.R.O., Marinho J. R., Speit G., Erdtmann B. (2000). An alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology*, 23(1), 241-245.
- Debruyne, D.Le Boisselier, R. (2015). Emerging drugs of abuse: current perspectives on synthetic cannabinoids. *Subst Abuse Rehabil*, 6, 113-129. doi: 10.2147/sar.s73586
- EMCDDA. (2009). European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction E (2009) Thematic paper—understanding the ‘Spice’ phenomenon. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- EMCDDA. (2015). EMCDDA–Europol 2015 Annual Report on the implementation of Council Decision 2005/387/JHA. Erişim tarihi 20.06.2018, <http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/2880/TDAS16001ENN.pdf>.
- EMCDDA. (2016). Perspectives on Drugs Synthetic Cannabinoids in Europe. Erişim tarihi 20.06.2018,

http://www.emcdda.europa.eu/attachements.cfm/att_212361_EN_Synthetic_cannabinoids_updated2016.pdf.

- Evans, P. Halliwell, B. (1999). Free radicals and hearing: cause, consequence, and criteria. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 884(1), 19-40.
- Every-Palmer, S. (2011). Synthetic cannabinoid JWH-018 and psychosis: an explorative study. *Drug Alcohol Depend*, 117(2-3), 152-157. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2011.01.012
- Every-Palmer, S. (2010). Warning: legal synthetic cannabinoid-receptor agonists such as JWH-018 may precipitate psychosis in vulnerable individuals. *Addiction*, 105(10), 1859-1860.
- Fantegrossi, W. E., Moran, J. H., Radomska-Pandya, A. Prather, P. L. (2014). Distinct pharmacology and metabolism of K2 synthetic cannabinoids compared to Δ 9-THC: mechanism underlying greater toxicity? *Life Sci*, 97(1), 45-54.
- Fotakis, G. Timbrell, J. A. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*, 160(2), 171-177.
- Gerra, G., Zaimovic, A., Gerra, M. L., Ciccocioppo, R., Cippitelli, A., Serpelloni, G. ve ark. (2010). Pharmacology and toxicology of Cannabis derivatives and endocannabinoid agonists. *Recent patents on CNS drug discovery*, 5(1), 46-52.
- Gunderson, E. W., Haughey, H. M., Ait-Daoud, N., Joshi, A. S., and Hart, C. L. (2012). "Spice" and "K2" Herbal Highs: a case series and systematic review of the clinical effects and biopsychosocial implications of synthetic cannabinoid use in humans. *Am. J. Addict*, 21, 320-326.
- Gurdal, F., Asirdizer, M., Aker, R. G., Korkut, S., Gocer, Y., Kucukibrahimoglu, E. E. ve ark. (2013). Review of detection frequency and type of synthetic cannabinoids in herbal compounds analyzed by Istanbul Narcotic Department of the Council of Forensic Medicine, Turkey. *J Forensic Leg Med*, 20(6), 667-672. doi: 10.1016/j.jflm.2013.03.041.
- Halliwell, B. (2007). Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. *Free radicals in biology and medicine*, 187-267.
- Herkenham, M., Lynn, A.B., Little, M.D., Johnson, M.R., Melvin, L.S., de Costa, B.R., Rice, K.C. (1990). Cannabinoid receptor localization in brain. *Natl. Acad. Sci*, 1932-1936, 87.
- Hurst, D., Loeffler, G. McLay, R. (2011). Psychosis associated with synthetic cannabinoid agonists: a case series. *American Journal of Psychiatry*, 168(10), 1119-1119.
- Khullar, V., Jain, A., Sattari, M. (2014). Emergence of New Classes of Recreational Drugs-Synthetic Cannabinoids and Cathinones. *J Gen Intern Med*, 29(8), 1200-1204.
- Kohen, R. Nyska, A. (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Pathology*, 30(6), 620-650.
- Koller, V. J., Auwarter, V., Grummt, T., Moosmann, B., Misik, M. Knasmüller, S. (2014). Investigation of the in vitro toxicological properties of the

- synthetic cannabimimetic drug CP-47,497-C8. *Toxicol Appl Pharmacol*, 277(2), 164-171. doi: 10.1016/j.taap.2014.03.014.
- Koller, V. J., Zlabinger, G. J., Auwarter, V., Fuchs, S. Knasmueller, S. (2013). Toxicological profiles of selected synthetic cannabinoids showing high binding affinities to the cannabinoid receptor subtype CB(1). *Arch Toxicol*, 87(7), 1287-1297. doi: 10.1007/s00204-013-1029-1.
- Kovalevich, J., Langford, D. (2013). Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Neuronal Cell Culture: Methods and Protocols*, 9-21.
- Langer, N., Lindigkeit, R., Schiebel, H. M., Ernst, L. Beuerle, T. (2014). Identification and quantification of synthetic cannabinoids in 'spice-like' herbal mixtures: a snapshot of the German situation in the autumn of 2012. *Drug Test Anal*, 6(1-2), 59-71. doi: 10.1002/dta.1499
- Lapoint, J., James, L. P., Moran, C. L., Nelson, L. S., Hoffman, R. S. Moran, J. H. (2011). Severe Toxicity Following Synthetic Cannabinoid Ingestion. *Clin Toxicol (Phila)*, 49(8), 760-764.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G. ve ark. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, 186, 464-478.
- Lindigkeit R, B. A., Eiserloh I, Luebbecke M, Wiggermann M, Ernst L, Beuerle T. (2009). Spice: a never ending story? *Forensic Sci Int.*, 191, 58-63.
- Macfarlane, V., and Christie, G. (2015). Synthetic cannabinoid withdrawal: a new demand on detoxification services. *Drug Alcohol Rev.*, 34, 147-153.
- McGrath, J., Welham, J., Scott, J. et al. (2010). Association between cannabis use and psychosis-related outcomes using sibling pair analysis in a cohort of young adults. *Archives of General Psychiatry*, 67(5), 440-447. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2010.6.
- Mir, A., Obafemi, A., Young, A. Kane, C. (2011). Myocardial infarction associated with use of the synthetic cannabinoid K2. *Pediatrics*, 128(6), e1622-1627. doi: 10.1542/peds.2010-3823.
- Møller, P. (2006). The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 98(4), 336-345.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Bátkai, S., Patel, V., Kashiwaya, Y., Liaudet, L. ve ark. (2010). CB1 cannabinoid receptors promote oxidative stress and cell death in murine models of doxorubicin-induced cardiomyopathy and in human cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 85(4), 773-784. doi: 10.1093/cvr/cvp369.
- Müller, H., Sperling, W., Köhrmann, M., Huttner, H. B., Kornhuber, J. Maler, J.-M. (2010). The synthetic cannabinoid Spice as a trigger for an acute exacerbation of cannabis induced recurrent psychotic episodes. *Schizophrenia research*, 118(1), 309-310.
- Nicholson, P. J., Quinn, M. J. Dodd, J. D. (2010). Headshop heartache: acute mephedrone 'meow' myocarditis. *Heart*, 96, 2051-2052.
- NIDA. (2012). Drug Facts: K2/Spice ("Synthetic Marihuana") . Erişim tarihi 25.06.2015, <http://www.drugabuse.gov/publications/drugfacts/spice-synthetic-marijuana>.

- Paglia, D. E., Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 70, 158-169.
- Pant S, D. A., Dholaria B, Kaur V, Ramavaram S, Ukor M, and Teran GA. (2012). Spicy Seizure. *Am J Med Sci*(344), 67-68.
- Papanti, D., Schifano, F., Botteon, G., Bertossi, F., Mannix, J., Vidoni, D., Impagnatiello M., Pascolo-Fabrizi E., Bonavigo T. (2013). "Spiceophrenia": a systematic overview of "spice"-related psychopathological issues and a case report. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*, 28, 379-389.
- Poso A, H. J. (2008). Review: targeting the cannabinoid CB2 receptor: modeling and structural determinants of CB2 selective ligands. *Br J Pharmacol*, 153, 335-346.
- Rajesh, M., Bátakai, S., Kechrid, M., Mukhopadhyay, P., Lee, W.-S., Horváth, B. ve ark. (2012). Cannabinoid 1 Receptor Promotes Cardiac Dysfunction, Oxidative Stress, Inflammation, and Fibrosis in Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes*, 61(3), 716-727. doi: 10.2337/db11-0477
- Resmi Gazete. (2011). 13.02.2011 tarih, 27845 sayılı Resmi Gazete. Erişim tarihi 25.06.2015, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/02/20110213.htm>
- Riss, T. L. Moravec, R. A. (2004). Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and drug development technologies*, 2(1), 51-62.
- Santacroce, R., Corazza, O., Martinotti, G., Bersani, F. S., Valeriani, G., and Di Giannantonio, M. (2015). Psyclones: a roller coaster of life? Hidden synthetic cannabinoids and stimulants in apparently harmless products. *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*, 30, 265-271.
- Sasaki, Y. F., Nakamura, T. Kawaguchi, S. (2007). What is better experimental design for in vitro comet assay to detect chemical genotoxicity. *AATEX J*, 14, 499-504.
- Schneir, A. B., Cullen, J. Ly, B. T. (2011). "Spice" girls: synthetic cannabinoid intoxication. *J Emerg Med*, 40(3), 296-299. doi: 10.1016/j.jemermed.2010.10.014.
- Seely, K. A., Lapoint, J., Moran, J. H. Fattore, L. (2012). Spice drugs are more than harmless herbal blends: a review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 39(2), 234-243. doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.04.017.
- Seely, K. A., Patton, A. L., Moran, C. L., Womack, M. L., Prather, P. L., Fantegrossi, W. E. ve ark. (2013). Forensic investigation of K2, Spice, and "bath salt" commercial preparations: a three-year study of new designer drug products containing synthetic cannabinoid, stimulant, and hallucinogenic compounds. *Forensic Sci Int*, 233(1-3), 416-422.
- Seely, K. A., Prather, P. L., James, L. P. Moran, J. H. (2011). Marijuana-based drugs: innovative therapeutics or designer drugs of abuse? *Molecular interventions*, 11(1), 36.
- Singh, N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191.

- Smith, I. K., Vierheller, T. L., Thorne, C. A. (1988). Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). *Analytical biochemistry*, 175(2), 408-413.
- Spaderna, M., Addy, P. H., D'Souza, D. C. (2013). Spicing things up: synthetic cannabinoids. *Psychopharmacology (Berl)*, 228(4), 525-540. doi: 10.1007/s00213-013-3188-4.
- Stocks, J., Dormandy, T. L. (1971). The autoxidation of human red cell lipids induced by hydrogen peroxide. *Br J Haematol*, 20(1), 95-111.
- Su, M., Seely, K., Moran, J., Hoffman, R. (2015). Metabolism of classical cannabinoids and the synthetic cannabinoid JWH-018. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 97(6), 562-564.
- Svíženská, I., Dubový, P., Šulcová, A. (2008). Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures—a short review. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 90(4), 501-511.
- Tomiyama, K., Funada, M. (2011). Cytotoxicity of synthetic cannabinoids found in "Spice" products: the role of cannabinoid receptors and the caspase cascade in the NG 108-15 cell line. *Toxicol Lett*, 207(1), 12-17. doi: 10.1016/j.toxlet.2011.08.021
- Tomiyama, K., Funada, M. (2014). Cytotoxicity of synthetic cannabinoids on primary neuronal cells of the forebrain: the involvement of cannabinoid CB1 receptors and apoptotic cell death. *Toxicol Appl Pharmacol*, 274(1), 17-23. doi: 10.1016/j.taap.2013.10.028
- UNODC. (2011). Synthetic Cannabinoids in herbal products. Erişim tarihi 09.04.2015, http://www.unodc.org/documents/scientific/Synthetic_Cannabinoids.pdf.
- van Meerloo, J., Kaspers, G. J., Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer cell culture: methods and protocols*, 237-245.
- van Sickle, M., Duncan, M., Kingsley, P., Mouihate, A., Urbani, P., Mackie, K. ve ark. (2005). Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5746), 329-332.
- Vardakou, I., Pistos, C., Spiliopoulou, C. (2010). Spice drugs as a new trend: mode of action, identification and legislation. *Toxicol Lett*, 197(3), 157-162.
- Vearrier, D., Osterhoudt, K. C. (2010). A teenager with agitation: higher than she should have climbed. *Pediatr Emerg Care*, 26(6), 462-465. doi: 10.1097/PEC.0b013e3181e4f416
- Vendel, E., de Lange, E. C. M. (2014). Functions of the CB1 and CB2 Receptors in Neuroprotection at the Level of the Blood–Brain Barrier. *NeuroMolecular Medicine*, 16(3), 620-642. doi: 10.1007/s12017-014-8314-x
- Wells, D. L., and Ott, C. A. (2011). The "new" marijuana. *Ann. Pharmacother.*, 45, 414-417.
- WHO. (2014). JWH-018 Critical Review Report Agenda Item 4.5 Expert Committee on Drug Dependence Thirty-sixth Meeting Geneva, 16-20 June 2014. Erişim Tarihi 21.06.2018, http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/4_5_review.pdf.

- Wiley, J. L., Marusich, J. A., Huffman, J. W. (2014). Moving around the molecule: relationship between chemical structure and in vivo activity of synthetic cannabinoids. *Life Sci*, 97(1), 55-63. doi: 10.1016/j.lfs.2013.09.011.
- Wiley, J. L., Marusich, J. A., Martin, B. R., and Huffman, J. W. (2012). 1-Pentyl-3-phenylacetylindoles and JWH-018 share in vivo cannabinoid profiles in mice. *Drug Alcohol Depend.*, 123, 148-153.
- Williams, G. M., Jeffrey, A. M. (2000). Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32(3), 283-292.
- Young, A. C., Schwarz, E., Medina, G., Obafemi, A., Feng, S.-Y., Kane, C. ve ark. (2012). Cardiotoxicity associated with the synthetic cannabinoid, K9, with laboratory confirmation. *Am J Emerg Med*, 30(7), 1320. e1325-1320. e1327.
- Zhou, S.-F., Liu, J.-P., Chowbay, B. (2009). Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev*, 41(2), 89-295.
- Zhuang, Q., Dai, C., Yang, L., Wen, H., Wang, H., Jiang, X. ve ark. (2017). Stimulated CB1 Cannabinoid Receptor Inducing Ischemic Tolerance and Protecting Neuron from Cerebral Ischemia. *Central nervous system agents in medicinal chemistry*, 17(2), 141-150. doi: 10.2174/1871524916666160504104624.
- Zimmermann, U. S., Winkelmann, P. R., Pilhatsch, M., Nees, J. A., Spanagel, R., and Schulz, K. (2009). Withdrawal phenomena and dependence syndrome after the consumption of "spice gold". *Dtsch. Arztebl. Int.*, 106, 464-467.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

SENTETİK KANNABİNOİD JWH-018'İN TOKSİKOLOJİK ÖZELLİKLERİNİN İN VİTRO ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

%**8**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**6**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**3**

YAYINLAR

%**4**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

dergipark.gov.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

2

issuu.com

İnternet Kaynağı

%**1**

3

www.cash4appliances.org

İnternet Kaynağı

<%**1**

4

Submitted to Selçuk Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%**1**

5

Submitted to Hacettepe University

Öğrenci Ödevi

<%**1**

6

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

www.bab.com.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

Submitted to Marmara University

Öğrenci Ödevi

<%**1**

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Yiğit	Soyadı	Sezer
Doğ.Yeri	Karşıyaka	Doğ.Tar.	19.10.1987
Uyruğu	Türk	TC Kim No	23513534152
Email	sezeryigit@gmail.com	Tel	05422891730

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi	2011
Lise	Ankara Atatürk Anadolu Lisesi	2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Adli Tıp Uzmanı	Adli Tıp Kurumu	2016-
2.	Adli Tıp Asistanı (Uzmanlık Öğrencisi)	Adli Tıp Kurumu	2012-2016
3.	Acil Hekimi (Pratisyen)	Sorgun Devlet Hastanesi	2011-2012

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma *	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	95(YDS)	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı (ALES)	87	84	68
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Word-Excell-Powerpoint	iyi

--	--

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Tamamlayıcı Tıp Uygulamaları

Akupunktur

Kupa Terapisi

Ozon tedavisi

Mezoterapi

