

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
BAĞIMLILIK VE ADLİ BİLİMLER ENSİTİTÜSÜ
ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

**YENİ TASARIM PSİKOAKTİF MADDELERDEN 5F-NPB-22'NİN
İNSAN KARACİĞER HÜCRE HATTI İNKÜBASYONU İLE ELDE
EDİLEN METABOLİTLERİNİN TANIMLANMASI**

Fadile Defne YALDIZ

ADLİ BİLİMLER
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Doç. Dr. Nebile DAĞLIOĞLU

ADANA-2021

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
BAĞIMLILIK VE ADLİ BİLİMLER ENSİTİTÜSÜ
ADLİ BİLİMLER ANABİLİM DALI

**YENİ TASARIM PSİKOAKTİF MADDELERDEN 5F-NPB-22'NİN
İNSAN KARACİĞER HÜCRE HATTI İNKÜBASYONU İLE ELDE
EDİLEN METABOLİTLERİNİN TANIMLANMASI**

Fadile Defne YALDIZ

ADLİ BİLİMLER
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Doç. Dr. Nebile DAĞLIOĞLU

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TDK-2018-10937 Nolu
proje ile desteklenmiştir

ADANA-2021

ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 28 /10 /2021

Fadile Defne YALDIZ

Kayıtlı olunan Program : Adli Bilimler

Tezin Konusu : Yeni Tasarım Psikoaktif Maddelerden 5F-NPB-22'nin İnsan Karaciğer Hücre Hattı İnkübasyonu ile Elde Edilen Metabolitlerinin Tanımlanması

Tezin Türü : Yüksek Lisans: ☐ Doktora: ☒

Danışmanın Adı-Soyadı

Danışmanın İletişim Bilgileri

Telefon

E-Posta

Öğrencinin İletişim Bilgileri

Telefon

E-Posta

Adresi

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimi ve tez dönemi içerisinde, tezimin oluşumunda ve yönetiminde bilgi ve deneyimleri ile desteklerini esirgemeyen, her konuda destek olan, bana sabırla yol gösteren tez danışmanım Doç. Dr. Nebile DAĞLIOĞLU'NA,

Akademik açıdan yetişmemi sağlayan, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren değerli hocalarım; Prof. Dr. Mete Korkut GÜLMEN, Prof. Dr. Necmi ÇEKİN, Prof. Dr. Ahmet HİLAL, Prof. Dr. Behnan Alper, Prof. Dr. Ayşe SERİN ve Prof. Dr. Mehmet Ata SEÇİLMİŞ'e,

Deneysel uygulamalarda ve çalışmalarda bilgisini ve yardımını esirgemeyen her zaman destek olan değerli arkadaşım Derya YETKİN'e, desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen her zaman yanımda olan dostlarım Aynur GÜRBÜZ, Gülden GÜL ve Tuncay İNCE'ye, çalışmanın sonlanmasında sakinliğiyle yardımını esirgemeyen Ayhan AYSAL'a, hep güler yüzüyle beni motive eden bana destek olan sevgili Tülay AYDIN'a,

Eğitimim her aşamasında maddi-manevi destek sağlayan beni büyük bir ilgi ve sevgiyle bugünlere getiren değerli aileme,

Karşılaştığım her zorlukta hep yanımda olan sevgili eşim Ümit YALDIZ'a,

TDK-2018-10937 no'lu proje olarak u çalışmanın gerçekleştirilmesinde maddi katkı sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Fadile Defne YALDIZ

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	ii
ETİK BEYANI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	5
2.1. Kannabis Bitkisi.....	5
2.1.1. Kannabisin Tarihçesi.....	7
2.1.2. THC'nin Yapısı ve Farmakokinetiği.....	8
2.1.3. Kannabinoidlerin Farmakokinetik Özellikleri.....	12
2.2. Sentetik Kannabinoidler.....	14
2.2.1. Sentetik Kannabinoidlerin Tarihçesi.....	14
2.2.2. Sentetik Kannabinoidlerin Yapıları ve Sınıflandırılması.....	15
2.2.3. Sentetik Kannabinoidlerden 5F-NPB-22 Maddesinin Yapısı.....	17
2.2.4. Sentetik Kannabinoidlerin Farmakolojik ve Toksikolojik Özellikleri.....	19
2.2.4.1. Sentetik Kannabinoid Reseptör Agonistleri ve Antagonistler.....	19
2.2.5. Sentetik Kannabinoidlerin Farmakokinetiği.....	21
2.2.6. Sentetik Kannabinoidlerin Etkileri.....	24
2.2.7. Sentetik Kannabinoidlerde Toksikolojik Analiz Yöntemleri.....	24
2.2.8. Yasal Durum.....	29
2.3. İnsan Hepatositlerinde Mikrozomal Çalışmalar.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler.....	33
3.1.1. Kimyasal Malzemeler.....	33
3.1.2. Araç, Gereç ve Cihazlar.....	33
3.2. LC/Q-TOF MS Cihaz Parametreleri	34

3.2.1. Numunelerin LC/Q-TOF için Hazırlanması.....	35
3.3. Hücre Kültürü.....	36
3.3.1. THLE-2 Hücre Hattı.....	36
3.3.2. Medyum Hazırlanması.....	37
3.3.3. Hücrelerin Çözülmesi.....	37
3.3.4. Hücrelerin Pasajlanması.....	37
3.3.5. Hücrelerin Sayılması.....	38
3.3.6. Hücrelerin Çoğalması.....	39
3.4. 5F-NPB-22 Maddesinin Uygulanması.....	40
3.5. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Deneylerinin Gerçekleştirilmesi.....	41
3.6. İstatistiksel Analiz.....	43
3.6.1. xCELLigence Sisteminde Yapılan Sitotoksosite Deneyinin İstatistiksel Analizi.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. LC/Q-TOF MS Analiz Sonucu	44
4.2. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Bulguları	48
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	60
7. KAYNAKLAR.....	62
EKLER.....	73
EK-1.....	73
EK-2.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1. Tetrahidrokannabinolün (THC) kimyasal yapısı.....	9
Şekil 2. Sentetik kannabinoidlerin dört kimyasal ana yapı olarak gösterilmesi.....	17
Şekil 3. 5F-NPB-22'nin (1-(5-floropentil)-8-kinolinil ester-1H-indazol-3 karboksilik asit) kimyasal yapısı.....	17
Şekil 4. 5F-NPB-22'nin, NPB-22'nin, JWH-18'in kimyasal yapısı.....	18
Şekil 5. SK'lerin emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımının şematik özeti.....	23
Şekil 6. Agilent 6550 (LC/QTOF MS).....	35
Şekil 7. Cedex XS hücre sayım cihazı ve cedex smart slides.....	39
Şekil 8. Cedex cihazında yapılan hücre sayımı ve canlılık oranı.....	39
Şekil 9. THLE-2 hücre ekiminin mikroskopik görüntüsü.....	40
Şekil 10. xCELLigence DP Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı ve E- Plate 16.....	41
Şekil 11. 5F-NPB-22 maddesinin 100 ng/mL standart çözeltisinin LC/Q-TOF MS cihazındaki (a) kütle spektrumu (b) seçilmiş iyon kromatogram.....	44
Şekil 12. 5F-NPB-22'nin elde edilen metabolitleri	45
Şekil 13. 5F-NPB-22'nin elde edilen metabolitlerinin ekstrakte edilmiş iyon kromatogramları.....	46
Şekil 14. 5F-NPB-22 için önerilen metabolik yollar: a. Ana madde, b. Ester hidrolizi, c. Monohidroksilasyon ile ester hidrolizi, d. Oksidatif deflorinasyon ile ester hidrolizi.....	47
Şekil 15. Ana madde ve metabolitler için sinyal şiddetleri.....	47
Şekil 16. RTCA Software 1.2.1' de hesaplanan THLE-2 hücrelerinde 5F-NPB-22'ye ait IC50 değeri.....	48
Şekil 17. 1µM, 10µM, 50µM ve 100µM konsantrasyonlarına ait gerçek-zamanlı hücre analizi proliferasyon eğrileri. kırmızı: kontrol, yeşil: 1µM, lacivert: 10 µM, pembe: 50 µM, turkuaz: 100 µM, mor: boş okuma.....	49
Şekil 18. RTCA Software 1.2.1' de hesaplanan THLE-2 hücrelerinde farklı 5F-NPB-22 konsantrasyonlarına ait hücre indeks değerlerinin zamana bağlı değişim grafiği.....	49
Şekil 19. Kanun Kapsamına Alınan Yeni Psikoaktif Maddeler (2008-2018).....	51

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1. Kannabis bitkisi içeriğindeki kannabinoid etkili bileşiklerin sınıflandırılması...	6
Tablo 2. LC/Q-TOF MS Çalışma koşulları.....	35
Tablo 3. 5F-NPB-22 ve metabolitlerinin ana iyon ve ana ürün iyonlar.....	45
Tablo 4. 5F-NPB-22 maddesinin hücreye uygulanmasından 24, 48, 72 ve 96 saat sonra gruplar arasında alınan ölçüm ortalamaları. a:kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

BEGM	: Bronş Epitel Büyüme Ortamı
CB1	: Kannabinoid Reseptör Tip 1
CB2	: Kannabinoid Reseptör Tip 2
CBD	: Kannabidiol
CH ₂ Cl ₂	: Diklorometan
CYP450	: Sitokrom p450
DMAP	: 4-Dimethylaminopyridine
DMF	: Dimetilformamid
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DPBS	: Dulbecco's fosfat tuz solüsyonu
EDC.HCl	: 1-Ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimide.HCl
EMCDDA	: Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi
ESI	: Elektron Sprey İyonlaşma
EtOAc	: Etil asetat
EUROPOL	: Avrupa Polis Ofisi
EWS	: Erken Uyarı Sistemi
FBS	: Fötal Sığır Serumı
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
GABA	: Gama aminobütirik asit
GC/MS	: Gaz Kromatografi/Kütle Spektrometresi
HR LC/MS	: Yüksek Çözünürlüklü Sıvı Kromatografisi
Immortalized	: Ölümsüzleştirilmiş
IS	: İnternal (iç) Standart
LC-MSMS	: Sıvı Kromatografi/Ardışık Kütle Spektrometresi
LC/Q-TOF MS	: Sıvı Kromatografi/Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
MALDI-TOF	: Matris destekli lazer desorpsiyonu/iyonlaşma
MBÖ	: Madde Bağlantılı Ölüm
MRM	: Çoklu Reaksiyon İzleme
NPS	: Yeni Nesil Psikoaktif Madde
PBS	: Tuzlu Fosfat Tamponu

pH	: Potensiyel Hidrojen
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SİM	: Seçilmiş İyon İzleme
SK	: Sentetik Kannabinoid
THC	: Tetrahidrokannabinol
THLE-2	: Karaciğer Hücre Hattı
TUBİM	: Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi



ÖZET

Yeni Tasarım Psikoaktif Maddelerden 5F-NPB-22'nin İnsan Karaciğer Hücre Hattı İnkübasyonu İle Elde Edilen Metabolitlerinin Tanımlanması

Günümüzde geleneksel yasadışı maddelerin yerini yeni tasarım psikoaktif (YTP) maddeler almaya başlamıştır. YTP'lerin kullanımının artmasına rağmen, insan metabolizması verileri yeteri kadar mevcut değildir. Dünyada bu maddelerin kullanımı 2009 yılında başladığı için, farmakolojik ve toksikolojik profilleri henüz bilinmemektedir. Mevcut çalışmalar, diğer yasadışı maddelere kıyasla daha güçlü etkilere sahip olduklarını ve metabolitlerinin MSS'deki CB1 reseptörlerine karşı afiniteyi koruduğunu göstermektedir. YTP'ler vücuda girdikten sonra farklı metabolitlere dönüşürler. Bu metabolitlerin biyolojik örneklerde tespit edilebilmesi için, metabolitlerin referans standart maddelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Fakat henüz dünya da ticari olarak 5F-NPB-22'nin metabolitlerinin referans standart maddeleri mevcut değildir.

Bu çalışmada 5F-NPB-22 maddesinin THLE-2 insan karaciğer hücre hattında 3 saat inkübasyonundan sonra toplanan örneklerin yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (LC/QTOF MS) ile analizleri yapılmıştır. Elde edilen kromatogramda metabolitlerin belirlenmesi için yazılım destekli veri tabanı ile tarama yapılarak toplamda üç adet ana metabolit belirlenmiştir. Bu metabolitler etil ester, ester hidrolizi ve metil ester ürünüdür.

Yeni tasarım psikoaktif maddelerin insan karaciğer hücre hattındaki sitotoksik etkileri üzerine yapılan araştırmalar az olduğundan, bu çalışmada 5F-NPB-22'nin hücre üzerindeki anti-proliferatif etkisi xCELLigence DP Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Analiz sonucuna göre 5F-NPB-22 maddesi için IC₅₀ değeri 66 µM olarak hesaplanmıştır.

Bu çalışma ile elde edilen bulgular sonucunda, 5F-NPB-22 maddesinin in vitro metabolizma çalışmaları sayesinde, madde alımının tespitinin ve oluşturduğu sitotoksik etkilerin belirlenmesinin klinik ve adli laboratuvarlara önemli veri sağlayacağı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sentetik Kannabinoidler, Yeni Tasarım Psikoaktif Maddeler, 5F-NPB-22, THLE-2 Hücre Hattı, Sitotoksiste.

ABSTRACT

Identification of The Metabolites of 5F-NPB-22 New Designer Psychoactive Substances That Obtained By Human Liver Cell Line Incubation

New design psychoactive (NDP) substances have recently begun to be substituted for traditional illicit substances as drugs of abuse. Despite the increasing use of NDP, data on human metabolism are not adequately available. Since the use of these substances in the world started in 2009, their pharmacological and toxicological profiles are not yet known. Existing studies show that they have stronger effects compared to other illicit substances and that their metabolites maintain affinity for CB1 receptors in the CNS. NDP substances turn into different metabolites after entering the body. In order to detect these metabolites in biological samples, reference standards of these metabolites are needed. However, reference standard substances of the metabolites of 5F-NPB-22 are not commercially available in the world yet.

In this study, samples collected after 3 hours of incubation of 5F-NPB-22 in THLE-2 human liver cell line were analyzed by high resolution mass spectrometry (LC/QTOF MS). In order to determine the metabolites in the obtained chromatogram, a total of three main metabolites were determined by scanning with the software supported database. These metabolites are ethyl ester, ester hydrolysis and methyl ester product.

Since the studies on the cytotoxic effects of newly designed psychoactive substances in the human liver cell line are scarce, in this study, the anti-proliferative effect of 5F-NPB-22 on the cell was determined using the xCELLigence DP Real Time Cell Analyzer. According to the analysis result, the IC₅₀ value for the 5F-NPB-22 substance was calculated as 66 μ M.

As a result of the findings obtained in this study, it has been shown that the determination of substance intake and the cytotoxic effects of 5F-NPB-22 by means of in vitro metabolism studies will provide important data to clinical and forensic laboratories.

Keywords: Synthetic Cannabinoids, New Design Psychoactive Substances, 5F-NPB-22, THLE-2 Cell Line, Cytotoxicity.

1.GİRİŞ

Türkiye coğrafi konumu ve genç nüfusu sebebiyle uyuşturucudan doğrudan etkilenen ülkeler arasındadır. Ülkemiz gerek Asya’da üretilen ve Avrupa’ya transfer edilen başta eroin olmak üzere afyon türevleri kaçakçılığında, gerekse Avrupa’da üretilen ve Asya’ya sevkiyatı yapılan sentetik uyuşturucu ve ara kimyasal kaçakçılığında **transit** ve **hedef** ülkedir. Türkiye uyuşturucu kaçakçılığı bağlamında son derece önemli bir güzergah olan “Balkan Rotası” üzerinde yer almaktadır.

Yeni nesil uyuşturucular kategorisinde olan sentetik kannabinoid maddesi, uyuşturucu ve hayal gösterici etkileri olan, tamamen sentetik narkotik bir maddedir. 300’e yakın kimyasal çeşidi bilinmektedir. Ülkemize yasadışı yollarla başta Çin’den getirilen ham maddenin çözülmesi oldukça kolaydır. Çoğaltılması için profesyonel laboratuvar gerekmemektedir. İçine haşere ve tarım ilacı gibi zehirli katkılar eklenmektedir. Çoğu kullanıcı bu katkıların neden olduğu zehirlenme etkisini, narkotik madde etkisi sanmaktadır. Ada çayı, damiana çayı, yavşan otu, kekik, kalitesiz esrar, kına, hint kınası, kimyon gibi bitkisel ürünlere spreyleme yoluyla emdirildiği gibi, kağıt üzerine de spreylenecek şekilde ele geçirilmiş örnekleri mevcuttur. Bitkisel ürünler ve bazen de esrar üzerine spreylenecek şekilde, kullanıcılarda sentetik (kimyasal) olmadığı yönünde güçlü fakat yanlış bir kanaat oluşturmaktadır. Tüm bunlar kullanıcılar için ölüm riskini artırmaktadır.

2018 yılında meydana gelen Madde Bağlantılı Ölüm (MBÖ) vakalarının bir kısmına, çoklu (karışık) madde kullanımı sebep olmuştur. 2018 yılında 657 madde bağlantılı ölüm olayının %45,8’inde (301) sentetik kannabinoid mevcuttur. 2017 yılında ise 941 madde bağlantılı ölüm olayının %59,9’unda (564) sentetik kannabinoid mevcuttur.

Sentetik kannabinoid (bonzai) görülen 301 ölümün 147’sinde (%48,8) ölüm tek başına bu maddeden kaynaklanmıştır. 2017 yılında ise sentetik kannabinoid (bonzai) görülen 564 ölümün 247’sinde (%43,8) ölüm tek başına bu maddeden kaynaklanmıştır¹.

EMCDDA (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction- Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi) Avrupa Birliği’ne bağlı ve temel faaliyet alanı uyuşturucu madde ve madde bağımlılığı ile mücadele eden profesyoneller arasında koordinasyon ve kooperasyonu sağlamak olan, onlara bilimsel

verileri temin eden ve politika üreten bir organizasyondur. EMCDDA bünyesinde yer alan EWS (Early Warning System - Erken Uyarı Sistemi) ağı birlik ülkeleri arasında hızlı ve etkin iletişimi sağlayarak bu maddelerle mücadelede son derece etkili olmaktadır.

EMCDDA'nın birliğe üye 27 ülke ile Türkiye, Hırvatistan gibi aday ülkelerde Ulusal Temas Noktaları bulunmaktadır. Ülkemizin Ulusal Temas Noktası Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (TUBİM)'dir. EMCDDA bilimsel değerlendirme sonucunda yakalanan maddenin toplumsal risk taşıdığı kanaatine varır ise birlik ülkelerine maddenin belirlenen tarih içerisinde yasak maddeler listesine alınması konusunda bildirimde bulunmaktadır. Evrensel bir prensip olan suçta ve cezada kanunilik ilkesi gereği hiç kimse henüz ulusal ve uluslararası yasalarda yer almayan yeni bir psikoaktif maddenin kullanımı, bulundurulması veya ticareti nedeni ile suçlanamamaktadır².

Yeni tasarım maddeler içerisinde bir madde sınıfını temsil eden sentetik kannabinoidler ise ilk olarak farmakolojik amaçlar doğrultusunda endokannabinoid sistem araştırmaları ve potansiyel farmakoterapiler amacıyla geliştirilmiş kannabinoid 1 (CB1) ve/veya CB2 reseptör ligandlarıdır. İlaç şirketleri ve akademiler tarafından yüzlerce çeşidi sentezlenen sentetik kannabinoidlerin reseptörlere bağlanma afiniteleri ve yapı-aktivite ilişkileri araştırılmıştır. 2000'lerin ortalarından beri bu sentetik kannabinoid maddeler, rekreasyonel (eğlence) amaçla kötüye kullanılmaktadır. Ürünler bir veya daha fazla sentetik kannabinoid içerebilir. Paketlerin üzerinde genellikle inert olarak nitelendirilebilecek bitkisel bileşenlerin ve daha seyrek olarak da doğal psikoaktif alkaloidleri içeren bitkilerin isimleri yazmaktadır. Herhangi bir resmi düzenleme olmaması nedeniyle aktif farmakolojik maddeler paketlerin üzerinde bulunmamaktadır³.

Vücutta sistemik fizyolojik bir etki oluşturmak amacıyla çoğu ilaç bir reseptör bölgeye bağlanmaktadır. Bu da bu maddelerin lipid membranlardan geçebilmeleriyle mümkün olmaktadır. Dolayısıyla, çoğu ilaç yağda çözünme özelliğine sahiptir. Metabolizmanın görevlerinden biri bu aktif yağda çözülebilen maddelerin, suda çözülen inaktif maddelere dönüşümünü gerçekleştirerek öncelikli olarak böbrekler aracılığıyla atılmasını sağlamaktır. Bu metabolik süreç genellikle karaciğer hücrelerinde gerçekleşir. Kannabinoidler temel olarak karaciğerde metabolize edilir, fakat beyin,

akciğer ve bağırsaklar gibi diğer dokularda da biyotransformasyona uğrayabilirler^{4,5}. İdrarda analizin efektif bir şekilde gerçekleştirilebilmesi, alınan maddelerin canlı sistem içerisinde uğrayacağı değişimlerin bilinmesinden geçmektedir. Bu nedenle ortaya çıkan yeni tasarım maddeler için metabolik profillemeye çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla; son yıllarda ilaç geliştirme aşamalarında uygulanan metotlar analiz metotlarının geliştirilmesi amacıyla kullanılmaya başlanmıştır⁶.

İndol ve indazol grubu içeren yeni nesil kannabinoidler (5F-ADBICA, 5F-NPB-22, AB-FUBINACA vb.) 2011 yılında ortaya çıkmıştır. Türkiye'de 5F-NPB-22 ilk olarak 2014 yılında ortaya çıkarken, AB-FUBINACA 2013 yılında piyasaya çıkmıştır. Efeoğlu ve ark.'nın Türkiye'de Bonzai olarak satılan, yeni tasarım psikoaktif maddeleri içerdiği bilinen bitkisel ürünün kimyasal içeriğinin belirlenmesi için yaptıkları çalışmada, analiz sonucuna göre bitkisel üründe; sentetik AB-FUBINACA ve 5F-NPB-22 tespit edilmiştir. Bonzai'de % 8.5 5F-NPB-22 ve % 1'den az AB-FUBINACA içerdiği bulunmuştur⁷.

Atasoy ve ark. denetimli serbestlik hastalarından alınan idrar örneklerinde SK taraması yapılmıştır. 58 sentetik kannabinoid ve metabolitlerinin 21 tanesi görülmüştür. Bu maddelerin idrar örneklerinde saptanma sıklıklarına yüzdelik olarak bakıldığında dağılım oranı; % 46 5F-NPB-22, % 24 (S)- AB-FUBIMACA, % 9 JWH-122 ve metabolitleri, % 9 JWH-210 ve metabolitleri olarak bulunmuştur⁸.

Gençler ve yetişkinler tarafından giderek daha fazla kullanılan SK'ler önemli bir halk sağlığı sorunudur ve madde alımının belirlenmesi son zamanlarda adli tıp, klinik ve işyeri ilaç test laboratuvarları için analitik bir zorluk haline gelmiştir. Bununla birlikte, SK içeren bitkisel ürünlerin kullanımını gösteren birçok kayıt olmasına rağmen, bu kimyasallarla ilişkili çok az farmakokinetik bilgi bulunmaktadır. Bu bilgi eksikliği genellikle biyolojik numunelerde SK'lerin tespitini ve test sonuçlarının yorumlanmasını çok zorlaştırmaktadır.

Ülkemizde yapılan çalışmalardan yola çıkarak son dönemde bitkisel ürünlerde ve biyolojik örneklerde en çok tespit edilen, metabolik profillemeye çalışması henüz yapılmamış yeni tasarım psikoaktif maddelerden biri 5F-NPB-22 çalışmamızda seçilmiştir. Biyolojik örneklerde madde alımını belirlemek, daha geniş kapsamlı ve hassas analitik yöntemler oluşturmak için diğer sentetik kannabinodlerin olduğu gibi 5F-NPB-22 maddesinin de metabolitlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalara ihtiyaç

duyulmaktadır.

Bu çalışmada amacımız, yeni tasarım psikoaktif maddelerden 5F-NPB-22 (1-(5-floropentil)-8-kinolinil ester-1H-indazol-3-karboksilik asit)' nin THLE-2 (ATCC® CRL-2706™) karaciğer hücre hattında inkübasyonu sonucu elde edilen metabolitleri LC/Q-TOF MS cihazı ile tanımlamak ve 5F-NPB-22 maddesinin sitotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemektir.



2. GENEL BİLGİ

2.1. KANNABİS BİTKİSİ

Kannabis bitkisi, Cannabaceae botanik familyasının bir üyesi olan ve daha çok ılıman ve tropikal bölgelerde yetişen bir bitkidir. Boyu altı metreye kadar ulaşabilir, 2500 metre rakımda dahi gelişebilir. Bitkinin yaşam döngüsü oldukça kısa olup yaklaşık 3-5 aydır, çok az suyla bile günde 15 santimetreye kadar uzayabilir. İki evcikli bir bitki olup, dişi eşeyli olanlarda $\Delta 9$ -tetrahidrokannabinol (THC) oranı daha yüksektir. Cannabis cinsi bitkinin birçok türü olmakla birlikte, en yaygın olarak bulunan üç tür *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* ve *Cannabis ruderalis*'tir. *Cannabis sativa*, Avrupa'ya özgü olan, her türlü iklimde yetişen ve en yaygın olarak bulunandır⁹⁻¹². Lamarck, Hindistan'daki bazı cannabis türlerinin Avrupa'da yaygın olarak bulunan kenevirden farklı olduğunu belirtmiş ve bu cinse *Cannabis indica* adını vermiştir¹³. *Cannabis sativa* daha uzun boylu, daha az dallanmış, ince ve uzun yapraklı iken, *Cannabis indica* daha kısa boylu, yoğun olarak dallanmış, kısa ve geniş yapraklıdır. *Cannabis ruderalis* ise Sibirya ve Orta Asya'ya özgü olup daha az bilinendir. Cannabis bitkisinin taksonomik farklılıklarına ilişkin günümüzde farklı görüşler bulunmaktadır^{10,14}. Bazı araştırmacılar, genetik varyasyonlara dayanarak, tek bir cinse (Cannabis) bağlı en az iki türün (*Cannabis sativa* ve *Cannabis indica*) olduğunu kabul ederler¹⁰. Diğer bir görüşe göre ise, Cannabis sativa tek bir türdür, diğerleri genetik farklılıkları olan alt-türlerdir¹⁵.

Kannabis bitkisi içinde tanımlanmış veya izole edilmiş doğal bileşik sayısı sürekli artmaktadır; çünkü her sene farklı araştırmalarla yeni doğal bileşikler bulunmaktadır. Cannabis bitkisi içindeki doğal bileşik sayısı 1980 yılında 423 olarak bildirilmiştir, günümüzde ise yaklaşık olarak 550 civarındadır^{10,11,16}. Bu bileşiklerin en az 104 tanesi cannabinoid etkinlik göstermektedir; bunlara türevleri ve transformasyon ürünleri ile birlikte hepsine fitokannabinoidler denir. Terpenoidler, flavonoidler, steroidler, fenantrenler, yağ asitleri, nitrojen bileşikleri ve diğer yaygın bitki molekülleri cannabinoidlerin dışında tanımlanmış diğer bileşiklerdir^{10,11}. Günümüze kadar izole edilmiş olan 104 fitokannabinoid 11 tip olarak sınıflandırılmıştır: $\Delta 9$ -tetrahidrokannabinol, $\Delta 8$ -tetrahidrokannabinol, kannabigerol, kannabikromen,

kannabidiol, kannabinodiol, kannabielsoin, kannabisiklol, kannabinol, kannabitriol ve diğerleri¹¹. Bu sınıflar ve yer aldıkları bileşik sayıları Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1: Kannabis bitkisinin içeriğindeki kannabinoid etkili bileşiklerin sınıflandırılması¹¹.

Kimyasal grup	Bileşik sayısı
Δ 9-tetrahidrokannabinol	18
Δ 8-tetrahidrokannabinol	2
Kannabigerol	17
Kannabikromen	8
Kannabidiol	8
Kannabinodiol	2
Kannabielsoin	5
Kannabisiklol	3
Kannabinol	10
Kannabitriol	9
Sınıflandırılmayanlar	22
Toplam	104

Kannabis bitkisi içinde en ayrıntılı olarak incelenmiş olanı, bitkinin ana psikoaktif komponenti olan Δ 9- THC’dir. Diğerleri arasında kannabidiol büyük önem kazanmıştır; bunun nedeni kannabidiol’ün kannabinoid reseptörlerinin etkilememesi nedeniyle başta psikoaktif etkinlik olmak üzere birçok santral etkilerinin olmaması ve ayrıca THC’nin istenmeyen etkilerini de azalttığını gösteren araştırmaların yapılmasıdır^{17,18}. Kannabis bitkileri içerdikleri Δ 9-THC ve kannabidiol oranlarına göre 3 farklı kemotaksonomik tipe ayrılırlar: Δ 9-THC-tipi, hibrid tip ve kannabidiol-tipi^{10,19}. Ortalama olarak, Cannabis sativa daha yüksek oranda kannabidiol içerirken, Cannabis indica daha yüksek oranda Δ 9-THC içerir; fakat bitki türleri arasında bu oran açısından büyük farklılıklar görüldüğü bilinmelidir, psikoaktif etkinlik de bitki içeriğindeki bu orana göre değişebilmektedir^{19,20}. Bazı bitkilerde ise yüksek oranda bir propil kannabinoid olan tetrahidrokannabivarin düzeyleri görülebilir; son senelerde önem kazananlardan olan bu bileşik tip 2 diyabet ve metabolik sendrom için denenmektedir^{19,21,22}. Bitki içeriğinin kannabinoid oranlarında değişkenlik göstermesinin dışında, bitki materyalinin pestisit rezidüsü veya fungal kontaminant içerme potansiyeli ve inhalasyonla içimdeki dozlama sorunları FDA’nın bitkisel kannabisi henüz onaylamamasının nedenleri arasındadır^{9,16}.

Kannabis kullanımı genellikle sigara kağıtlarına sarılarak (joint) veya puro yapraklarına sarılarak (blunt) bitki materyalinin dumanının solunması veya bu bitkiden hazırlanan farklı kısımların çay gibi demlenerek içilmesi veya yenilmesi şeklindedir. Esrar, coğrafyasına göre farklı isimlerle adlandırılır. Bhang; yumuşak kannabis karışımıdır, genellikle şekerleme olarak ya da içecek olarak tüketilir. Öğütülmüş kannabis bitkisinin yaprakları şeker, baharatlar ve meyve ile karıştırılarak macun yapılır. Oral yolla tüketildiği için maddenin etkileri sigara olarak tüketilmesine kıyasla daha yavaş ortaya çıkar. Bhang sadece bitkinin yapraklarından ve farklı karışımlar olarak hazırlandığı için içerdiği THC konsantrasyonu çok düşüktür. Yüksek oranda THC içeren kannabis çiçekleri ve reçinesiyle hazırlanan Ganja karışımı, tütün ile karıştırılarak sigara gibi sarılarak içilebilir. Jamaika’da genellikle bu adla anılır. Kannabis bitkisinin hemen hemen saf konsantre reçines, Charas olarak adlandırılır ve THC oranı çok yüksektir. İnhalasyon yoluyla tüketilir. Marijuana, kannabisin kurutulmuş çiçekleri ve yapraklarından yapılır. Amerika’da yaygın olarak kullanılan formudur. Hashish, kurutularak kalıplar haline getirilen konsantre kannabis reçinesidir. İnhalasyon yoluyla tüketilir, etkisi çok güçlüdür. Alkol gibi kimyasal bir çözücüyle ayrıştırılarak elde edilen Hash yağında yüksek miktarda THC vardır^{23,25}.

2.1.1. Kannabisin Tarihçesi ve Medikal Kullanımı

Esrarın kullanımı oldukça eskidir, tedavi edici olarak kullanımı yanında, keyif verici ve sarhoş edici etkisi için ve onlarca sektörde hammadde olarak kullanılmaktadır. Kannabisin ilk defa neolitik çağda Çin’de kullanıldığı düşünülmektedir. Esrarın tıbbi kullanımına dair en eski kanıt Çin’de bulunmuştur ve M.Ö. 2737 yıllara dayanmaktadır. Birçok hastalığında tedavisinde önerilmiştir. Milattan önce 2700 yıllarında, Çin İmparatoru Shen Nung zamanında hazırlanan, ilk farmakoloji kitabı olarak kabul edilen kırk ciltlik eserde 265 şifalı bitkiye ve devaya ilişkin bilgi verilmiş, bu arada Hint kenevirinin de etkileri, özellikleri anlatılmış, hint keneviri, beriberi, gut, romatizma, sıtma, zayıflama gibi bedensel: duygu ve düşünce bozukluğu gibi ruhsal hastalıklar için ilaç olarak önerilmiştir²⁴.

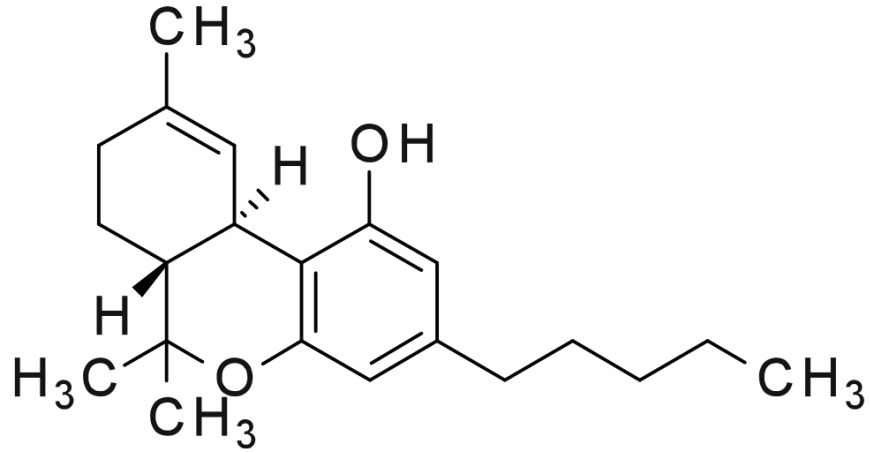
Çin'in aksine, esrarın psikoaktif özellikleri için kullanımı Hindistan'da bin yıldan fazla bir süredir endemiktir. Kannabis kullanımı Neolitik Çağ'da kuzeydoğu Asya'nın göçebe kabileleri tarafından bilinmekteydi ve Şamanizm dininin bu insanlar tarafından uygulanmasında önemli bir rol oynamaktaydı. Göçebe kabilelerinin kannabisi Batı Asya 'ya ardından Hindistan'a getirdiği söylenmektedir. Esrarın Batı'ya ulaşması daha uzun sürmüştür. Kannabis, Asur uygarlığı tarafından hem bir lif bitkisi hem de bir ilaç olarak bilinmekteydi. Yunanlılar dönemine kadar bitkinin Türkiye dışında bilindiğine dair çok az kanıt vardır ²⁶.

Tıp ve felsefe alanında yüzlerce kitap yazan, batılılarca Orta Çağ Modern Biliminin kurucusu ve hekimlerin önderi olarak bilinen İbn-i Sina (980-1037) kitaplarında, "Kunnab" adı altında Hint kenevirine de yer vermiş ve medikal olarak kullanımından bahsetmiştir. Tıp alanında yedi asır boyunca temel kaynak eser olarak okutulan El-Kanun fi't-Tıb (Tıbbın Kanunu) adlı kitabı ve Avrupa üniversitelerinde 17. asrın ortalarına kadar tıp biliminde temel eser olarak okutulmuştur. Kannabis geleneksel tıp da 50 temel bitkiden birisidir ve geniş bir kullanım yelpazesi vardır ²⁴.

Kannabinoidlerin, tıbbi olarak bazı hastalıklarda kullanımına örnek olarak; bronkodilatasyon etkisi ile astımda, antiemetik etkisi yönüyle antikanser ilaçların oluşturduğu bulantı kusmada, iştah açıcı özelliğinden dolayı antiviral ilaçlar, aids ve ilişkili hastalıklarda ve terminal kanser olgularında, analjezik etkileri nedeniyle kanser ağrılarında postoperatif ağrılarda, fantom ağrılarda, göz içi basıncını düşürmesi nedeniyle glokomda, kas zayıflığında azalma etkisi yönünden multipl skleroz, serebral palsy, spinal kord hasarlarında kullanılması verilebilir^{24,25}.

2.1.2. THC'nin Yapısı ve Farmakolojisi

Kannabisin ana psikoaktif bileşeni olan THC ilk defa 1942 yılında Amerikalı kimyager Wollner tarafından THC'nin karışımı olarak izole edilmiştir²⁷. 1964 yılında da Gaoni ve Mechoulam tarafından yapısı aydınlatılmıştır²⁸. THC bir trisiklik 21 karbonlu yapı içerir. Uçucu, viskoz, yüksek yağ çözünürlüklü suda çözünmeyen bir bileşiktir. THC'nin pKa değeri 10.6'dır. Yapısında azot yoktur ve trans konfigürasyonunda iki tane kiral merkeze sahiptir²⁹ (Şekil 1).



Şekil 1: Tetrahidrokannabinolün (THC) kimyasal yapısı

THC genellikle ısıya maruz kaldığında kolay bir şekilde dekarboksile olan mono karboksilik asitlerin bir karışımı olarak bulunur. Havaya, ısıya veya ışığa maruz kaldığı zaman bileşenlerine ayrılır. Aside maruz kaldığı zaman kannabinole okside olabilir. THC cama ve plastiğe bağlanır. THC adsorbsiyonu, sililenmiş cam ile minimize edilebilir ve bazık bir çözelti veya organik çözücü ile korunabilir²⁹.

Kannabis genellikle ağızdan veya dumanı solunarak, 5-20 mg arasında değişen dozlarda uygulanır. Bu madde, halüsinasyon, zaman kavramında bozulma (temporal bozukluk), öfori ve sedasyon dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik etkilere sebep olabilir. Buna ek olarak THC hem benzodiazepin, opioid ve kannabinoid reseptörlerinde aktiviteye sahiptir hem de prostaglandin sentezi, DNA, RNA ve protein metabolizması üzerinde çeşitli etkiler ortaya koymaktadır. Günümüzde bu kannabinoid reseptörünün CB1 ve CB2 olarak iki tipinin varlığı gösterilmiştir. Bu reseptörler endojen kannabinoidlerin (endokannabinod) başlıca hedefidir. THC her iki kannabinoid reseptörüne de bağlanır^{24,30}.

CB1 ve CB2 reseptörlerinin her biri için spesifik antagonistler bulunmaktadır. CB-1 agonistlerinin birçok karakteristik etkisi, CB-1 reseptörünün MSS'deki dağılımıyla açıklanır. CB-1 reseptör agonistleri bilişsel, bellek ve motor fonksiyonlarına zarar verir. CB-1 reseptörleri periferik sinir uçlarından omurilik ve supraspinal merkeze doğru olan ağrı yollarında bulunması, bu kannabinoid reseptör agonistlerinin analjezik etkilerini açıklamaktadır²⁴.

Kannabinoid reseptörlerinin sinyal mekanizmaları incelendiğinde de benzerlikler dikkati çekmektedir. Esas olarak her iki reseptör de inhibitör G proteinleri olarak bilinen G_0 ve G_i ile kenetlidir. CB1 reseptörü uyarıldığında zaman inhibe edici G proteinleri aktive olur ve bunun sonucunda adenil siklaz inhibisyonu, mitojenle aktive protein kinazların (MAPK) aktivasyonu, voltaj kapılı kalsiyum kanallarının (L tipi ve T tipi Ca^{+2} kanalları) inhibisyonu ve potasyum kanallarının aktivasyonu meydana gelir. CB1 reseptörü belirli şartlar altında G_s ve $G_{q/11}$ ile de bağlanabilir. CB2 reseptörü uyarıldığında meydana gelen hücre içi sinyal mekanizmaları da oldukça benzerdir ancak CB2 reseptörünün iyon kanalları üzerindeki etkisi değişkendir^{31,32}. Önceki yıllarda CB1 reseptörlerinin sadece plazma membranında yerleştiği düşünülürken, yapılan yeni çalışmalar CB1 reseptörünün nöronal mitokondri gibi hücre içi yapılarda da lokalize olduğunu göstermiştir³³. CB1 reseptörleri santral sinir sisteminde daha çok bulunmaktadır ve serebellum, bazal ganglionlar, hipokampus, serebral korteks, hipotalamus, olfaktör sistem ile omurilikte yaygın olarak eksprese olmaktadır^{34,35}. CB1 reseptörü, daha çok glutamaterjik, gabaerjik, noradrenerjik, kolinerjik ve diğer nörotransmitterleri içeren santral ve periferik sinir sonlanmalarında bulunur ve sinaptik geçişi düzenler^{36,37}. Sinir sistemi dışında CB1 reseptörünün insanda prostat, over, uterus, timus, tonsiller, hipofiz, adrenal bezler, iskelet kası, yağ dokusu, akciğer, kalp, mide, kalın barsak, karaciğer, pankreas, safra kanalları, kemik iliği, lökosit ve nötrofil gibi birçok farklı dokuda az da olsa bulunduğu gösterilmiştir³⁸⁻⁴¹. CB1 reseptörü, periferik ve santral dağılımından da anlaşılacağı gibi anksiyete, stres, bağımlılık, öğrenme, bellek, yemek yeme, inflamasyon, ağrı gibi süreçlerde rol oynamaktadır^{31,37,42,43,44}.

İnsan promiyelositik lösemi hücre dizisinden üretilen ve tanımlanan CB2 reseptörünün splenik monosit/makrofajlarda da eksprese edildiği de gösterilmiştir. CB2 reseptörü de, CB1 reseptörü gibi G proteini ile kenetli reseptörler ailesi içinde yer alır ve transmembranal yerleşim gösteren tek bir polipeptid zincirinden oluşur⁴⁵.

Yapılan çalışmalar CB2'nin daha çok kannabinoidlerin periferik etkilerine aracılık ettiğini göstermiştir. CB2 reseptörü, tüm hematopoetik hücreler tarafından eksprese edilmesinin yanında, tonsiller, timus, adrenal bez, kalp, akciğer prostat, uterus, pankreas, over, testis gibi birçok dokuda bulunmaktadır³⁸⁻⁴⁰. CB2 reseptörünün santral sinir sistemindeki dağılımı ile ilgili farklı çalışma sonuçları olmasına rağmen CB1

reseptörüne kıyasla çok az miktarda da olsa hipokampus, amigdala, korteks, striatum, retina, serebellum gibi bölgelerde dağılım göstermektedir^{46,47}. Hematopoetik hücrelerde en yüksek oranda B hücrelerinde daha sonra doğal öldürücü hücrelerde bulunurken en az oranda T4 hücrelerde bulunur³⁹. CB2 tipi reseptörlerin, inflamatuvar yanıtın oluşmasında, immün sistemin düzenlenmesinde, nöron ve nöron dışı hücrelerin diferansiyasyonu, proliferasyonu ve migrasyonu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir^{45,48}. Geliştirilen sentetik kannabinoidlerin, endokannabinoidlerin ve doğal kannabinoidlerin CB1 ve CB2 reseptörlerine karşı selektiviteleri ve afiniteleri farklılık göstermektedir.

Bu reseptörler farklı hastalıkların tedavileri için yeni hedef moleküller gibi gözükmektedir ve bu alanda devam etmekte olan oldukça fazla sayıda klinik araştırma mevcuttur. Ancak kannabisle ilişkili moleküllerden çok azı ilaç olarak klinik kullanıma girebilmiştir. Kanser kemoterapisine bağlı bulantı kusmanın tedavisinde ve HIV ile ilişkili kaşeksinin tedavisinde dronabinol (Δ^9 -THC) onaylanmıştır. CB1/CB2 agonisti olan nabilon diğer antiemetiklerle yanıt alınmayan hastalarda kansere bağlı bulantı kusmanın tedavisi için onaylanmıştır. Δ^9 -THC ve kannabidiol kombinasyonu olan Nabiximols kansere bağlı ağrı tedavisinde ve multiple skleroza bağlı spastisitenin tedavisinde oral sprey formuyla klinik kullanıma girmiştir. Kannabidiol'un likit formu olan Epidiolex ise çocuklarda nöbet tedavisi için FDA'de (Food and Drug Administration) değerlendirmededir⁴⁹. Bu ilaçlara ek olarak; kannabidivarin, levonantradol, KN38-7271, Org 28611, GW842166X, S-777469 gibi reseptör agonisti moleküllerinde klinik araştırmaları devam etmektedir. CB1 antagonistleri rimonabant, surinabant, taranabant, otenabant, ibipinabant, drinabant'ın özellikle metabolik sendromun tedavisi için denendiği çalışmalar hala devam etmektedir. Taranabant ve surinabant'ın nikotin bağımlılığı için Faz II çalışmaları tamamlanmış durumdadır. Rimonabant obezite tedavisi için klinik kullanıma girmiş daha sonra istenmeyen yan etkileri nedeniyle (psikiyatrik ve nörolojik semptomlar) kaldırılmıştır^{50,51}.

2.1.3. Kannabinoidlerin Farmakokinetik Özellikleri

Kannabisin genel kullanım yolu olan dumanın inhalasyonu sayesinde, hızlı ve etkili olarak akciğerlerden beyine iletilir. THC'nin yaklaşık olarak %30'u yan akım dumanı ve piroliz nedeniyle kullanımı sırasında madde kaybı meydana gelir⁵². Biyoyararlanım, maddenin izmarit kısmında kalmasından ve sigarayı içerken dumanının havaya karışmasından dolayı daha da azalır. Çevreye yayılan dumandaki THC kaybının ise %40 - %50 arasında olduğu rapor edilmiştir. THC akciğerlere ulaştığında hızla emilir. THC ve metabolitleri özellikle lipoproteinler olmak üzere %95-99 oranında plazma proteinlerine bağlanır. Kannabis sigarası içildikten sonra, THC hızlıca dokulara dağıldığı ve karaciğerde metabolize edildiği için plazma konsantrasyonu düşer. Kannabis sigarasından çekilen ve dışarı üflenen ilk dumanın ardından kanda THC saptanabilir, 3 ile 8 dk sonra plazmada pik yapan, 100 ile 200 ng/mL arasında THC konsantrasyonları gösterilmiştir⁵².

Vücuttaki dağılımı, maddenin yüksek lipofilikliğine uygun olarak gerçekleşir. Plazmadan kannabinoid reseptörlerinin bulunduğu hedef dokulara hızlıca geçer. Psikotropik etkileri saniyeler ile dakikalar arasında başlar, 15-30 dakikada maksimum noktaya ulaşır ve 2-4 saatte yavaş yavaş azalır. Oral yolla alındığında, sindirim sisteminden kannabinoidlerin emilimleri daha yavaştır ve ilerleyen zaman içerisinde daha düşük plazma konsantrasyonları oluşturur.

Sigara olarak kullanımının ardından THC'nin biyoyararlanımı için kaydedilen değerler %18-50 arasında değişmektedir. İnhalasyon şeklinde kullanım ve intravenöz uygulamalardan elde edilen THC plazma konsantrasyonu-zaman eğrileri paralellik gösterir ancak inhalasyon şeklinde kullanımda daha düşük konsantrasyonlar elde edilir. Oral kullanımda ise THC konsantrasyonlarının düşük olduğu ve düzeylerinin yüksek değişkenlik gösterdiği gösterilmiştir²⁴.

THC, büyük bir dağılma hacmine sahiptir (10 L/kg). %97-99 plazma proteinlerine özellikle de lipoproteinlere bağlanır. Beyin gibi yüksek perfüzyona sahip organlarda hızlı bir şekilde dağılır. Yağ dokuları gibi düşük perfüzyona sahip dokuların içinde çok daha yavaş dağılır. Terminal eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 1 gündür. Ancak 3-13 gün arasında değişebildiği rapor edilmiştir^{24,30}.

THC'nin eliminasyonunda metabolizması çok önemlidir. Kannabinoidlerin metabolik yolu karmaşıktır. Sadece THC için 100'den fazla metabolit tanımlanmıştır. Kannabinoidler temel olarak karaciğerde metabolize edilir, fakat beyin, akciğer ve bağırsaklar gibi diğer dokularda da biyotransformasyona uğrayabilirler. İnsanlarda metabolizma basamağı; alilik oksidasyon, epoksidasyon, alifatik oksidasyon, dekarboksilasyon ve konjugasyon evrelerini içerir. Δ^9 -THC'nin biyotransformasyonu ile mono-, di- ve tri-hidroksi metabolitleri oluşur. Daha sonra oksidasyona uğrayarak asit, karbonil bileşikler ve onların hidroksi türevleri meydana gelir^{24,52}.

Aktif iki ayrı mono hidro metaboliti olan "11 hidroksi(OH)-THC ve 8-betahidroksi THC" için; 8-OH daha az etkili potansiyele sahipken, 11-hidroksi-THC, THC'ye benzer aktivite ve eğilim göstermektedir. Δ^9 -THC'de bulunan tekli doymamış sikloheksil halkasındaki alilik karbon atomunun, hepatik CYP 450 enzim sistemi tarafından hidroksillenmesiyle 11-Hidroksi- Δ^9 -THC oluşur³⁰. Bu metabolit Δ^9 -THC'nin farmakolojik olarak aktif temel metabolitidir. Kannabisin inhalasyon yoluyla alındığında, oral yolla alınmasına göre daha düşük 11-Hidroksi- Δ^9 -THC plazma konsantrasyonu saptanmıştır. CYP 450 2C9, 2C19 ve 3A4 enzimleri, Δ^9 -THC'nin oksidasyonunda görev almaktadır. 11-Hidroksi- Δ^9 -THC'nin oksitlenmesiyle inaktif metabolit olan 11-Nor-9-Karboksi- Δ^9 -THC meydana gelir⁵².

Tek doz THC alındıktan sonra 72 saat içerisinde yaklaşık dozun %70'i metabolize olur ve %30'u idrarla %40'ı dışkıyla atılır. Bu yüzden THC metabolitlerinin yeniden enterohepatik sirkülasyonu oluşabilir. Değişmeyen THC idrar içinde düşük miktarda bulunur. İdrar metabolitlerinin geri kalanı, THC'nin karboksilli asit konjugatları ve tanımlanamayan asidik ürünlerinden oluşmaktadır³⁰.

Kannabisin akut etkileri arasında en muhtemel davranışsal etki, bellek işlevlerindeki bozulmadır. Dikkat ve motor işlevlerinde, bellek işlevlerine göre daha az azalma olduğu rapor edilmiştir. Kronik kullanıcılarının algısal-motor becerileri, dikkatleri, sayısal-sözel becerileri, öğrenme ve hafızalarında azalma olduğunu tespit edilmiştir²⁴.

2.2. Sentetik Kannabinoidler

2.2.1. Sentetik Kannabinoidlerin Tarihçesi

Esrarın içerisinde bulunan Δ 9-THC ve psikoaktif etkiye sahip diğer kannabinoidler bu etkilerini CB1 ve CB2 reseptörleri üzerinden göstermektedir. Kenevir bitkisinden esrarın ana etken maddesi THC'nin 1964 yılında izole edilmesiyle, bu reseptör üzerine etkili maddeler üzerindeki araştırmalar artmış ve kannabinoidlerin farmakolojik ve toksikolojik etkilerini incelemek amacı ile sentetik kannabinoid türevleri geliştirmeye başlanmıştır. Bunu takiben, kannabisin medikal olarak kullanımı için biyomedikal alanda yapılan araştırmalarda Δ 9-THC'nin analogları sentezlenmeye başlanmıştır. Genel olarak sentetik kannabinoidler, vücutta çeşitli yanıtlara neden olan CB-1 ve CB-2 kannabinoid reseptörlerini etkileyen çok geniş bir madde grubudur^{53,54}.

Sentetik kannabinoidler 2004'ten bu yana piyasada bulunmaktadır. Yasal kısıtlamalardan kaçmak amacı ile "sokak kimyagerleri" tarafından esrar benzeri etkinlik gösteren bu psikoaktif maddelerin "merdiven altı" üretimi yapılmaya başlanmış ve sentetik kannabinoid türevleri "yasal kafa yapıcı maddeler" (legal highs), "tasarım maddeler" (designer drugs), "bitkisel kafa yapıcı maddeler" (herbal highs), "araştırma kimyasalları" (research chemicals), "yeni esrar" (the new marijuana), "bitmeyen hikaye" (a never ending story) gibi isimlerle internet üzerinden satışa sunulmuştur^{54,55}.

Sentetik kannabinoid preparatlarının çoğu kannabis bitkisinde bulunan Δ 9-THC'e benzer psikoaktif özelliklere sahip birkaç sentetik kannabinoidin bir karışımı ile bağlanan inert bitki materyallerinden oluşmaktadır. Sentetik kannabinoidler saf halde, katı veya yağ olark bulunmaktadır. Sentetik kannabinoidler bir solventte çözüldükten sonra, bitkisel karışıma püskürtülür. Solvent buharlaştıktan ve bitkisel karışım tekrar kuruduktan sonra paketlenir. Sentetik kannabinoid içeren bu bitkisel karışımlar genelde 3 gramlık ürün içerecek şekilde paketler satılmaktadır. Bitkilere püskürtülerek piyasaya sunulan bu maddeler genel olarak "K2", "Spice", "Bonzai" olarak bilinmekte iseler de çok daha çeşitli şekil ve isim altında başta internette, marketlerde rahatlıkla pazarlanmaktadır. Paket etiketleri üzerinde açıkça " insan kullanımı için değildir", "tütsü" veya "sadece aromaterapi kullanımı için" gibi yazılar içermelerine rağmen

tamamen kişisel tüketim amacı ile yasadışı olarak üretilmektedirler^{54,55}. Ürünler bir veya daha fazla sentetik kannabinoid içerebilir. Paketlerin üzerinde genellikle inert olarak nitelendirilebilecek bitkisel bileşenlerin ve daha seyrek olarak da doğal psikoaktif alkaloidleri içeren bitkilerin isimleri yazmaktadır. Herhangi bir resmi düzenleme olmaması nedeniyle aktif farmakolojik maddeler paketlerin üzerinde bulunmamaktadır. Sentetik kannabinoid ürünlerinde, yağlı asitler ve esterleri (linoleik asit, palmitik asit), amit yağlı asitleri (oleamid, palmitoylethanol amide), bitki kaynaklı asitler (eugenol, imol ve asetil vanillin gibi aromalar), koruyucular (benzil benzoat), katkı maddeleri (alpha-tocopherol) ve β 2-adrenerjik agonist clenbuterol bulunduğu gösterilmiştir. 2004 yılından bu yana, K2 ya da Spice gibi markalar altında marketlere sürülmüş bu ürünler, standartlaştırılmış madde testlerindeki düzenleme ve tespitten kaçmak için, farmakolojik olarak aktif kannabinoidlerle birlikte üretilmektedir. Bu koşullarda analiz stratejileri, sentetik kannabinoid ürünlerinde tipik olarak bulunan psikoaktif bileşenlerin saptanmasının önemini artırmaktadır. Sentetik kannabinoidlerin “Spice” olarak adlandırılan bitkisel bir karışımda saptanması ise 2008 yılında olmuştur^{54,56}. Yapılan analizler, kannabinoid bileşenlerinin ve dozajların aynı ambalaj içindeki ürünler ve partiler arasında büyük oranda değişiklik olduğunu göstermiştir^{24,57}.

2.2.2. Sentetik Kannabinoidlerin Yapıları ve Sınıflandırılması

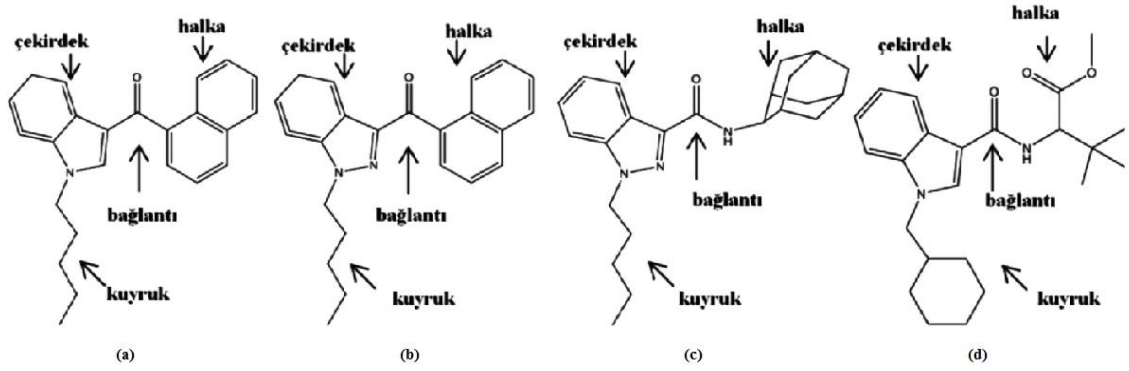
Günümüzde, John W.Huffman’ın adını verdiği kannabinoidlerin JWH serisi, Spice’ta teşhis edilen tartışmasız dominant kannabinoidlerdir. JWH-018 (1-pentil-3-(1-naftoil) indole), kolaylıkla sentezlendiğinden ve yüksek farmakolojik aktiviteye sahip olduğundan, kötüye kullanılan ve büyük ihtimalle seçilen ilk kannabinoidlerden biriydi⁵⁸. JWH bileşenlerine ek olarak, Spice’ta teşhis edilen diğer kannabinoidler, 1960’larda Hebrew Üniversitesi’nde geliştirilen klasik kannabinoidler HU-210’u içerir. 1970’lerde ise Pfizer “CP” yani siklohekzilfenoller olarak bilinen Δ 9-THC analoglarını sentezlemiştir. Siklohekzilfenollerin türevleri ve birçok alkil homologları geliştirilmiştir. Bunlara CP-50,556-1, CP-47,497 örnek olarak verilebilir. HU-210 yapısal olarak Δ 9-THC’ye çok benzer fakat daha güçlüdür. HU-210 sentezlenmesinin daha zor olduğu bildirilmiştir. CP-47,497 sentezlemenin daha kolay olduğu, prototip yan ürünü CP-55,940 gibi CB1 reseptörlerinde tam agonistik aktiviteyi sürdürdüğü

bildirilmiştir. Alexandros Makriyannis tarafından sentezlenen diğer indole kannabinoidlerde (“AM” bileşenleri) birçok Spice ürününde gösterilmiştir^{24,54,59}.

Sentetik kannabinoidler; kimyasal yapılarındaki küçük farklılıklara rağmen 20-26 karbon atomu içeren küçük molekül, yağda çözünür, apolar ve oldukça uçucu olan bileşiklerdir. Sentetik kannabinoidlerin kimyasal yapılarına dayanarak yapılan sınıflama; klasik kannabinoidler, klasik olmayan kannabinoidler, eikozanoidler, aminoalkilindoller ve diğerleri olarak alt gruplara ayrılmıştır.

Klasik kannabinodler (örn. HU-210), bir dibenzopiran halkasına dayanan, yapısal olarak Δ^9 -THC’ye benzemektedir. Klasik olmayan kannabinoidler, sikloheksilfenol (CP) serisi (örn. CP-47,497) yapısal olarak THC’ye benzemez. Eikozanoidler anandamidin bir sentetik analogu olan A35 olarak bilinen metanandamid gibi endokannabinodlerin sentetik analoglarıdır. Aminoalkilindoller (AAIs) naftoilindoller, fenilasetilindoller ve benzoilindoller içeren alt gruplara ayrılabilirler. Sentetik kannabinodlerin son grubu, indazol karboksamit (örn. APINACA) gibi diğer yapısal tipleri kapsayan “diğer” gruptur. SK’lerin analogları alkil zincirlerinin düzenlenmesi veya uzunluğunun değiştirilerek modifiye edilmesiyle sentezlenebilir. Değişiklikler aromatik halkaya bir alkil, alkoksi, halojen veya başka sübstitüentlerin eklenmesiyle de yapılabilir⁷.

Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı Ofisi (United Nations Office On Drugs and Crime, UNODC), 2008-2016 yılları arasında üye 65 ülkesinden toplam 240 adet farklı sentetik kannabinoid raporlamıştır. 2008 yılından itibaren ortaya çıkan sentetik kannabinoidler, yasal düzenlemelerden kaçmak amaçlı sürekli yapısal değişikliğe uğramıştır. Sentetik kannabinoidlerin kimyasal yapısının daha kolay anlaşılması için Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığını İzleme Merkezi (The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, EMCDDA) tarafından ana yapı için dört farklı yapıda bileşik içeren model örneği oluşturulmuştur⁶⁰. Sentetik kannabinoidler çok çeşitli kimyasal moleküllerden oluşur, ancak ortak özellikleri kannabinoid reseptörlerine bağlanma yeteneğidir. Bununla birlikte, sentetik kannabinoidlerin çoğunluğunun yapısı çekirdek (core), bağlantı bölümü (linker), halka/sübstitüentler (linked group) ve kuyruk (tail) bölümü olarak dört temel parçadan oluşur (Şekil 2)^{60,61}. Bu kimyasal yapıyı isimlendirirken sırasıyla önce bağlantı grup, kuyruk, çekirdek ve bağlayıcı yapı söylenir⁷.

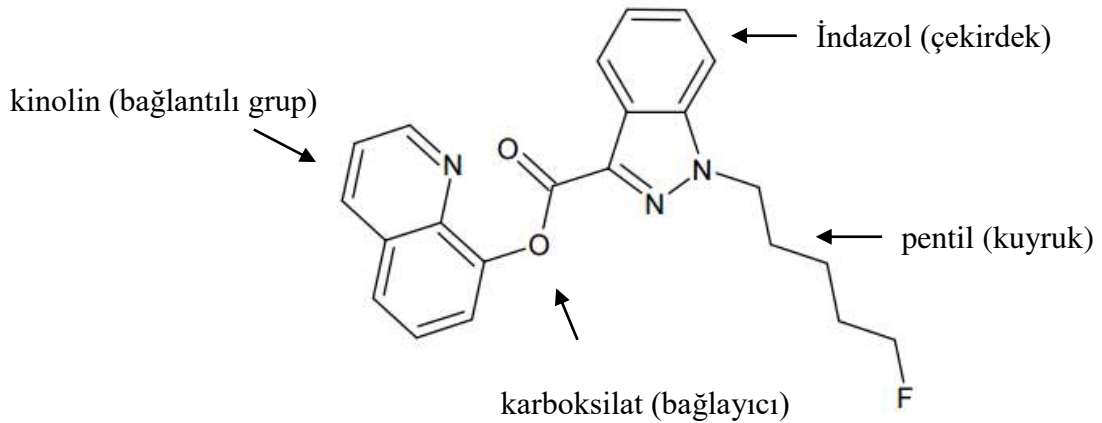


Şekil 2: Sentetik kannabinoidlerin dört kimyasal ana yapı olarak gösterilmesi⁶¹.

- a) JWH-18 (çekirdek: indol, bağlantı: metanon, halka: naftil, kuyruk: bütül)
- b) THJ-18 (çekirdek: indazol, bağlantı: metanon, halka: naftil, kuyruk: bütül)
- c) AKB-48 (APINACA) (çekirdek: indazol, bağlantı: karboksamid, halka: adamantil, kuyruk: bütül)
- d) MDMB-CHMICA (çekirdek: indol, bağlantı: karboksamid, halka: metoksikarbonil, kuyruk: sikloheksilmetil).

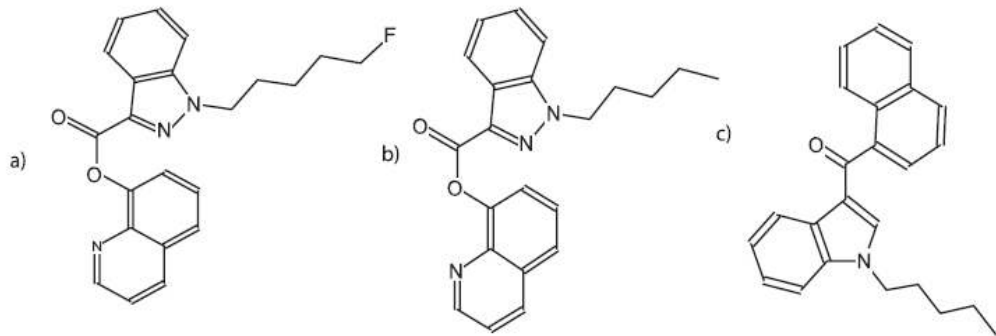
2.2.3. Sentetik Kannabinoidlerden 5F-NPB-22 Maddesinin Yapısı

Yeni tasarım psikoaktif maddelerden 5F-NPB-22'nin (1- (5-floropentil) -8-kinolinil ester-1H-indazol-3-karboksilik asit) kimyasal yapısı Şekil 3'te verilmiştir.



Şekil 3. 5F-NPB-22'nin (1-(5-floropentil)-8-kinolinil ester-1H-indazol-3 karboksilik asit) kimyasal yapısı

5F-NPB-22, yapısal olarak NPB-22'ye benzeyen, indazol grubuna ait sentetik bir kannabinoiddir. Saf 5F-NPB-22, kristal form alır ve metanol, etanol, toluen, DMSO (dimetil sülfoksit) veya DMF (dimetilformamid) gibi yaygın organik çözücülerde çözünür. Son bahsedilen iki çözücüdeki çözünürlük 10 mg /ml'dir. 5F-NPB-22'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri hakkında, görünüşü, çözünürlüğü ve molekül ağırlığı dışında bilgi bulunamamaktadır. NPB-22 ve 5F-NPB-22 arasındaki yapısal benzerlikler nedeniyle, bu bileşiklerin farmakolojik aktivitesi, büyük ölçüde bilinmemekle birlikte benzer olmalıdır. NPB-22, JWH 018'in yapısal bir analogudur, bu nedenle her iki bileşiğin de benzer etki mekanizması sergilediği sonucuna varılabilir (Şekil 4). JWH-018, Δ^9 -THC (Δ^9 -tetrahidrokanabinol) ile karşılaştırıldığında CB1 reseptörü için afinite sabitleri K_i $9,00 \pm 5,00$ nM ve CB2 reseptörü için K_i $2,94 \pm 2,65$ nM olan kannabinoid reseptörlerinin güçlü bir antagonistidir. CB1 ve CB2 reseptörü için sırasıyla 4 kat ve 10 kat daha yüksek afiniteleri nedeniyle, JWH-018 daha güçlü psikoaktif özellikler sergiler. Ancak, etki süresi daha kısadır (yaklaşık 1-2 saat)⁶².



Şekil 4. a) 5F-NPB-22'nin b) NPB-22'nin c) JWH-18'in kimyasal yapısı⁶².

Hill ve ark. indazol karboksilat bileşiği olan 5F-NPB-22'nin sentezlenmesine yönelik, genel bir sentetik yolun kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Bu nedenle, piyasada bulunan 1H-indazol-3-karboksilik asiti standart koşullar altında Fisher esterleştirilmesi ile ilgili metil karboksilatları oluşturmuşlardır. 1-(5-Fluoropentil)-1H-indazol-3-karboksilik asit (120 mg, 0.480 mmol) CH_2Cl_2 (3.7 mL) içinde çözüp, tamamen eriyene kadar damla damla (dimetilformamid) DMF eklemişlerdir. Daha sonra oda sıcaklığında 8-Hidroksikinolin (97 mg, 0.672 mmol), ardından (1-Ethyl-3-(3-

dimethylaminopropyl)carbodiimide) EDC.HCl (160 mg, 0.835 mmol) ve (4-Dimethylaminopyridine) DMAP (3.0 mg, 0.02 mmol) eklemişlerdir. Reaksiyon karışımını 18 saat oda sıcaklığında karıştırmışlar ardından H₂O (10 ml) içine dökmüşlerdir. CH₂Cl₂ (3x20 mL) ile ekstrakte edilmiş, tuzlu su (10 mL) ile yıkanıp, kurutulmuş (MgSO₄), süzölmüş ve vakum altında çözücünden uzaklaştırılmıştır. Kromatografik ayırmada [silika; petrol-EtOAc (100:0)→(40:60)] uçuk sarı bir katı olarak 5F-NPB-22'yi (125 mg, %69) sentezlemişlerdir⁶³.

2.2.4. Sentetik Kannabinoidlerin Farmakolojik ve Toksikolojik Özellikleri

SK'ler ve Δ9-THC arasındaki farmakolojik benzerliklerin karşılaştırılması, bilim adamları arasında büyük ilgi gören bir konu olmuştur. Bununla birlikte, SK'lerin ayrıntılı farmakolojisi ve toksikolojisi hakkında çok az şey bilinmektedir ve az sayıda insan çalışması yayınlanmıştır. SK alımıyla ilişkili potansiyel riskler göz önüne alındığında, klinik ve adli vakalarda tüketimi belgelemek için farmakodinamik ve farmakokinetik çalışmalara ihtiyaç vardır⁶⁴.

2.2.4.1. Sentetik Kannabinoid Reseptör Agonistleri ve Antagonistler

Kannabinoidlerin lipofilik doğası nedeniyle, başlangıçta bu bileşiklerin hücre zarını spesifik olmayan bir şekilde kırarak birçok biyolojik etki gösterdiği düşünüüyordu. Bununla birlikte, Δ9-THC'nin keşfedilmesinden ve ardından kimyasal olarak sentezlenmiş birkaç kanabinoidin ortaya çıkmasından sonra, beyindeki kannabinoid bağlanma alanlarının başarılı bir şekilde haritalanması ve farmakolojik karakterizasyonu ile CB1 ve CB2 olarak adlandırılan iki kannabinoid reseptörü tanımlanmıştır. Bunlar adenil siklaz aktivitesini baskılayan G proteinine bağlı reseptörlerdir^{64,65}.

SK'ler, hem CB1 hem de CB2 reseptörlerinde daha yüksek bağlanma afinitesi sergileyen yapısal özelliklere sahip maddeler olarak adlandırılır. Çeşitli çalışmalar, Δ9-THC'nin CB1 reseptörünün güçlü bir aktivatörü olduğunu, psikoaktif olmayan CBD'nin CB1 veya CB2 reseptörlerine doğrudan bağlanmadığını bildirmiştir; bunun yerine, her iki tür reseptörü de uyarır. Bu gerçeğe rağmen, CBD, CB1 reseptörünün doğrudan

blokajı yoluyla $\Delta 9$ -THC'nin etkisini modüle eder. Bu modülasyon, anksiyete, disfori, panik reaksiyonlar ve paranoya gibi $\Delta 9$ -THC tüketiminden kaynaklanan istenmeyen yan etkilerde bir azalmaya yol açar ve ayrıca $\Delta 9$ -THC terapötik aktivitesini iyileştirdiği bilinmektedir^{66,67}. Çoğunlukla agonist ve antagonist kannabinoidlerin bir karışımını içeren esrarın aksine, sentetik kannabinoid bileşikler, seçiciliklerinde, potenslerinde ve işlevlerinde farklılıklar gösterirler. $\Delta 9$ -THC'den daha güçlü ve etkili kannabinoid reseptör agonistleri olarak işlev gösterirler^{68,69}. Ayrıca, bu sentetik maddeler, aksi takdirde $\Delta 9$ -THC'nin psikoaktif özelliklerini etkisiz hale getirebilecek CBD gibi kannabinoidlerden yoksunlardır.

CB1 reseptörünün aktivasyonu, hücresel siklik adenosin monofosfat (cAMP) seviyelerini azaltır ve kannabimimetik yanıtları ortaya çıkarır. SK agonistleri, voltaj kapılı iyon kanalları ile etkileşime girer ve membran potansiyellerini azaltarak potasyum, sodyum ve kalsiyum kanallarını inhibe eder⁷⁰.

Kannabinoid reseptörlerinin karmaşık molekül yapısı, tek bir reseptörün birden fazla bileşik sınıfını tanımasına izin verir. Çok çeşitli kimyasal yapılar nedeniyle, SK'ler, kannabinoid reseptörlerinin her ikisine de çeşitli bağlanma dereceleri ile bağlanırlar. Dahası, birçok SK, farmakolojik potenslerinde farklılık gösterebilen kiral merkezler ve stereoisomer formları sunar⁷¹. SK'lerin kenevir benzeri biyoaktivitesi çoğunlukla JWH-210, HU-308 ve WIN55,212-2 gibi CB1'de agonist olmasından kaynaklanmaktadır. Ek olarak, bu psikoaktif maddeler ayrıca kenevir benzeri etkiler üretmeden kannabinoid reseptörlerine bağlanma yeteneğine sahiptir^{72,73}.

Bitkisel ürünlerde tespit edilen SK'lerin çoğu, CB1 reseptöründe $\Delta 9$ -THC'den daha yüksek afinite ve daha düşük inhibitör sabit (K_i) değerlerine sahiptir. CB1 ve CB2 reseptörleri için SK afiniteleri, tritiatlı kannabinoid reseptör ligandları ve beyinden (CB1 bakımından zengin), dalaktan (CB2 bakımından zengin) elde edilen membranlar kullanılarak veya CB1 veya CB2 reseptörleri ile transfekte edilmiş kültür hücreleri kullanılarak deney olarak belirlenmiştir⁶⁴.

Kötüye kullanım ilacı olarak kullanılan bileşiklerin çoğu, hem CB1 hem de CB2 reseptörü için 1 ila 10 nM veya 10 ila 100 nM aralığında K_i 'ye sahiptir. SK'lerin endojen kannabinoid reseptörlerine daha yüksek afinitesi, doğal kenevire göre daha güçlü bir etki yaratır⁶⁵. JWH bileşiklerinin ailesi çok sayıdadır ve kimyasal yapıları $\Delta 9$ -THC'nikilerden büyük ölçüde farklı olsa da, CB1 ve/veya CB2 reseptörlerine karşı daha

yüksek bir afiniteye sahiptirler ve Δ^9 -THC'den daha etkilidirler⁷⁴. JWH-018, CB1 reseptörleri için dört kat afiniteye ve CB2 reseptörleri için 10 kat afiniteye sahipken, JWH-015, CB2 için CB1'e göre 28 kat daha yüksek olan seçici bir CB2 reseptör agonisti olarak işlev görür⁷⁵.

İn vitro deneyler, seçici agonistler JWH-015, JWH-133 ve HU-308 ile karışık CB1–CB2 reseptör agonistleri WIN55,212-2 ve HU-210'un, Alzheimer hastalığında bilişsel bozukluğu ve nöronal kaybı önleyen toksik A β peptidinin farklı türlerine maruz kalan mikrogial hücre kültürlerinde pro-inflamatuvar sitokinlerin salınımını azalttığını göstermiştir^{64,76}.

Çoğu SK'nin insanlardaki farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerine dair çok az şey bilinmektedir. Lipofilik olan bu moleküller, büyük olasılıkla yüksek dağılım hacmine sahiptir ve kronik kullanım sonrasında vücudun yağ içeren kompartmanlarında depolanırlar⁶⁵.

2.2.5. Sentetik Kannabinoidlerin Farmakokinetiği

Bazı maddeler kontrol edilirken, yeni nesil SK'ler yasadışı uyuşturucu doldurmakta ve yapılarındaki hafif bir değişiklik ile daha yüksek etki ve verimlilikle sonuçlanmaktadır⁷⁷. Ayrıca her bitki karışımında birden fazla madde türünün bulunması ve zamanla diğer maddelerin eklenmesi, en deneyimli kullanıcının bile ne tükettiğini bilmemesine neden olmaktadır. Sonuç olarak, istenen öfori etkisini elde etmek için daha yüksek dozlara ihtiyaç duyulmaktadır ve bu nedenle, aşırı doz nedeniyle öngörülemeyen biyolojik etkiler ve zehirlenmeler gerçekleşmektedir^{78,79}.

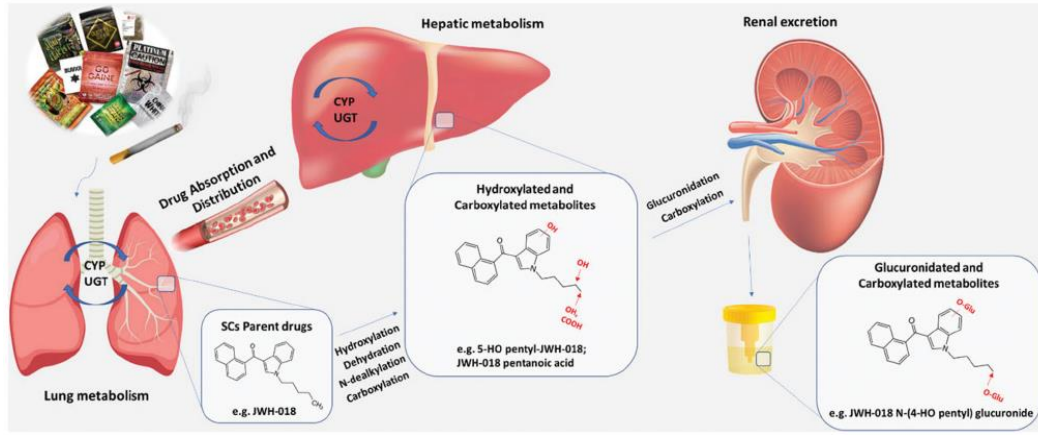
Adli toksikolojide, SK'lerin farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin açıklığa kavuşturulması, zehirlenmiş bireylerden, özellikle de ölümden sonra elde edilen analitik sonuçların yorumlanması açısından önemlidir⁷⁹. Örnekler maddeyi alma zamanına yakın bir zamanda toplanırsa, SK'ler insan kanında ve/veya oral sıvıda tespit edilebilir. Karinen ve ark., uyuşturucu etkisi altında araç kullanan kişilerden toplanan tam kan örneklerinde ilk kez APINACA, 5F-APINACA, UR-144 konsantrasyonlarını rapor etmiş ve değerleri diğer SK'ler için daha önce bildirilen konsantrasyonlarla karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak, yazarlar, farklı olgulardan elde edilen sentetik kannabinoid konsantrasyonları hakkında daha fazla rapora ihtiyaç olduğuna dikkat

çekmişlerdir. Olgularda belirlenen konsantrasyon aralıkları ve konsantrasyonları bilgisi, uygun analitik yöntemlerin oluşturulmasına ve olası tehlikeli konsantrasyon aralıklarının değerlendirilmesine yardımcı olabilir^{64,80}.

İdrar, noninvaziv toplama, yeterli numune, daha yüksek ilaç konsantrasyonları ve kan veya oral sıvıdan daha uzun süre tespit edilebilme nedeniyle uyuşturucu testi için en yaygın matristir⁸¹. Bununla birlikte, SK'lerin kapsamlı metabolizması nedeniyle, ana bileşikler idrarda nadiren görülür, bunun yerine metabolitleri ağırlıklı olarak atılır ve bu son bileşikler başlangıçta bilinmediğinden tespiti zorlaştırır^{82,83}. Vücut sıvılarının analizi büyük ölçüde ana ilacın tespitine dayanır ve ana ilaç metabolize edildikten sonra ilacın tüketimi metabolitlerle ilgili veriler olmadan kanıtlanamaz⁶⁵. Ayrıca doza ve alındıktan sonraki süreye bağlı olarak kanda metabolitler bulunabilir⁶⁴.

SK'ler genelde sigara şeklinde içilse de buhalaştırma, oral ya da rektal yol ile kullanım da bildirilmiştir. Parenteral yolla kullanımı ise henüz bildirilmemiştir. İçildikten hemen sonra akciğerlerden absorbe edilmesi ve kısa sürede beyin gibi diğer organlara tekrar dağılımın gerçekleşmesiyle SK'lerin etkinliği genelde bir kaç dakika içinde başlar. Ancak oral kullanım sonrasında, gıda alımına, sindirim aktivitesine ve ilk geçiş etkisindeki değişikliklere bağlı olarak etkinin başlamasında bir gecikme olabilir. Lipofilik olan bu moleküller, büyük olasılıkla yüksek dağılım hacmine sahiptir ve kronik kullanım sonrasında vücudun yağ içeren kompartmanlarında depolanırlar⁶⁵.

"Bitkisel ürünlerde" bulunan SK'lerin çoğunun metabolizmalarıyla tam olarak karakterize edilmemiş olsa da, kapsamlı oksidatif metabolizmayı gösteren birkaç yol gösterici veriler mevcuttur. Son bulgulara göre, SK'ler faz I ve faz II biyotransformasyon reaksiyonları ile büyük ölçüde metabolize edilirler. Bu maddeler öncelikle sitokrom P450 enzimleri (CYP) ile oksitlenir, burada oksitlenmiş metabolitler oluşur ve daha sonra ikinci bir metabolik faz için substrat olarak hizmet eder, yani UDP-glukuronil transferaz (UGT) adı verilen bir enzim sınıfı tarafından glukuronidasyon ve/veya sülfasyon basamakları ve son olarak böbrek atılımı gerçekleşir. Şekil 5 'te, CYP ve UGT enzimleri tarafından üretilen ana metabolitlerle SK'lerin emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımı hakkında şematik bir özet gösterilmektedir⁶⁴.



Şekil 5. SK'lerin emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımının şematik özeti⁶⁴.

Genel olarak, oksidatif metabolizmada mono-, di-, ve tri-hidroksilasyon, karboksilasyon ve N-dealkilasyon bileşikleri oluşmaktadır. Hidroksilasyon işlemi alifatik zincir, indol, naftalen veya ikincil olarak karboksilik asitlere metabolize edilebilen ve daha sonra glukuronik aside konjuge edilebilen aromatik halkalarda gerçekleşir^{81,83-85}.

SK metabolizmasının ilk raporları 2000'lerin başında yayınlanmıştır ve WIN-55,212-2⁸⁶, AM-630⁸⁷ ve JWH-015'in⁸⁸ gibi sentetik bileşenlerin in vitro metabolizmasına odaklanmıştır. Ancak, JWH-018'in eğlence amaçlı bir ilaç olarak popülaritesi, kısa süre sonra insan in vivo metabolizmasını ön plana çıkarmıştır. Sobolevsky ve ark., ardışık kütle spektrometresi ile birlikte gaz ve sıvı kromatografisi kullanarak idrarda iki ana JWH-018 monohidroksilli metabolit tanımlamışlardır⁸⁹. Chimalakonda ve arkadaşlarının (2012) in vitro çalışmalarında olduğu gibi, JWH-018 metabolitlerinin neredeyse tamamen glukuronid konjugatları olarak atıldığı gözlenmiştir⁹⁰. Toennes ve ark. (2017), JWH-018'in olumsuz etkilerini değerlendirmek için bir pilot çalışma gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmada, JWH-018 ve metabolitlerinin farmakokinetik özellikleri, 2 ve 3 mg kannabinoidin kontrollü inhalasyonundan 12 saat sonra alınan kan örnekleri kullanılarak belirlenmiştir. Kandaki JWH-018 konsantrasyonları, inhalasyondan sonra dakikalar içinde maksimuma ulaşmış ve bunların zaman süreci, bir çok alanda dağılım/eliminasyon olduğunu göstermiştir. Aynı durum, konsantrasyon seviyeleri ana bileşikten on kat daha düşük olan kan numunelerinde tespit edilen altı kanabinoid metabolitiyle doğrulanmıştır^{64,91}.

2.2.6. Sentetik Kannabinoidlerin Etkileri

Sentetik kannabinoidlerin etkileri esrar benzeri olarak belirtilse de, klinik raporlar etkilerinin daha şiddetli olduğunu ve olumsuz durumların daha sık görüldüğünü göstermektedir. Yapı-aktivite ilişkisi analizleri bazı bileşimlerin kannabinoid reseptörler için daha yüksek etki ve benzerlik sergilediğini ortaya koymasına rağmen mevcut bilgiler bu bileşimlerin $\Delta 9$ -THC zehirlenmesi benzeri etkilerinin bir koleksiyonunu oluşturduğunu belirtmektedir. JWH-018, CP-55,940 gibi en kuvvetli kannabinoidlerden bazılarıyla rekabet eden ve $\Delta 9$ -THC'den yaklaşık 5 kat daha etkili bulunan maksimum etki yoğunluğuna sahip CB1 reseptörlerinde tam agonist olarak tanımlanmaktadır. Klinik durum verileri, mide bulantısından daha ciddi semptomimetik benzeri semptomlara ve psikoza kadar değişmektedir. Kannabinoidlerin, duygusal süreci, duygusal algıyı ve gelen duygusal bilginin elaborasyonunu güçlü bir şekilde etkilediği bilinen fizyolojik sürecin geniş spektrumu üzerinde etkileri vardır²⁴.

Kannabinoidler, GABA salınımını azaltarak ve hücre dışı glutamat ve dopamin seviyelerinin artırarak prefrontal korteks sinir fonksiyonunu modüle ederler. Bu kanıtlar göz önüne alındığında, SK'lerin uzun süreli kullanımının duygusal işlemede ve bilişsel işlevde önemli değişikliklere neden olabileceği varsayılabilir⁵⁴.

Akut etkileri anksiyete, ajitasyon, taşikardi, psikoz gibi psikiyatrik ve tıbbi etkileri bir arada gösterir. Bunları gösteren kişilerde dudak kuruluğu, baş dönmesi, baş ağrısı kaydedilen fizyolojik yan etkileridir. SK'ler ile ilgili acil tedavi gerektiren ciddi toksisite durumları akut böbrek yetmezliğini, nöbetleri ve miyokardiyal enfarktüsü içerir⁷.

2.2.7. Sentetik Kannabinoidlerde Toksikolojik Analiz Yöntemleri

Sentetik kannabinoid ürünlerinin sürekli değişen bileşimleri, bu yeni potansiyel uyuşturucu kullanımın ve istismarını tanımlamaktan sorumlu laboratuarlara önemli yükler yüklemektedir. 2011 yılında sentetik kannabinoidlerin ve/veya metabolitlerinin kullanıcının idrar örneklerinde standart laboratuvar testleriyle saptanamadığı bildirilmiştir^{24,73}.

Bu maddelerin hızlı ve etkili bir şekilde tespit edilmesini sağlayacak analiz yöntemlerinin geliştirilmesi, hem madde kullanımını teyit etmek hem de bu maddelerin farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri ile ilgili ileri testlerin yapılması için gereklidir⁶⁵. Madde kullanımını belirlemek için idrar, serum, kan, oral sıvı ve saç örnekleri kullanılmaktadır. Saç ve oral sıvıda ana madde analiz edilirken, idrarda metabolitleri saptanmaktadır^{64,92}.

Bugüne kadar vücut sıvılarının analizi büyük oranda ana maddenin tespitine dayandığından, ana madde bir kez metabolize olduktan sonra metabolitlerle ilgili yeterli veri olmadan madde kullanımı kanıtlanamaz⁹³. Bu nedenle, idrarda SK'lerin analizi için analitik metotlar geliştirilmeden önce, ana maddelerin başlıca metabolitleri tanımlanmalıdır^{65,92}.

Numune hazırlama, biyolojik numuneyi analitik araştırma için uygun bir forma dönüştürmek için analitik sürecin önemli bir aşamasıdır. Ekstraksiyon aşaması, numune hazırlama prosedürünün ana parçasıdır ve analiz süreci için iki önemli avantaj sunar. İlk olarak, bozucu matris bileşiklerini (proteinler, tuzlar ve fosfolipitler gibi) ortadan kaldırır. İkinci olarak, hedef ilaçları yoğunlaştırır, duyarlılığı artırır ve daha düşük tespit limitlerine ulaşır. Sıvı kromatografi-ardışık kütle spektrometrisinde (LC-MS/MS), endojen matris bileşenlerine bağlı olarak ilacın iyonizasyon sürecindeki bir değişiklik olan matris etkisini azaltmak için uygun numune hazırlama önemlidir. Matris etkileri, hedef ilacın MS yanıtını değiştirerek iyon artışı (sinyalde artış) veya baskılama (sinyal kaybı) ile sonuçlanarak yöntemin kesinliği, doğruluğu ve sağlamlığı üzerinde etkiye neden olabilir. Basit seyreltme, protein çöktürme, sıvı-sıvı ekstraksiyonu (LLE), katı faz ekstraksiyonu (SPE), destekli sıvı ekstraksiyonu (SLE) ve tuz ile fraksiyonlama ((Salting-out) SLLE), sentetik kannabinoidlerin ekstraksiyonu için kullanılan tekniklerdir⁹⁴.

Biyolojik numunelerde SK'leri ve metabolitleri incelemek için immünolojik testler (örneğin 'ELISA' (enzyme linked immunosorbent assays)) ve gaz kromatografi kütle spektrometresi (GC-MS), sıvı kromatografi/ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) gibi ayırma yöntemleri kullanılmıştır.

İmmünoassay, negatif numuneleri elimine etmek için ilk tarama testi olarak kullanılan hızlı bir tekniktir. Hızlı olmasına rağmen, düşük özgüllük gibi sınırlamaları vardır. Dahası, çapraz reaktivite ve yanlış pozitifler meydana gelebilir ve bu nedenle

toksikologlar, tüm pozitif immünolojik test bulgularının kromatografik analiz ile yeniden test edilmesi ve onaylanması gerektiğini tavsiye etmektedir⁹⁴. Gerçekten de, immünoassay yöntemlerle yapılan genel kannabinoid tarama testleri, bu sınıf bileşikler için yeterli özgüllükle tespit etmede etkisizdir.

Ayrıca, yeni geliştirilen sentetik kannabinoidler, referans materyallerin eksikliğinden dolayı kütle spektrometrisiyle (MS) birleştirilmiş gaz veya sıvı kromatografi (LC) kullanımına dayanan hedeflenen analitik prosedürlerle belirlenemez. Buna ek olarak, idrar analizleri, bu maddelerin hızla çok sayıda çoğu bilinmeyen veya henüz tam olarak karakterize edilmemiş metabolitlerine dönüştüğü gerçeğiyle daha da karmaşık hale gelmektedir. Bu nedenle, sentetik kannabinoidlerin yeni sentezlenmiş varyantlarını tanımlanmasında gereken zamanı büyük ölçüde azaltmak için yeni analitik prosedürlerin geliştirilmesi gerekli hale gelmektedir⁹⁵.

Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi (GC-MS), çoğu laboratuvar da biyolojik örneklerde kötüye kullanılan ilaçların ve miktarlarının belirlenmesi için yaygın olarak kullanılan bir ayırma tekniğidir. Bununla birlikte, GC-MS, analitlerin kütlelerinde yüksek alıkoyma ve sınırlama gibi bazı dezavantajlara sahiptir. Ayrıca, termal olarak kararsız olan bileşikler, GC enjeksiyon portunda ayrışabilir. Amino veya hidroksil grupları gibi polar bir fonksiyonel gruba sahip olan çoğu bileşik, madde ile kolon sabit fazı arasında analitin zayıf bir şekilde algılanmasına yol açan polar bir etkileşime neden olabilir. Bu problemlerin üstesinden gelmek için bu bileşiklerin ekstraksiyon aşamasında türevlendirme adımının eklenmesi gerekir. Türevlendirme, molekülün fonksiyonel gruplarını ve kimyasal özelliklerini değiştirerek bileşiklerin sabit faz ile daha az tepkimeye girmesi sağlanarak daha kararlı hale getirebilir. Türevlendirme ayrıca duyarlılığı ve özgüllüğü arttırmak, pikin şeklini iyileştirmek, polar bileşiklerin kuyruklanmasını azaltmak ve uçuculuğunu ve iyonlaşmasını arttırmak için kullanılır. Bununla birlikte, bu ekleme aşaması daha fazla zamana ve toksik reaktif kullanılmasına neden olabilir. Ayrıca, başka bir olası hata kaynağı da ortaya çıkarabilir. SK'ların analizinde, bileşiklerin tespit edilebilirliğini ve stabilitesini arttırmak ve analitik etkinliği arttırmaya yardımcı olmak için GC analizinden önce bir türevlendirme adımı içermesi önemlidir⁸.

SK'lar, aktif ve polar fonksiyonel gruplar içeren organik bileşiklerdir ve farklı türevlendirme reaktifleriyle reaksiyona girebilirler. Aslında SK'lar GC-MS analizi için

ideal bileşikler değildir çünkü bunlar nötr ila zayıf asidik bileşiklerdir ve yüksek moleküler ağırlığa sahiptirler. Bazı SK'lerin GC-MS kullanılarak analiz edilmesi çok zordur. Genel olarak, GC-MS'in duyarlılığı düşüktür, bu da biyolojik numunelerdeki özellikle kandaki SK'ların belirlenmesini zorlaştırır⁹⁴.

Sıvı kromatografi (LC), SK'lar ve bunların metabolitlerini içeren farklı tipteki biyolojik numunelerinin analizi için en popüler tekniktir. SK'ların analizinde, çoğu sıvı kromatografi kütle spektrometrisi (LC-MS) metodunda olduğu gibi, mobil fazın organik çözücüsü olarak metanol veya asetronitril yaygın olarak kullanılır. Asetik asit, formik asit veya bunların tuzları, esas olarak, duyarlılığı artırmak üzere iyonlaşmayı arttırmak için tampon katkı maddeleri olarak seçilir. C18 kolonları, SK'lar ve bunların metabolitlerinin sıvı kromatografi sırasında ayrılması için kullanılır.

LC'nin kütle spektrometrisi (LC/MS) ile kombinasyonu, maddeleri tanımlama için güçlü bir analitik araçtır. İkili kütle spektrometrisi (ardışık kütle spektroskopisi), SK'ların tespiti için daha çok tercih edilen bir cihazdır, çünkü maddelerin kimyasal yapıları hakkında tek kütle spektrometrisinden daha fazla bilgi sunmaktadırlar. Kütle spektroskopisi tespiti tam tarama, ürün iyon tarama modu, seçilmiş iyon izleme (SIM) ve çoklu reaksiyon izleme (MRM) ile gerçekleştirilebilir. Ancak tam tarama modu hassasiyeti azaltır ve bu düşük konsantrasyonlardaki analitler için yanlış negatif sonuçlara neden olabilir. SIM ve MRM modları hassasiyeti artırır, ancak bileşikler ve parçalanma modelleri hakkında bilgi sahibi olmak önemlidir⁹⁴.

Maalesef şu anda, yeni tasarın psikoaktif maddelerin tüketilmesinin tüm teşhisleri, kullanıcıların kendilerinin bildirdiği tıbbi geçmişi dayanmaktadır. Gerçekte, yeni tasarın maddelerin aktif içeriğinin büyük çeşitliliği, çoğu durumda saf standartlar, kromatografik alıkonma ve kütle spektrometrisi (MS) fragmentasyon ürünlerinin neredeyse hiç mevcut olmaması gibi durumlardan dolayı, maddelerin tanımlanmasını son derece zorlaştırmaktadır. Bu gerekçelerle, modern adli toksikolojideki mevcut analitik yöntemler, yani immünokimyasal teknikler ve tekli/üçlü kuadrapollü gaz veya sıvı kromatografisi, iyon tuzaklı MS gibi sistemler yetersizdir.

Bir çoğu uçuş zamanlı kütle spektrometresine (TOF MS) dayanan yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrelerinin (HRMS) yakın zamanda piyasaya sürülmesi, moleküler tanımlama için yeni kriterlerin belirlenmesine neden olmuştur. Bilinmeyen bir bileşiğin doğru moleküler kütlesi (izotopları ile birlikte), moleküler formülüyle

ilişkilendirilebilir; bu, kolayca bulunabilen veri tabanlarında arama yapılarak, madde tanımlaması için önemli ipuçları sağlayabilir. Bu tanımlama süreci, prensip olarak, saf referans standartlarının varlığını veya analitin fragmentasyon spektrumlarının bilgisini gerektirmez. Bununla birlikte, olası izobarik bileşiklerin sayısı nedeniyle, fragmentasyon spektrumları dahil olmak üzere, kesin pik tanımlaması için ek kanıt gereklidir. Bir Q-TOF analizörü, yüksek çözünürlükte kaydedilen parçalanma verileriyle entegre edilebilen üstün hassasiyet ve yüksek kütle doğruluğu ile tam tarama kazanımları gerçekleştirir. Bu özellikler, prensip olarak, izlenecek kütlelerin önceden tanımlanmasına gerek kalmadan sınırsız sayıda kimyasal bileşenin tespitine izin verir, bu da Q-TOF'u biyolojik numunelerin toksikolojik taraması için değerli bir sistem haline getirmektedir⁹⁶.

Şimdiye kadar, bitkisel ürünlerdeki ve saç, oral sıvı, kan ve idrar gibi biyolojik numunelerdeki sentetik kannabinoidleri tespit etmek için çok sayıda analitik prosedür geliştirilmiştir. Bu bağlamda, en geniş bileşik yelpazesini tespit edebilen analitik stratejiler, yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi tekniklerinin kullanımına odaklanmıştır⁹⁵.

Sentetik kannabinoid ve metabolitlerinin ayrılmasında, olası yapılarının aydınlatılmasında sıvı kromatografi kütle spektrometresi (LC/MS), yüksek çözünürlüklü sıvı kromatografi kütle spektrometresi (HR-LC/MS), sıvı kromatografi uçuş zamanlı kütle spektrometresi (LC/Q-TOF MS), matriks destekli lazer desorpsiyonu/uçuş kütle spektroskopisinin iyonlaşma süresi (MALDI-TOF)⁹⁷ gibi teknikler kullanılmaktadır.

Validasyonu yapılmış ve standardize edilmiş yeni test sistemlerinin geliştirilmesine rağmen, kötüye kullanımı olan potansiyel uyuşturucuların sonu olmayan arzı, adli ve sağlık kurumu çalışanlarının sentetik kannabinoidlerin analizi konusundakileri araştırmalara yönlendirmektedir. Ne yazık ki, yeni tasarım uyuşturucular dünya çapında ün kazandıkça, hastalık hali ve ölüm raporları artmaya devam etmektedir. Bu alanlarda yapılan toksikolojik araştırmalarla bir takım tutarlı ilerlemelere ulaşılmışsa da daha verimli olabilmek için konu üzerinde hazırlanmış rehberlere ihtiyaç vardır²⁴.

Farmasötik denemeler için yapılan pre-klinik çalışmalarda denenen ilaçların metabolizmalarının ve oluşan metabolitlerinin belirlenmesi, etik nedenlerden ve kullanılan maddelerin toksik etkilerinin tam olarak bilinmemesinden dolayı belirli

aşamalar kat edilene kadar non-human (insanın kullanılmadığı) deney modelleriyle gerçekleştirilmektedir. İnsanla kıyaslandığında hayvan deneylerinde belirgin derecede metabolik farklılıkların gözlemlenmesi, hayvan deneylerinin önemli dezavantajlarından biridir^{98,99}. Bu dezavantaj bir ilacın metabolik profilinin oluşturulmasında tam olarak doğru sonuçlar elde edilememesine yol açmaktadır¹⁰⁰. Metabolizma çalışmaları için bu sorun göz önünde bulundurulduğunda, son zamanlarda farklı insan temelli teknikler geliştirilmiştir. İnsan karaciğer hücreleri metabolik süreçte olaya müdahil olan tüm enzim gruplarını içerdiğinden, ilaç metabolik profili oluşturulması için en uygun materyal olarak görülmektedir^{98,100}. Mikroozomlar, hepatik faz I reaksiyonlarının in-vivo denemelerde gözlenmesi için en uygun bileşenlerdir ve madde ile kısa süreli inkübasyonlarıyla metabolit oluşumu gözlenmektedir^{101,102}. Karaciğer mikroozomlarında faz I reaksiyonları sonucu oluşan metabolitler, yine karaciğer hücreleri tarafından faz II reaksiyonlarına uğratılır ve canlı sistem içerisinde gerçekleşen denemelerin daha kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmesine olanak sağlarlar. İn vitro hepatik modellerin kullanılması klinik öncesi yapılan denemelerin daha rasyonel sonuçlar vermelerini sağlamıştır.

2.2.8. Yasal Durum

EMCDDA (Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi) yeni uyuşturucu maddeler ile mücadeleyi kolaylaştırmak için EWS (Early Warning System) adı verilen ve EMCDDA'ye bağlı ulusal birimler içerisinde (Türkiye'de TUBİM) yer alan erken uyarı grupları kurmuştur. Bu gruplar aracılığı ile EMCDDA'ye yapılan ihbarlar tüm üye ülkelerle paylaşılmakta ve bu sayede maddeye karşı erken önlem alınabilmektedir. Yeni çıkan maddeye ilişkin ihbarlar belli boyutu aştığında EMCDDA Europol ile birlikte genişletilmiş bilimsel kurulunu toplayarak madde hakkında ortak rapor hazırlamaktadır. Bu raporda maddenin kimyasal ve fiziksel tanımı, sokak ismi, yakalamaların miktarı, formu, kullanıcı miktarı, nasıl el değiştirdiği, üretim yöntemi, uyuşturucu trafiği, kullanıcılardaki sağlık ve sosyal riskleri, maddeye bağlı zehirlenme ve ölüm varlığı, halen herhangi bir Avrupa Birliği'ne üye ülkede yasaklanıp yasaklanmadığı, kimyasal prekürsörleri yer almaktadır. Rapor sonucunda ulaşılan sonuç maddenin tehlikeli olduğu yönünde ise üye ülkelerin 180 gün içerisinde maddeyi yasa

kapsamına almaları istenmektedir. Şimdiye kadar hazırlanan ortak raporlar MCPP (2005), BZP (2007) ve Mephedrone (2010) ile ilgilidir^{103,104}. Bu sistemin uyuşturucu maddelerle mücadelede önemli olabileceği düşünülmektedir¹⁰⁵. Türkiye’de Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (TUBİM) koordinasyonunda Erken Uyarı Sistemi (EWS) bazı SK’ların bildirimini yapmıştır¹⁰⁶.

Türkiye’de SK’in bir kısmı 22.05.2013 tarihli ve 2013/4827 sayılı kararname eki listesinde yer alarak yasadışı madde olarak ilan edilmiştir. AM-2201,RCS-4, JWH-201, JWH-302, JWH-018,JWH-019,CP-47 vb. etken maddeler 13.02.2011 tarihinden itibaren 2313 sayılı yasa kapsamına alınmıştır¹⁰⁷. Bu tarihten sonra da 2013 yılında 30 adet, 2014 yılı Mayıs ayı itibarı ile 52 adet SK yasaklı maddeler kapsamına alınmıştır¹⁰⁸. 24 Şubat 2015 tarihinde yapılan kanun değişikliğiyle ‘bonzai’ gibi sentetik uyuşturucu maddeler Türk Ceza Kanunu kapsamına alınmıştır. 5237 Sayılı Türk Ceza Kanunu’nun 188. maddesinin dördüncü fıkrasına ‘morfin’ ibaresinden sonra gelmek üzere ‘sentetik kannabinoid türevleri’ ibaresi eklenmiştir¹⁰⁹.

2.3. İnsan Hepatositlerinde Mikrozomal Çalışmalar

Hücre kültürü, çok hücreli organizmalara ait hücrelerin, laboratuvar ortamında özel olarak tasarlanmış kaplarda, ısı, nem, besin gibi ortam şartlarının kontrol edilerek kontaminasyondan arı bir şekilde yaşatılmasıdır. İnsan da dâhil olmak üzere herhangi bir canlıdan alınan hücrelerin suni ortamda yaşatılabilmesi, herhangi bir doku ya da organdan alınan hücrelerin kullanılabilmesi ve birçok etik kaygıyı gidermesi, hücre kültürü çalışmalarının tercih sebepleri arasında yer almaktadır¹⁰⁹. Hücre kültürünün sıkça tercih edildiği alanlar kanser, aşı çalışmaları, ilaç geliştirilmesi ve in vitro sitotoksikite çalışmalarıdır¹¹⁰.

Sitotoksik terimi, hücre ölümüne neden olan anlamına gelmektedir. Sitotoksikite araştırmaları, bir maddenin sitotoksik potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılır. Hücre temelli sitotoksikite çalışmaları, gerek uygulama kolaylığı, gerekse in vivo çalışmalardan elde edilen verilerle uyum göstermesi nedeniyle, hayvan deneylerine alternatif olarak doğmuş ve toksikoloji laboratuvarlarında sıkça tercih edilir hale gelmiştir¹¹¹. Sitotoksikite, incelenen maddenin dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak hücrelere değişik derecelerde zarar veren bir olaydır. Hücreler, sitotoksik

maddeye maruz kalırsa apoptoz, otofaji ve nekroz gibi olaylar sonucu ölebilir ya da sitostazis nedeniyle proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler¹¹². Hücre bazlı sitotoksisite çalışmaları ile test edilen maddenin sitostatik ve sitotoksik etkileri hakkında temel bilgi edinilir¹¹³. Deneysel olarak kimyasal, biyolojik ya da fiziksel etkenlere maruz bırakılan hücrelerin, maruziyet sonrasındaki canlılıklarının belirlenmesi, bu çalışmaların önemli bir basamağıdır¹¹⁴. Hücre canlılığının belirlenmesi için uygulanan çok sayıda test vardır. Yapılan sitotoksisite çalışmasının tipi ne olursa olsun, önemli olan çalışma sonundaki canlı/ölü hücre miktarının belirlenmesidir¹¹³. Sitotoksisite belirleme metodları genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemlerdir¹¹⁵⁻¹¹⁷.

Kolorimetrik metodlarda, 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT), 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS), 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 tetrazolyum tuzları kullanılarak renk değişikliği ya da kristal viyole, nötral kırmızısı gibi boya maddeleri kullanılarak hücrelerin spesifik boyanması esasına dayalı ölçüm yapılır^{113,118,119}.

Luminometrik metodlar, floresans ve biyolüminesans olarak ikiye ayrılmaktadır. Floresans metodlarda, floresans özellikteki maddeler kullanılırken, biyolüminesans metodlarda lusiferaz denilen özel enzimler ve bunların substratlarının kullanımı ile canlı/ölü hücre tespiti yapılması söz konusudur. Daha gelişmiş biyolüminesans metodlarda (gerçek zamanlı biyolüminesans), hücrelerin sitotoksik madde ile maruziyeti, sadece testin yapıldığı anda değil, maruziyet süresince incelenebilir hale gelmiştir¹²⁰.

Hücre hasarını ya da ölümünü takiben vasata sızan enzimler de ölü hücre sayısının belirteci olarak ele alınmıştır. Bu enzimler içerisinde stabilitesi ile öne çıkan laktat dehidrojenaz (LDH), hücre ölümü belirteci olarak canlılık testleri arasındaki yerini almıştır¹²¹. Hücre sayısı tespitinde kullanılan metodlar içerisinde, mikroskopi (tripan mavisi ile boyama-thoma lamı) ya da elektronik sayıcı ile otomatik sayım gibi, özellikle rutin hücre kültürü işlemlerinde kullanılan metodlar da bulunmaktadır¹²².

Sentetik kanabinoidlerin hücre hattı üzerindeki toksikolojik profili üzerine güncel çalışmalar, kannabinoid reseptör bağımsız ve bağımlı sitotoksik etkileri olduğunu

göstermiştir. Koller ve ark. göre JWH-018'in 75-100 μ M'dan daha yüksek konsantrasyonlarında yanak (TR146) ve göğüs (MCF-7) türevli hücrelerin hücre membranlarında hasara yol açtığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte, diğer testlerde hiçbir sitotoksosite görülmemiştir. Tomiyama ve ark. sonuçların, CB₁ reseptörünün aracılık ettiği primer fare beyin nöronal hücrelerinde sentetik kanabinoidlerin akut sitotoksitesine işaret ettiğini, ancak CB₂ reseptörü tarafından olmadığını ifade etmişlerdir. Bu çalışma aynı zamanda kaspaz kaskadlarının sentetik kannabinoidlerin neden olduğu apoptozda önemli bir rol oynayabileceğini önermektedir¹²³.

İnsan hepatositleri insan karaciğer mikrozomlarından (HLM) seçilir, çünkü hepatositler bütün endojen ilaçları, metabolize eden enzimleri ve önemli kofaktörleri içerir. İnsan hepatositleri ile tanımlanan metabolitler yeni psikoaktif maddelerin belirlenmesi için yararlı bir marker olarak kullanılır. Son zamanlarda ilaca bağlı acil servis hastalarındaki artış yeni tasarım psikoaktif maddelerle ilişkilendirilebilir. YTP alımının gösterilmesi için idrar metabolitlerinin tanımlanması olumsuz olayların nedeninin belirlenmesi için oldukça önemlidir¹²⁴.

Yacine ve ark. yaptığı çalışmada da yine LC-HR-MS kullanılarak psikoaktif madde 25B-NBOMe'nin CYP ve UGT türevlerinin in vitro karakterizasyonuna bakılmış. Çalışmada yeni psikoaktif maddelerin ortaya çıkmasıyla başlıca oluşan zorluklardan birinin insan biyolojik örneklerinde bu maddelerin tanımlanması olarak ifade etmişler. Maddenin tüketimi ve örnekleme arasındaki zaman çok uzun olduğunda, ana maddeyi belirlemeye çalışmanın yanlış sonuçlara yol açabileceğini belirtmişler. Sitokrom P450 tarafından oksidatif metabolizma ve glukuronidasyon iki ana detoksifikasyon yoludur. 25B-NBOMe'nin CYP ve UGT bağlı metabolitlerini karakterize etmek için insan karaciğer mikrozom inkübasyonlarını UHPLC-QTOF-MS kullanarak analiz etmişlerdir¹²⁵.

İn vitro çalışmalar yeni tasarım psikoaktif maddelerin ana metabolik yollarını göstermek için yapılır. Bunun için birkaç yaklaşım kullanılmaktadır.

- İnsan karaciğer mikrozomları ile ilaç inkübasyonu
- İnsan hepatositleri ile ilaç inkübasyonu
- Farelere uygulanan kontrollü ilaç

Dahası bu çalışmalar güçlü yazılım programlarının kullanılmasıyla metabolitlerin kimyasal yapılarının aydınlatılmasına da yardımcı olmaktadır¹²⁵.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

T.C. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 06 Temmuz 2018 tarihli ve 79 Sayılı Toplantısında, bu çalışmanın etik açıdan uygun olduğuna dair karar verilmiştir (Ek-1). Ayrıca, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-2018-10937 numaralı proje koduyla parasal destek sağlanmıştır.

3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

3.1.1 Kimyasal Malzemeler

- 5F-NPB-22 standardı (Chiron, reference standarts)
- THLE-2 (ATCC CRL-2706) Hepatosit Hücre hattı
- BEGM (Lonza, BEGM Bullet Kit; CC3170)
- EGF (epidermal growth factor)
- O-Phosphorylethanolamine, 5 gr
- Fungizone(Amphoterisin B) 250 µg/mL, 20 mL
- Penicillin-Streptomycin - 20 mL
- L-Glutamine 100X, 200mM - 100 mL
- Trypsin-EDTA w/ Phenol Red, 100 mL
- Fetal Bovine Serum (South America), 100 mL
- DPBS-1X w/o Ca++, Mg++ 500 mL
- Aquaguard™-1 Solution, 100 mL
- Asetonitril, ≥% 99.9, 2.5 lt
- Diklofenak sodyum tuzu, 10 gr

3.1.2 Araç, Gereç ve Cihazlar

- LC/Q-TOF MS (Agilent 6550 iFunnel)
- Vorteks (Velp Scientifica)
- Hassas terazi

- Vial ve vial kapağı
- 15 mL Steril PP Centrifuge Tube,
- 50 mL Steril PP Centrifuge Tube,
- T25 flask (kültür şişesi)(430639, Corning)
- 6'lı well plate (38015, Costar)
- Etüv (5040 BP, Elektro-mag Wise Cuba)
- Laminar akımlı kabin (SafeFast ELITE, FASTER)
- CO₂ inkübatörü (CCL-170B-8, ESCO)
- Santrifüj (320R, Hettich)
- İnverted mikroskop (PrimaVert, ZEISS)
- Buzdolabı (ARÇELİK)
- Derin dondurucu (Bosch)
- Hücre sayım cihazı (Roche)
- Hassas terazi (Sartorius)
- Manyetik karıştırıcı (Yellow Line)
- Mikropipet seti (Eppendorf)
- Mikrosantrifüj (NF-048, Nüve)
- xCELLingence cihazı (Roche Diagnostics GmbH)

3.2. LC/Q-TOF MS Cihaz Parametreleri

Yeni tasarım psikoaktif maddelerden 5F-NPB-22 standart maddesinin analizleri için Agilent 1260 serisi HPLC sistemi ve bu sisteme bağlı Agilent 6550 iFunnel Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometre cihazı kullanıldı (Agilent Technologies, Inc., CA, USA, LC/Q-TOF MS). MS sistemi için Agilent marka çift spreylili Jet Stream Elektrosprey iyon kaynağı kullanıldı. Analizler pozitif modda yapıldı. MS ve MSMS çalışma modu 2 GHz Extended Dynamic Range (100-3200amu) olarak kullanıldı. Kromatografik ayırım için Agilent Poroshell SB-C18 (4.6 mm x 150 mm x 2.7 µm) kolon kullanıldı. Analiz ve veri değerlendirmelerde Agilent MassHunter Yazılım versiyon B06.00 ve Agilent MetaboliteID yazılımı kullanıldı (Şekil 6).

Standart madde metanol içinde 100 ng/ml olarak hazırlandı ve aşağıdaki koşullarla cihaza verildi (tablo 2).



Şekil 6. Agilent 6550 Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometre (LC/Q-TOF MS)

3.2.1. Numunelerin LC/Q-TOF için Hazırlanması

Standart madde metanol içinde 100 ng/mL olarak hazırlandı ve aşağıdaki koşullarla cihaza verildi (tablo 2).

LC/Q-TOF MS cihazının en büyük avantajlarından biri örnek hazırlama işlemlerinin çok az olmasıdır. Bizim de çalışmamızda inkübasyon sonucu elde edilen örneklerle ön hazırlama işlemi uygulanmadan, inkübasyon sonucu elde edilen örnekler sadece santrifüjlenerek alınan 10 µL süpernatant LC/Q-TOF MS sistemine belirlenen metot ile enjekte edilmiştir.

Tablo 2. LC/Q-TOF MS Çalışma Koşulları

Kolon	Agilent Poroshell SB-C18 4.6 mm x 150 mm x 2.7 µm
Kolon Fırını	35 °C
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Analiz süresi	32 min.
Mobil Faz A	10mM amonyum asetat
Mobil Faz B	Metanol
Akış	0.6 mL/dk
Akış programı	0 dk- 5 % B
	2 dk- 5 % B
	5 dk- 10 % B
	12 dk-70 % B
	16 dk- 90 % B
	22 dk- 90 % B
	22.1 dk- 5 % B
	30 dk- 5 % B
İyonlaşma modu	Pozitif

Kurutucu gaz sıcaklığı	200 °C
Kurutucu gaz akış, N ₂	14 L/dk
Nebulizer	40 psi
Sheath gaz sıcaklığı	350 °C
Sheath gaz akış, N ₂	11 L/dk
Kapiler Voltaj	1500 V
Nozzle Voltaj	1000 V
Kütle okuma aralığı	40-1700 amu
Referans iyonlar	922.0098

3.3. Hücre Kültürü

3.3.1. THLE-2 (ATCC® CRL-2706™) Hücre Hattı

THLE-2 hücreleri, normal yetişkin karaciğer epitel hücrelerinin fenotipik özelliklerini ifade eder. Nude farelere enjekte edildiklerinde, homojen değildirler, diploide yakın karyotiplere sahiptirler ve alfa-fetoprotein eksprese etmezler. THLE-2 hücre hattı, SV40 büyük T antijeni ile transformasyon yoluyla birincil normal karaciğer hücrelerinden üretilmiştir. THLE-2 hücreleri, benzo [a] piren, N-nitrosodimetilamin ve aflatoksin B1'i, fonksiyonel sitokrom P450 yollarını gösteren DNA'yı ekleyen kanserojen metabolitlerine metabolize eder. Epoksit hidrolaz, NADPH sitokrom P450 redüktaz, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon S-transferazlar ve glutatyon peroksidaz gibi kimyasal karsinogenlerin metabolizmasında rol oynayan diğer enzimler de THLE hücreleri tarafından tutulur¹²⁶.

Bu immortalized insan karaciğer hücreleri, farmakotoksikolojik çalışmalar ve insan hepatoselüler karsinomunun etiyolojisi ve patogenezinin araştırılması için in vitro bir model oluşturmaktadır¹²⁷.

Bizim çalışmamızda yeni tasarım psikoaktif maddelerden 5F-NPB-22 maddesinin metabolitlerini belirlemek ve sitotoksik etkilerini incelemek için THLE-2 (ATCC® CRL-2706™) insan karaciğer hücreleri kullanılmıştır. Bu hücre hattı ATCC'den sıvı azot ile gelip yine sıvı azot tankında depolanmıştır.

3.3.2. Medyum Hazırlanması

THLE-2 insan karaciğer hücre hattının çoğaltılmasında ve sürdürülmesinde hücre üreticisi firmanın önerdiği BEGM (Lonza, BEGM Bullet Kit; CC3170) besi ortamı kullanıldı. İçerisine, kitle beraber gelen katkı maddeleri (BPE, 2.00 mL; İnsülin, 0.50 mL; Hidrokortizon, 0.50 mL; GA-1000, 0.50 mL; Retinoik Acid, 0.50 mL; Transferrin, 0.50 mL; Triiodotironin, 0.50 mL Epinefrin, 0.50 mL; hEGF, 0.50 mL) eklenerek çalışılacak medyum oluşturuldu.

Hazırlanan katkılı medyum uygun hacimdeki kültür tüplerine (50 mL falkon tüp) bölündü ve kullanılacağı ana kadar +4°C’de muhafaza edildi.

3.3.3. Hücrelerin Çözülmesi

Öncelikle elimizde bulunan hücre hattının ısısı su banyosunda veya ortam sıcaklığında 37°C gelmesi sağlandı. Buzları çözülmüş olan cryovial % 70’lik etanol ile silinerek daha önceden steril edilmiş laminar akımlı kabine yerleştirildi. Sterilite tamamıyla sağlandıktan sonra cryovial açıldı ve hücreler 15ml’lik falkon tüp içerisine boşaltılarak üzerine 37°C olan ortam medyum eklenerek yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandığında falkon tüp oda ısısında 130xg’de 5 dakika boyunca santrifüj edildi ve katkılı BEGM ortama eklenerek kültür şişesinin kapağı kapatıldı ve 24 saat boyunca 37°C ve % 5 CO₂ inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonrasında hücre kültürünün ortamı yenilendi. 2-3 günde bir hücreler % 80 konfluent oluncaya kadar medyum değiştirilerek hücreler inkübe edildi.

3.3.4. Hücrelerin Pasajlanması

THLE-2 hücre hattında hücre proliferasyonu % 80 oranına ulaştığında, hücre tabakasının üzerindeki medyum steril serolojik pipet yardımıyla çekildi. 37° C’ye ısıtılmış fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) hücre tabakasının üzerine eklenerek hücrelerin üzerinde kalan medyum uzaklaştırıldı. Böylece medyum içindeki fetal sıgır serumunun hücreleri kaldırmak için kullanılacak olan tripsini inaktive etmesi engellendi. Ardından bu tampon da ortamdan uzaklaştırıldı ve ortama hücrelerin

yüzeyini kaplayacak miktarda % 0,25 tripsin-EDTA eklendi. Tripsin eklenmiş hücreler yaklaşık 5 dakika 37°C’de inkübatörde bekletildi. Daha sonra hücre tabakasının yüzeyden ayrılıp ayrılmadığı mikroskop altında kontrol edildi ve ayrılma gerçekleşmiş ise hücreler flasktan çekildi ve bir falkon tüpe alındı. Çekilen hücre süspansiyonu kadar miktarda katkılı medyum tüpe eklendi ve pipetaj yapıldı. Hücre süspansiyonu 130 g’de 5 dakika döndürüldükten sonra süpernatant atıldı ve pelleti oluşturan hücrelerin üzerine 1 ml katkılı medyum eklendi ve kümelenmiş hücreleri dağıtmak için pipetaj yapıldı. Elde edilen hücreler sayıldı ve canlılık oranları belirlendi. Hücrelerin ne kadar seyreltilmesi gerektiğine ve ekim konsantrasyonuna karar verildi. Karar verilen miktarda hücre, yeni flaska aktarıldı. Önceden 37°C’ye ısıtılmış yeni katkılı medyum, hücrelerin üzerine eklendi. Flask nazikçe sallandı ve hücrelerin eşit şekilde dağılması sağlandı. Daha sonra hücreler inkübatöre yerleştirildi. 2-3 günde bir hücreler % 80 konfluent oluncaya kadar medyum değiştirilerek inkübe edildi. Deney için yeterli sayıda hücreye ulaşana kadar bu işlem tekrarlandı

3.3.5. Hücrelerin Sayılması

Hücre sayımı için Cedex XS (Roche, Mannheim, Germany) cihazı kullanıldı. Bu cihaz Tripan Mavisi boyama yöntemini ile yarı-otomatik olarak hücre konsantrasyonu ve canlılığı hakkında bilgi sağlayan yüksek doğrulukla ölü/canlı ayırımı yapmaktadır. Resüspanse edilen hücrelerden 20 µL alınarak 0.2 mL’lik eppendorf içerisine aktarıldı. Bu hücrelerin üzerine ise ölü ve canlı hücre ayırımını sağlayan distile su ile dilüe edilmiş 20 µL % 0.4’lük tripan mavisi (Roche, Mannheim, Germany) eklendi. Elde edilen karışım pipetaj işlemi ile homojen hale getirildikten sonra cihazın özel lamı olan Smart Slides (Roche, Mannheim, Germany) haznesine 20 µL eklendi. Daha sonra örnek lam içinde Cedex XS hücre sayım cihazına yerleştirildi (Şekil 7) ve sayım işlemi cihazın yazılımı aracılığıyla gerçekleştirildi (Şekil 8).

Sitotoksikite deneyi için xCELLigence cihazında kullanılacak yeterli hücre sayısı 10.000 olarak belirlendi ¹²⁸.



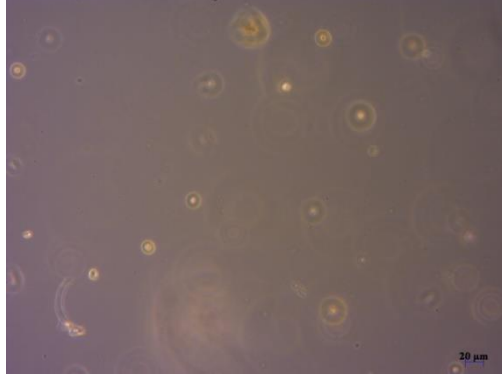
Şekil 7. Cedex XS hücre sayım cihazı ve cedex smart slides.

Overall Type Name	Measurement Result Value
Avg Diameter [μm]	13.41
Avg Compactness	1.722
Avg Object Diameter [μm]	5.94
Avg Object Compactness	2.229
Viable Cell Count	2152
Dead Cell Count	79
Total Object Count	5363
Viability [%]	96.5
Viable Cell Conc. [cells/mL]	14.95×10^5
Dead Cell Conc. [cells/mL]	0.55×10^5
Total Cell Conc. [cells/mL]	15.50×10^5
Total Object Conc. [objects/mL]	37.26×10^5
Total Cell Count	2231
Aggregate Rate [%]	41.5

Şekil 8. Cedex cihazında yapılan hücre sayımı ve canlılık oranı

3.3.6. Hücrelerin çoğaltılması

Hücrelerin çoğaltılması (proliferasyon) için hücreler 25 cm^2 'lik steril polisitren hücre kültürü flasklarında 37°C sıcaklıkta, %5 CO_2 ve nem içeren inkübatörde bekletildi. Hücre hattı canlılık, çoğalma ve enfeksiyon açısından inverted mikroskopta günlük olarak izlendi (Şekil 9). Daha sonra çoğalan hücreler 2 ml %0.05 Trypsin-EDTA (Lonza) ile muamele edilerek 5 dakika inkübatörde (37°C , %5 CO_2) tutulup, flask yüzeyinden ayrılmaları sağlandı. %0.05 Trypsin-EDTA+hücre karışımına FBS içeren 10 ml BEGM medium eklenerek tripsin inaktivasyonu sağlandı ve 15 mL'lik santrifüj tüpüne (non pirojenik ve steril) alınarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi.



Şekil 9. THLE-2 hücre ekiminin mikroskopik görüntüsü

3.4. 5F-NPB-22 Maddesinin Uygulanması

5F-NPB-22 maddesi ile deneye başlamadan önce madde dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözündürülerek 100 mM stok solüsyon hazırlandı. Deneyde kullanılacak uygun konsantrasyonlar stok solüsyonların katkılı medyum ile sulandırılması ile elde edildi. Deney için, hücreler 24-well plate'in her kuyusunda 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde ekim yapıldı.

Çalışmamızda 4 tekrarlı olacak şekilde 3 grup çalışıldı. Yalnız pozitif kontrol grubu 10 μ M ve 20 μ M olarak 2 farklı derişim çalışıldı.

1. **Kontrol grubu:** Hücre hattının üzerinde sadece medium içeren grup
2. **Pozitif kontrol grubu :** Hücre hattının üzerinde Diklofenak içeren grup
3. **5F-NPB-22 grubu:** Hücre hattının üzerine 10 μ M 5F-NPB-22 içeren grup.

DMSO içerisinde çözülmüş olan 5F-NPB-22 maddesi reaksiyon ortamındaki son derişimi 10 μ M olacak şekilde medyum ile seyreltilti. Hücreler 24-well plate'in her kuyusunda 500 μ L ve 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde 37°C'de sürekli sallamalı inkübatörde inkübe edildi. Reaksiyon 3 saat sonra asetronitril ile durduruldu. Örnekler analiz yapılana kadar -80°C' de saklandı. Pozitif kontrol olarak; Diklofenak, 4 hidroksi diklofenak ve açıl-D-glukuronid diklofenak metabolizması izlenerek hepatosit metabolik aktivitesini sağlamak için inkübe edildi.

5F-NPB-22 maddesinin metabolitlerinin belirlenmesi için yapılacak çalışmada - 80°C’de bekletilen örnekler deney yapılacağı zaman çıkarılıp, hücre artıklarının ve ortamda kalabilecek maddelerin uzaklaştırılması amacıyla 4°C’de 15,000g’de 5 dk santrifüjlendi ve 10 µL süpernatant LC/Q-TOF MS sistemine önceden belirlenen metot ile enjekte edildi.

Cihazdan elde edilen ham veri dataların işlenmesi ve metabolitlerin değerlendirilmesi MetaboliteID yazılımı ile yapıldı. 5F-NPB-22 maddesinin teorik olarak olası biyotransformasyonları maddenin yapısına bağlı olarak oluşturuldu.

3.5. Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Deneylerinin Gerçekleştirilmesi

Hücresel olaylar xCELLigence sistemi ile doğal halleriyle işaretleme yapılmasına gerek olmadan gerçek zamanlı olarak analiz edilebilmektedir. Sistem, E Plate 16 (Şekil 10) olarak adlandırılan ve zeminine yerleştirilmiş mikroelettrotlar sayesinde elektriksel empedansı ölçmektedir. Empedanstaki meydana gelen değişim hücre sayısı, canlılığı, morfolojisi ve hareketi dahil hücrelerin biyolojik durumu hakkında kantitatif bilgiler vermektedir. xCELLigence DP Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı (Şekil 10) iki üniteli olarak meydana gelmektedir. Bu ünitelerden birincisi hücrelerin içine ekildiği E-Plate üzerindeki değişiklikleri ölçen ana ünite, bu ünite 3 plate’in yerleşeceği 3 bölüme sahiptir. Diğer ünite ise verilerin gösterilmesini sağlayan kontrol ünitesidir. Bu üniteye yüklenen “RTCA Software 1.2.1” programı ile analizler değerlendirilmektedir.



Şekil 10. xCELLigence DP Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı ve E- Plate 16.

Çalışmamızda gerçek zamanlı hücre analizi için birinci deneyde 5F-NPB-22'nin konsantrasyonları için n=3 tekrar yapıldı. Deney protokolümüz aşağıdaki gibidir.

1. Deney günü medyum uzaklaştırılarak hücreler 3 mL 1X D-PBS ile medyumunu uzaklaştırmak için 3 defa yıkandı.
2. Son yıkamada kullanılan DPBS çekildikten sonra hücrelere 2 mL % 0,05 tripsin-EDTA eklenerek 5 dk boyunca 37 °C'de inkübe edildi.
3. Tripsin inaktivasyonunu sağlamak için flaska 2 mL FBS katkılı BEGM medyumunu eklendi ve flastaki hücre süspansiyonu 15 mL konik kültür tüpüne aktarıldı.
4. 130 g'de 5 dakika santrifüj edilen tüpten süpernatant uzaklaştırılarak, pellet 1 mL katkılı medyum ile resüspande edildi.
5. Cedex cihazı (Şekil 7) ile hücre canlılığı sayıldı. Genelde T25 flasklardan 1.5×10^6 hücre elde edildi.
6. 16 kuyulu e-plate lerin her bir kuyusuna yaklaşık 1×10^4 hücre ekilmesi planlandığı için hücre süspansiyonu hesaplandı.

x-CELLigence verilerinin RTCA (realtime cell analyzer) programında işlenmesi ve hücre analiz grafikler aşağıdaki aşamalar takip edilerek yapıldı.

1. RTCA programı başlatıldı
2. Expnote, Layout ve Schedule öğelerini içeren deney bilgileri bu alanlara eklendi. Deney sonuçları ile istatistiksel analizler yapılacağı için her bir uygulamada, n=3 tekrar olacak şekilde kuyular hazırlandı. Kontrol ve 5F-NPB-22 konsantrasyonları hesaplanarak deney grubu çalışıldı.
3. Tüm ayarlamalar yapıldıktan sonra e-platelerin her bir kuyusuna 100 µL katkılı medyum eklenerek plateler inkübatör içerisindeki enstrümanına yerleştirildi. Bu şekilde deney başlatılarak blank okuma (boş okuma) alındı.
4. Boş okuma tamamlandıktan sonra plateler inkübatörden çıkarılarak laminar kabine alındı. Kuyulara 90 µL hacimde 10000 hücre içeren hücre süspansiyonu tüm kuyucuklara son hacim 190 µL olacak şekilde eklendi.
5. Plateler inkübatöre tekrar yerleştirildi ve hücre çoğalma eğrisi 24 saat boyunca izlendi.

6. İkinci aşamanın bekleme süresince, uygulanacak maddeler için gerekli konsantrasyonlar ependorf tüplerde hazırlanarak kodlarına uygun etiketlendi.

7. 24 saat sonunda E-plateler inkübatörden alınarak laminer kabine aktarıldı. Plateler için önceden belirlenmiş kuyu kodlarına göre uygun konsantrasyonlarda 5F-NPB-22, 10 µL kullanılarak kuyulardaki son hacimler 200 µL'ye tamamlandı. E-plate sisteminde kuyuların arasında kalan alanlara DPBS eklendi.

8. E-plateler tekrar inkübatöre alınarak bileşik aktivitesi izleme aşaması başlatıldı. Bu aşama uygulanan madde ve hücre hattına bağlı olarak 48-96 saat arası sürdürülmektedir. Bizim deneyimizde okuma 96. saatte sonlandırıldı.

9. Elde edilen verilerden kontrole oranla konsantrasyon grupları arasında kıyaslama yapabilmek için istatistiksel analizler yapıldı.

3.6. İstatistiksel Analiz

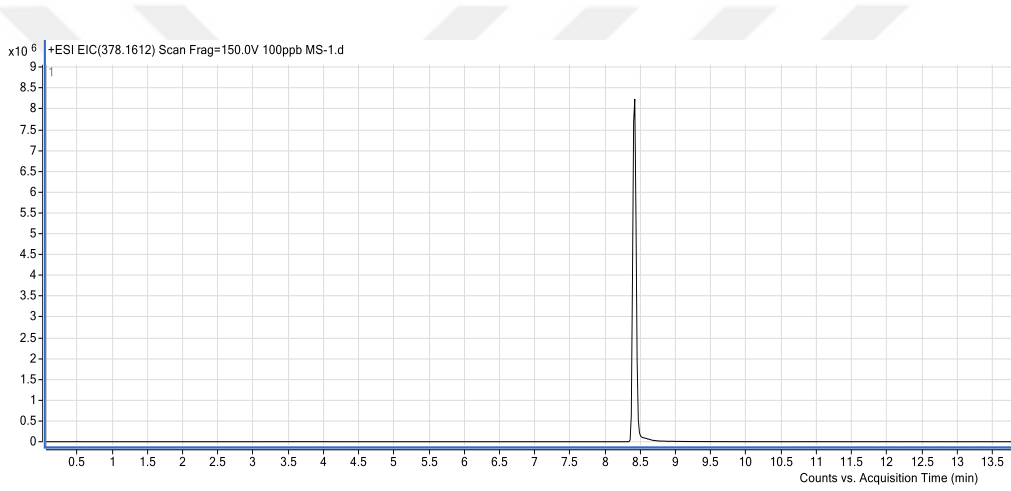
3.6.1. xCELLigence Sisteminde Yapılan Sitotoksisite Deneyinin İstatistiksel Analizi

Bu çalışmaya ait 5F-NPB-22 verilerinin istatistiksel analizi Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan danışmanlık alınarak yapıldı. İstatistiksel analizinde SPSS 11.5 paket programı kullanıldı. Verilerin özet istatistikleri için ortalama± standart sapma, minimum ve maksimum değerleri kullanıldı. Gruplara göre ölçümlerin zamansal değişimini göstermek için Box-Whisker grafikleri çizildi. İlaç öncesi, ilaçtan 24, 48, 72 ve 96 saat sonra alınan ölçümlerin karşılaştırılması için tekrarlanan ölçümlü ANOVA analizi yapıldı ve küresellik ön şartı sağlanmadığı için karşılaştırmalarda Greenhouse-Geisser testi kullanıldı. Varyansların homojenlik ön şartı sağlanmadığı için çoklu karşılaştırmalarda Tamhane Testi ve kontrol grubuyla diğer grupların karşılaştırmalarında ise Dunnet testi kullanıldı. Tüm karşılaştırmalar için istatistik önem seviyesi (p) 0,05 olarak alındı.

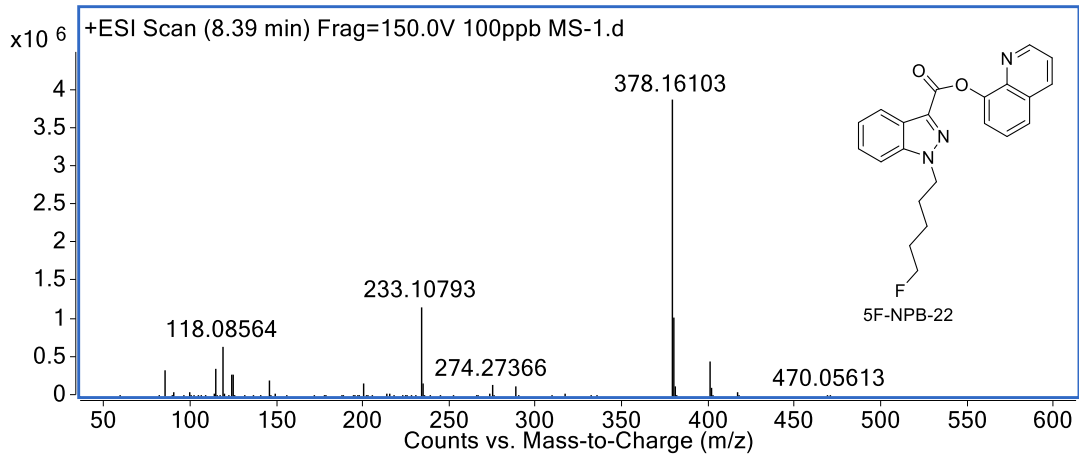
4. BULGULAR

4.1. LC/Q-TOF MS Analiz Sonucu

Metabolitlerini aradığımız 5F-NPB-22 maddesinin 100 ng/mL standart çözeltisinin LC/Q-TOF MS cihazındaki kütle spektrumu Şekil 11’ de gösterilmektedir. 5F-NPB-22 maddesi 40-1700 m/z kütle aralığında tarama modu (Scan) kullanılarak belirlenmiştir. Standart madde 8,38. dakikada pozitif modda ($[M+H]^+$, m/z 378.1603) tespit edilmiştir. 5F-NPB-22 maddesi için ana ürün iyonu m/z 233,1083 olarak belirlenmiştir.



(a)



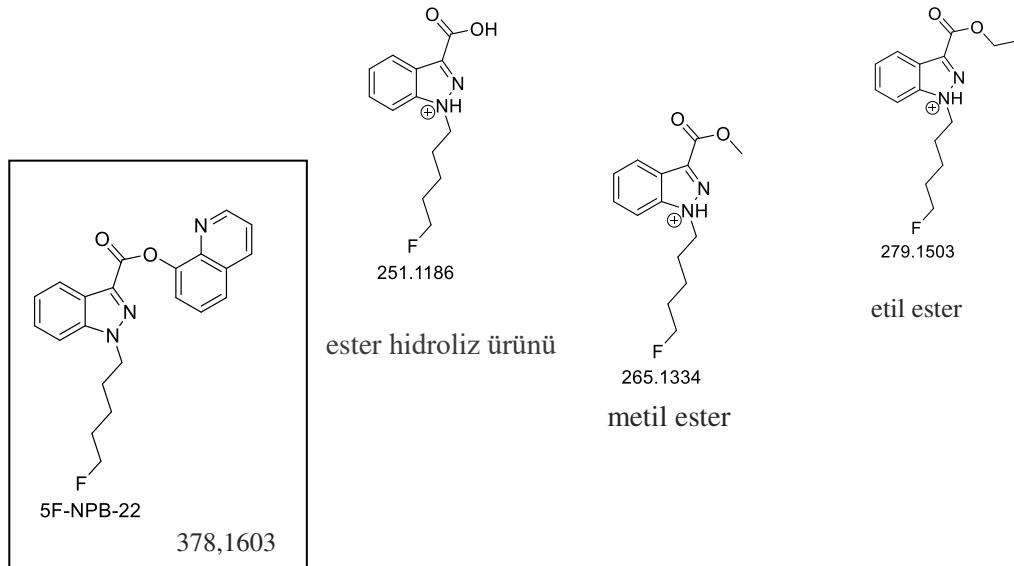
(b)

Şekil 11. 5F-NPB-22 maddesinin 100 ng/mL standart çözeltisinin LC/Q-TOF MS cihazındaki (a) kütle spektrumu (b) seçilmiş iyon kromatogram.

THLE-2 hücre hattında 3 saat inkübasyonu yapılan 5F-NPB-22 maddesinin - 80°C’de bekletilen örnekleri metabolitlerinin belirlenmesi için deney yapılacağı zaman çıkarılıp, santrifüjlenip LC/Q-TOF MS sistemine önceden belirlenen metot ile enjekte edilmiştir. Elde edilen spektrum ve kromatogramların ham dataları MetaboliteID program ile incelenmiştir. MetabolitID metabolit belirleme programı ile maddenin olası metabolitleri belirlenip maddenin yapısına göre 3 ana metabolit elde edilmiştir (şekil 12). Ana madde ve elde edilen metabolitlere ait alıkonma zamanı, ana iyonlar ve ana ürün iyonlar tablo 3’de özetlenmiştir.

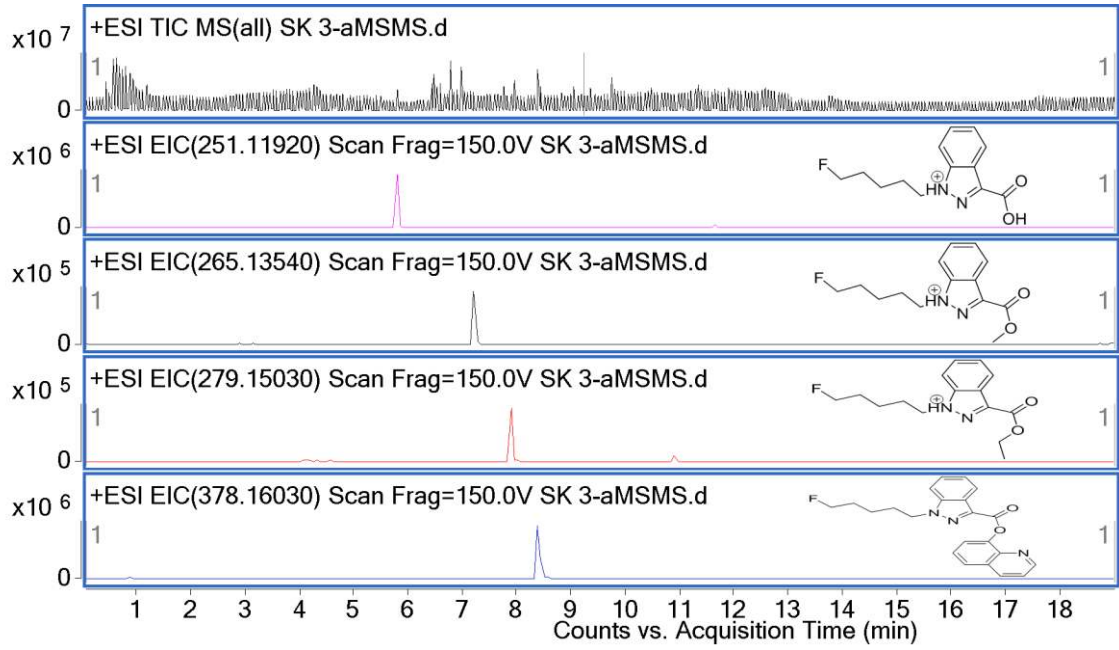
Tablo 3. 5F-NPB-22 ve elde edilen metabolitlerinin ana iyonları ve ana ürün iyonları

Bileşen	RT (min)	Ana iyon m/z	Ana ürün iyon m/z
5F-NPB-22 (C ₂₂ H ₂₀ N ₃ O ₂ F)	8.38	378.1603	233.1083
5F-NPB-22 etil ester C ₁₅ H ₁₉ N ₂ O ₂ F	7.89	279.1503	251.1188
5F-NPB-22 metil ester (C ₁₄ H ₁₇ N ₂ O ₂ F)	7.21	265.1354	251.1195
5F-NPB-22 ester hidroliz ürünü (C ₁₃ H ₁₅ N ₂ O ₂ F)	5.8	251.1192	233.1084



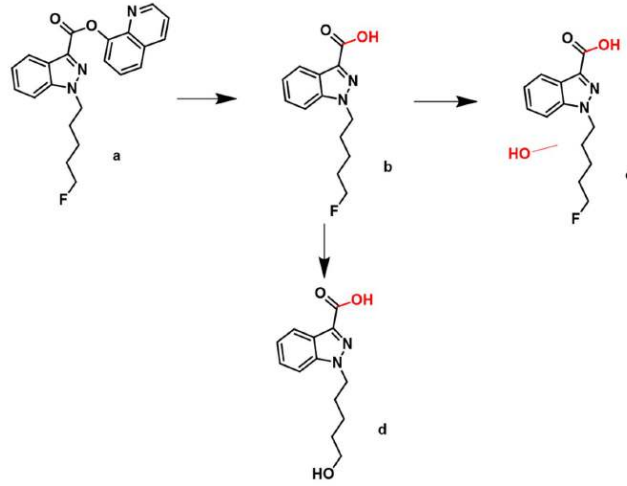
Şekil 12. 5F-NPB-22’nin elde edilen metabolitleri

İndazol grubuna ait sentetik kannabinoid olan 5F-NPB-22'nin elde edilen in vitro metabolitleri etil ester (3-(ethoxycarbonyl)-1-(5-fluoropentyl)-1H-indazol-1-ium) (m/z 279,1503), ester hidrolizi (3-carboxy-1-(5-fluoropentyl)-1H-indazol-1-ium) (m/z 251,1186) ve metil ester (1-(5-fluoropentyl)-3-(methoxycarbonyl)-1H-indazol-1-ium) (m/z 265,1334) ürünü olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda ester hidroliz ürünü olan metabolit (m/z 251,1186) en yoğun alana sahip metabolittir. Metabolitler için seçilmiş iyon kromatogramları şekil 13'da gösterilmiştir.



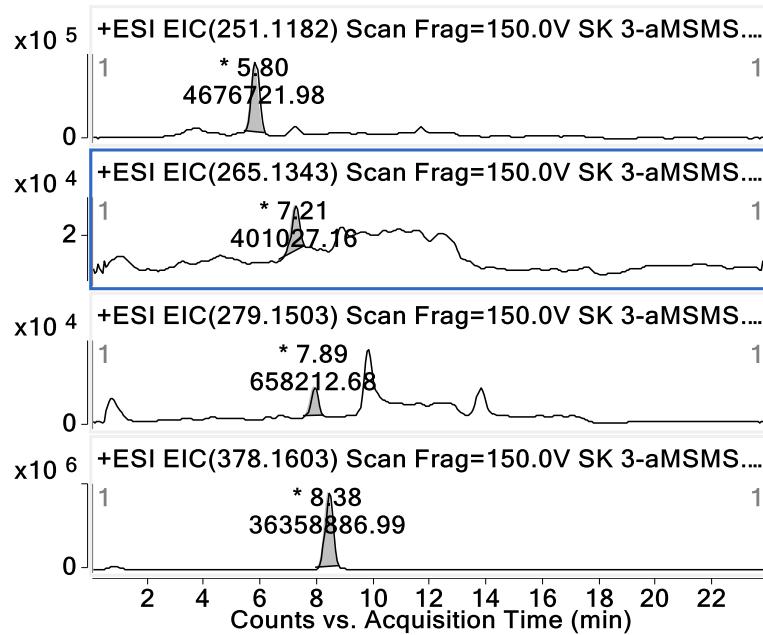
Şekil 13. 5F-NPB-22'nin elde edilen metabolitlerinin ekstrakte edilmiş iyon kromatogramları

İndazol analogu 5F-NPB-22'nin ana metabolik yolu ester hidrolizidir. Ek olarak, 5F-NPB-22 için ester hidrolizi ve ardından oksidatif deflorinasyon öngörülmüştür. 5F-NPB-22'nin metabolitleri için önerilen metabolik yol şekil 14'te gösterilmiştir¹²⁹.



Şekil 14. 5F-NPB-22 için önerilen metabolik yollar: a. Ana madde, b. Ester hidrolizi, c. Monohidroksilasyon ile ester hidrolizi, d. Oksidatif deflorinasyon ile ester hidrolizi

İndazol SK'lar nükleofilik ajanlara karşı indollere göre daha fazla reaktivite gösterirler. NPB-22 ailesi, herhangi bir biyokatalizörün yokluğunda bile hidrolize, metanolize ve dolayısıyla etanolize olmaya daha eğilimlidir¹²⁹. Bizim çalışmamızda da ester hidroliz ürünü (m/z 251,1182), metil ester (m/z 279,1503) ve etil ester (m/z 279,1503) ürünleri bulunmuştur. Belirlenen metabolitlerin sinyalleri şekil 15'te verilmiştir.

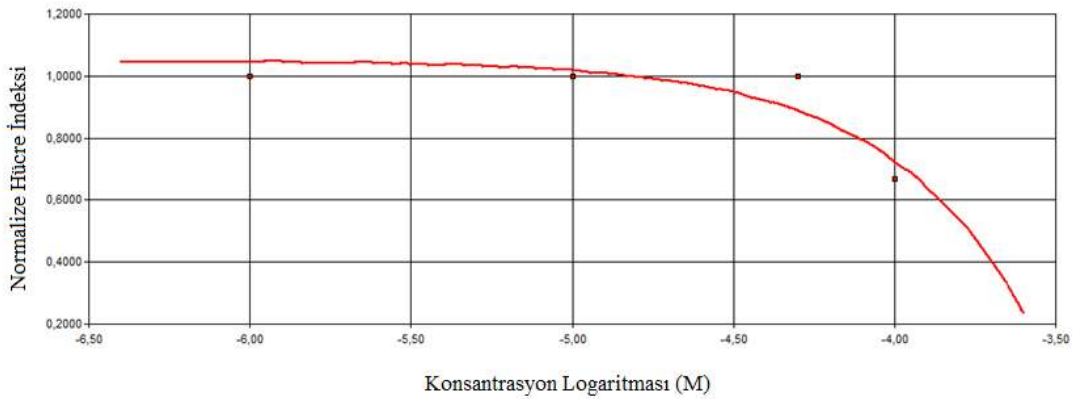


Şekil 15. Ana madde ve metabolitler için sinyal şiddetleri

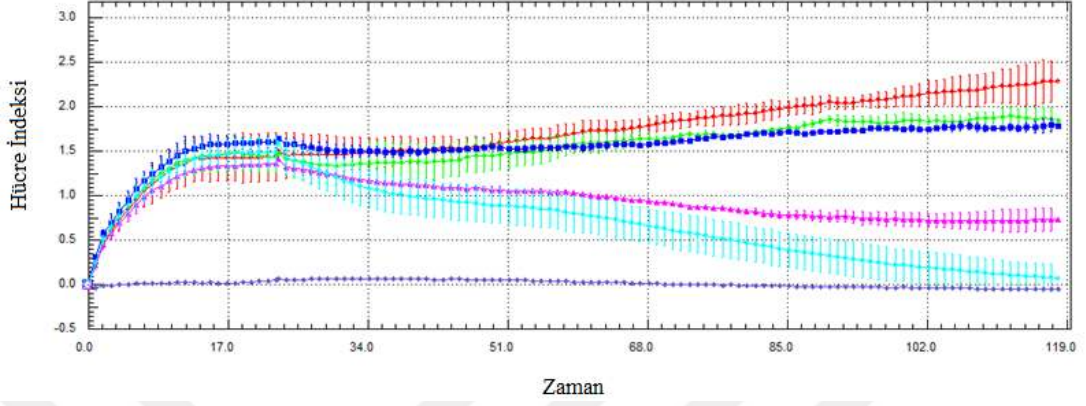
4.2. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Bulguları

THLE-2 karaciğer hücrelerinin yeni tasarım psikoaktif maddelerden 5F-NPB-22 uygulamalarına verdiği sitotoksikite yanıtını değerlendirebilmek için yapılan gerçek zamanlı hücre analiz çalışmasında elde edilen proliferasyon eğrilerinin zamana bağlı grafiği çıkarıldı. Elde edilen veriler, cihazın yazılımı tarafından hücre indeksi cinsinden sayısallaştırıldı. Bu grafik çizimlerine göre 5F-NPB-22 maddesi için hücrelerin yarısını öldürmeye yetecek toksik değerler bulundu. Sistem IC_{50} değerini; uygulanan tüm doz gruplarının, 96. saatte logaritmalarının alınması ve bu değerlerle birlikte hücre indeks değerlerine karşı bir grafik çizilmesi şeklinde sonuç verdi. Yapmış olduğumuz bu konsantrasyon çalışmasında sistem IC_{50} değerini 66 μM (Şekil 16) olarak hesapladı. Ayrıca 5F-NPB-22 maddesi verilmeden önce, kontrol grubu ile diğer grup ortalamaları arasında fark yok iken ($p>0,05$), madde uygulamasından 48, 72 ve 96 saat sonra 10, 50 ve 100 μM konsantrasyon gruplarında alınan ölçüm ortalamaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). (Şekil 17, Şekil 18, Tablo 4).

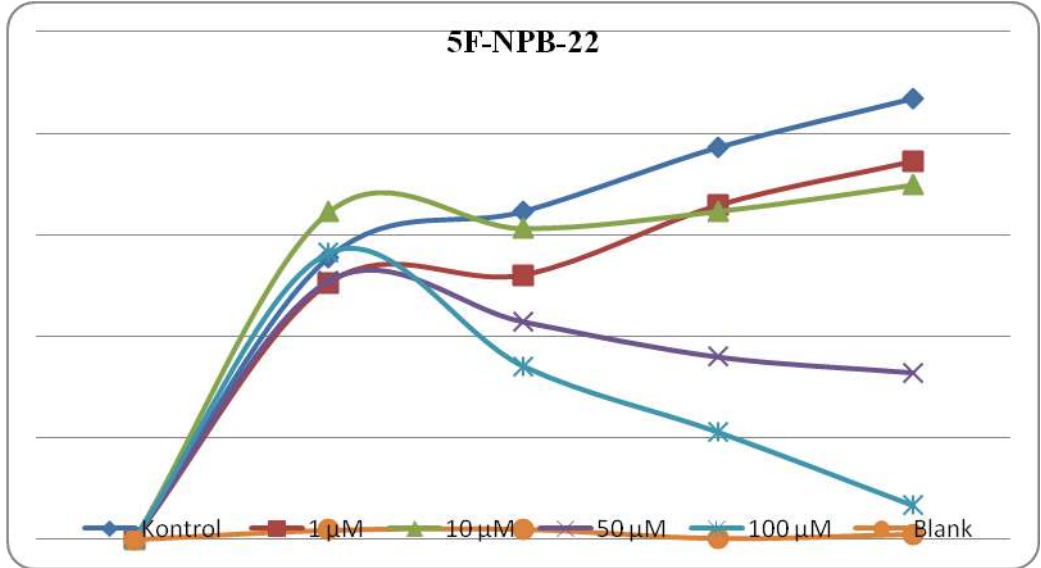
5F-NPB-22 maddesinin 1 μM konsantrasyonunda hücre proliferasyonunda azalma kontrol grubuna ve zamana göre bakıldığında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p>0,05$). 10, 50 ve 100 μM konsantrasyonunda hücre proliferasyonundaki azalma kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0,05$). Zamana göre bakıldığında da 10 μM grubunda hücre proliferasyonundaki azalma 48nci saatte başlarken, 50 ve 100 μM grubunda hücre proliferasyonundaki azalma 24ncü saatten itibaren başlamıştır ($p<0,05$).



Şekil 16. RTCA Software 1.2.1' de hesaplanan THLE-2 hücrelerinde 5F-NPB-22'ye ait IC_{50} değeri.



Şekil 17. 1µM, 10µM, 50µM ve 100µM konsantrasyonlarına ait gerçek-zamanlı hücre analizi proliferasyon eğrileri. kırmızı: kontrol, yeşil: 1µM, lacivert: 10 µM, pembe: 50 µM, turkuaz: 100 µM, mor: boş okuma.



Şekil 18. RTCA Software 1.2.1' de hesaplanan THLE-2 hücrelerinde farklı 5F-NPB-22 konsantrasyonlarına ait hücre indeks değerlerinin zamana bağlı değişim grafiği.

Tablo 4. 5F-NPB-22 maddesinin hücreye uygulanmasından 24, 48, 72 ve 96 saat sonra gruplar arasında alınan ölçüm ortalamaları. a: kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $p<0,05$.

Gruplar	24 saat sonra	48 saat sonra	72 saat sonra	96 saat sonra	p_{zaman}
	Ort $\pm$ SS	Ort $\pm$ SS	Ort $\pm$ SS	Ort $\pm$ SS	
Kontrol	1,44 $\pm$ 0,26	1,55 $\pm$ 0,11	1,83 $\pm$ 0,09	2,07 $\pm$ 0,1	0,074
1 μ M	1,42 $\pm$ 0,14	1,52 $\pm$ 0,2	1,65 $\pm$ 0,04 ^a	1,83 $\pm$ 0,08	0,070
10 μ M	1,59 $\pm$ 0,07	1,56 $\pm$ 0,04	1,62 $\pm$ 0,02 ^a	1,75 $\pm$ 0 ^a	0,022
50 μ M	1,32 $\pm$ 0,04	1,08 $\pm$ 0,04 ^{abc}	0,89 $\pm$ 0,01 ^{abc}	0,74 $\pm$ 0,08 ^{abc}	0,007
100 μ M	1,43 $\pm$ 0,19	0,89 $\pm$ 0,2 ^{abc}	0,49 $\pm$ 0,06 ^{abcd}	0,25 $\pm$ 0,19 ^{abcd}	0,005
p_{grup}	0,387	<0,001	<0,001	<0,001	

a:Kontrol grubu, b: 1 μ M, c: 10 μ M, d: 50 μ M

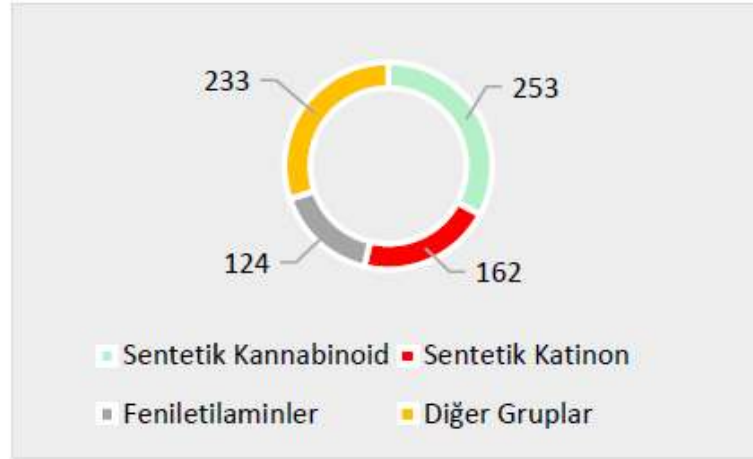
5. TARTIŞMA

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de hızla yayılan yeni psikoaktif maddeler ile mücadele, 2006 yılında kuruluş çalışmalarına başlanan ve 2008 yılında tam anlamıyla hayata geçirilen TUBİM Erken Uyarı Sistemi (EWS: Early Warning System) Ulusal Çalışma Grubu aracılığıyla yapılmaktadır.

Yılda en az 2 defa düzenli olarak toplantılar yapılmak suretiyle faaliyetlerine devam eden Erken Uyarı Sistemi içerisinde birçok kurum temsilcisi yer almaktadır.

Düzenlenen toplantılarda gerek uluslararası kuruluşlar gerekse kurumlarımızca tespit edilen yeni psikoaktif maddelerin ülkemiz için oluşturacağı riskler değerlendirilmekte ve uygun görülen maddelerin 2313 sayılı “*Uyuşturucu Maddelerin Murakabesi Hakkında Kanun*” kapsamına alınması süreci başlatılmaktadır. 2015 yılında hayata geçirilen *Jenerik Sınıflandırma Sistemi* ile de yeni psikoaktif maddelerin birçoğunun daha ülkemize girmeden kanun kapsamına alınması sağlanmaktadır.

22’nci EWS Ulusal Çalışma Grubu toplantısı ile 2018 yılında toplam 27 yeni psikoaktif madde, kanun kapsamına alınmıştır.



Şekil 19. Kanun Kapsamına Alınan Yeni Psikoaktif Maddeler (2008-2018).

2008 yılından bugüne kadar Erken Uyarı Sistemi çerçevesinde toplam 772 yeni psikoaktif madde kanun kapsamına alınmıştır. Bu maddelerden 426 tanesi tek tek sayma usulü ile 346 tanesi ise *Jenerik Sınıflandırmayla* yasa kapsamına dahil edilmiştir. 2313 sayılı Kanun kapsamına alınan maddelerin dağılımına bakıldığında; 253 tanesinin sentetik kannabinoid, 162 tanesinin sentetik katinon, 124 tanesinin ise feniletilamin

grubu maddeler olduğu gör÷lmektedir¹.

Dünya çapındaki tüm adli toksikoloji laboratuvarlarında, bu maddelerin kullanım sıklıkları arttıkça ve yapıları sürekli değıştikçe bu maddeleri saptamak için sürekli yeni yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Adli analizler için kimyasal referans standart maddelerle valide edilmiş çoklu madde analizine imkân veren yöntemlerin geliştirilmesi; bu referans standart maddelerin üretimlerinin zorluğu ve sınırlı olmasından dolayı büyük bir sorun teşkil etmektedir. Referans materyallerinin (iç standartlar dahil) geleneksel suiistimal edilen maddelerin aksine piyasada ticari olarak bulunmadıkları için temin edilmesi zor veya imkansızdır. Bu durum maddelerin tespiti ile ilgili mevcut adli bilimler laboratuvarlarını sınırlamaktadır. Üstelik, sadece kısa veya nadiren karşılaşılan bu maddeler için referans standart kütüphanesini sürekli yenilemek, çoğu adli laboratuvar için maliyetli ve uzun süreli olmaktadır¹³⁰.

Birçok analitik protokol, ilk kalitatif saptamayı ardından doğrulama veya miktarsal analiz içermektedir. Bu yeni maddelerin bir kısmı dışında, literatürdeki farmakokinetik ve farmakodinamik bilgi eksikliği, elde edilen sonuçların yorumlanmasını imkânsız kılmaktadır. Bu maddelerin reseptör etkinliği ve reseptöre bağlanma afinite profilleri hakkındaki insan metabolizma çalışmaları eksiktir. Bundan dolayı toksikologlar bu maddelerin varlığı ya da yokluğunun doğrulanması dışında pek bir şey söyleyememektedirler. Ayrıca bu maddelerin kantitatif analiz çalışmaları için harcanan kaynakların, bu maddelerin tespit edilmesine ek bir değer sağlayıp sağlamadığı tartışılmaktadır¹³⁰.

Yorumlamak için dikkate alınması gereken diğer faktörlerden biri bu bileşiklerin kararsızlığını içermektedir. Örneğin, sentetik katinonların tümü olmasa da çoğunun kararsız olduğu iyi bilinmektedir. Bununla birlikte; zaman, sıcaklık, numune tipi ve koruyucu parametreleriyle numunelerin saklanması yeni tasarım psikoaktif (YTP) maddelerin çoğu için incelenmemiştir. Yeniden dağılım ile ilgili postmortem sorunlar hakkında daha da az şey bilinmektedir. Hem yasal hem de kurumsal etik komite düzenlemelerinde, insan dokusuna erişimin artan düzenlemesi göz önüne alındığında, bugünlerde çok sayıda postmortem araştırmanın anlaşılabilir bir şekilde mümkün olmadığı bir gerçektir. Daha da önemlisi, sentetik kannabinoid tanımlamasında ilgili hedefleri sağlamak için YTP ilaç metabolizması çalışmalarına duyulan ihtiyaç çok önemlidir, eğer mevcut tek örnek idrar ise metabolitlerin tanımlanması ve hidroliz

reaktifleri ve koşullarının değerlendirilmesi gerekmektedir¹³⁰.

Bu tez çalışmasının ilk aşaması yeni tasarım psikoaktif maddelerden 5F-NPB-22 maddesinin LC/Q-TOF MS cihazında tanımlamak olmuştur. Çalışmadaki amacımız, bu maddenin in vitro metabolizmasını karaciğer hücre hattı kullanarak incelemek ve metabolitleri belirlemektir. Bu sentetik maddeler genellikle yüksek oranda metabolize olduklarından, sentetik kannabinoid alımını belgelemek için kullanılan analitik bir yöntem, maddelerin idrardaki metabolitlerini hedeflemelidir. Bunun için THLE-2 karaciğer hücre hattında maddenin inkübasyonunda sonra toplanan örneklerin yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (LC/Q-TOF MS) ile analizleri yapılmıştır. Elde edilen kromatogramdaki metabolitleri belirlemek için kromatogram üzerinde ham verilerin işlendiği ve maddelerin yapısına bağlı olarak çözümleme yapılan bir program kullanmak gerekmektedir. Bizim çalışmamızda da metabolit belirlemek için Agilent MetaboliteID yazılımı kullanılarak 3 farklı ana metabolit belirlenmiştir. Şekil 15'te gösterildiği gibi karmaşık cihaz verileri incelendiğinde, detaylı tarama yapıldığında daha fazla metabolit olduğu gözlenmektedir. Ama bunların metabolit olduğunu söyleyebilmek için daha güçlü sinyallerin alınması gerekmektedir. Örneğin; standart 5F-NPB-22'nin kütle spektrumunda m/z 233,1082 iyonu metabolit gibi spektrum vermekte ancak bu iyon ana maddenin parçalanma ürünü de olabileceği için sonuçlar değerlendirilirken dikkatli olunmalıdır.

İndoal yapıları PB-22 ve onun floro analogu 5F-PB-22 ilk kez bir kinolin alt yapısı ve bir ester bağı içeren yapılardır. 5F-NPB-22'de benzer bir yapıdır. Bu bileşikler kararsız ester bağı içerirler. Ester bağları, kendiliğinden veya endojen olarak, spesifik olmayan estera hidrolizi yapan kararsız bağlardır¹³². Bu yüzden hızlı bir şekilde metabolize olurlar. Sentetik kannabinoid alımını belgelemek için kullanılan analitik yöntem, yüksek oranda metabolize olan maddeleri idrardaki metabolitlerini belirlemeyi hedeflemelidir. İdeal olarak, adli madde analizlerinde her bir ana bileşiğe özgü yoğun metabolitler hedeflenmelidir. Belirlenen yoğun metabolitin pozitif idrar örnekleri ile karşılaştırılıp yöntemin desteklenmesi gerekmektedir. Bizim çalışmamızda 5F-NPB-22 maddesinin metabolitlerinden en yüksek pik alanını veren iyon m/z 251,1186 ester hidroliz ürünü olarak belirlenmiştir. Bu iyonun kesin ana metabolit iyonu olduğunu söylemek için pozitif idrar örnekleri ile konfirme etmek ileride yapacağımız çalışmalar arasında yer almaktadır.

Kanla karşılaştırıldığında yeterli numune hacmi ve yüksek ilaç konsantrasyonları nedeniyle idrar en yaygın madde saptama matrisidir; bu nedenle hedef olarak idrar metabolitlerin belirlenmesi önemlidir. Ekstrahepatik metabolizma, taşıyıcılar ve metabolitlerin idrarda zenginleşmesi gibi bazı faktörler, idrar metabolitlerinin nispi bolluğunu ve dolayısıyla tanımlayıcı belirteçlerin seçimini etkileyebilir. Bu nedenlerle, majör hepatosit metabolitlerinin idrar metabolitleri ile eşleştirmesini doğrulamak için gerçek idrar numunelerinin alınması tercih edilmelidir¹²⁴.

Sentetik kannabinoid olan THJ-018 ve onun 5-floro analogu THJ-2201'in metabolizmasını karakterize etmek için Diao ve ark. insan hepatositlerinde inkübasyondan sonra yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi (HR-MS)(Triple TOF 5600+) kullanmışlardır. Bu çalışmada da yeni tasarım psikoaktif maddelerin yaygınlığının artmasına rağmen, hiçbir insan metabolizma datalarının güncel olarak bulunmadığından bahsetmişlerdir. 10 µmol/L THJ-018 ve THJ-2201 3 saat insan hepatositlerinde inkübe edildikten sonra optimal metabolit markerları belirlenmiştir. Bu maddelerin alımının belirlenmesi için laboratuvarların kullanacağı uygun veriler oluşturmuşlar ve bu verilerin yeni sentetik kannabinoidlerin oluşturduğu olumsuz etkilerle bağlantılı olarak belirtmişlerdir¹²⁴.

Yacine ve ark. yaptığı çalışmada yine insan karaciğer mikrozomları farklı konsantrasyonlardaki ilaçla inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda uygulanan işlemlerden sonra toplanan örnekler LC/Q-TOF MS'te yapı tayini için analiz edilmiştir. 25B-NBOMe maddesinin metabolitlerini belirlemeye çalışmışlardır. 12 CYP türevi, 9 UGT türevli metabolit tanımlanmıştır. CYP ve UGT enziminin toplam dağılımı % 80 den fazla olsa bile, diğer önemli enzimatik reaksiyonların (sülfasyon, metilasyon, asetilasyon, glutatyon konjugasyon gibi) oluşabileceğini belirtmişlerdir. Bu enzimatik reaksiyonları çalışmamış olsalarda, kütüphanelerinde kayıtlı olan metabolit bilgileri ile 25B-NBOMe maddesinin metabolitlerinin karakterize edilebileceğini ve bu maddenin kullanıcılarının tespit edilebileceğini belirtmişlerdir¹²⁵.

Atasoy ve ark. denetimli serbestlik hastalarında sentetik kannabinoid kullanım sıklığını belirlemek için bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada, Ege Üniversitesi Madde Bağımlılığı, Toksikoloji ve İlaç Bilimleri (BATI) Enstitüsü'nde analiz edilen ve analiz sonucu negatif olan 500 idrar numunesinde LC-MS/MS cihazı ile sentetik kannabinoid taraması yapılmıştır. Çalışılan 500 idrar numunesinin 72'si (%14,4) pozitif

bulunmuştur. En çok tespit edilen iki sentetik kannabinoidten biri 5F-NPB-22 ve bu maddenin bulunma sıklığı %58 olarak belirlenmiştir. Çalışmaya göre kullanılan ön tarama testlerinin yetersiz olduğu, idrar örneklerinin ileri kromatografik yöntemler ile doğrulanması gerektiği görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada yalancı negatif sonuçlardan kaçınabilmek için adli toksikoloji laboratuvarlarında sentetik kannabinoidler ve metabolitlerinin tespitine yönelik hassas analitik bir yöntem geliştirmişlerdir⁸.

Negreira ve ark. nitracaine adlı yeni psikoaktif maddenin in vitro ve in vivo insan metabolitlerinin belirlenmesi için bir çalışma yapmışlar ve LC/Q-TOF MS'i kullanarak bu metabolitleri belirlemişler. Çalışmanın amacı, nitracaine'nin in vitro metabolizmasını insan karaciğer mikrozom inkübasyonlarını kullanarak incelemek ayrıca faz 1 metabolizmasından sorumlu sitokrom P450 enzim izoformlarını değerlendirmek ve gerçek kullanıcıların idrar örnek sonuç dataları ile in vitro deneylerin bilgilerini karşılaştırmaktır. Metabolitlerin doğru kütlelerini belirlemek ve metabolitlerin yapısal tanımlaması için LC/Q-TOF MS cihazını kullanmışlardır. İn vitro deneylerde, 2 major ve 3 minör faz 1 metaboliti , faz 2 metabolizma deneylerinde 1 tane glukuronidasyonlu ürün belirlemişlerdir. Bütün bu in vitro metabolitler insan idrarında da gösterilmiştir. Dolayısıyla bu maddenin in vivo metabolizmasının tahmininde in vitro deneylerin güvenilirliğini ortaya koymaktadır¹³¹.

Wohlfarth ve ark. 2014 yılında insanda PB-22 ve 5F-PB-22 metabolizmasını araştırmışlardır. Bu maddeler bir ester grubu bulunan ilk sentetik kannabinoidler olarak ilgi çekicidir. PB-22 ve 5F-PB-22 metabolik profilini belirlemek için, insan karaciğer hücre hattı ile bu maddeler inkübe edildikten sonra toplanan numuneler yüksek çözünürlüklü sıvı kromatografisi kütle spektrometresi yöntemini kullanarak analiz etmişlerdir. Sentetik maddelerin bir çoğu metabolize olduğu için, idrarda bunların belirlenmesinin maddelerin kullanımı gösteren önemli bir yaklaşım olduğunu belirtmişlerdir¹³².

Madde alımının kanıtının gerekli olduğu ancak orijinal molekülün bulunamadığı adli durumlarda maddenin bulunamaması bir sorun haline gelebilir. Bu gibi durumlarda, ana bileşiğin yapısını yeniden yapılandırmak için küçük katkılar sağlayacak olsa bile spesifik metabolitler hedeflenmelidir¹³².

Genel olarak bu sonuçlar, sentetik kannabinoidlerin metabolitlerinin toksikolojik profillerinin, bu maddelerin uzun vadeli veya kronik yan etkilerini anlamak için anahtar

olabileceğini düşündürmektedir¹²³. Ayrıca metabolizma sonuçlarının elde edilmesi farmakodinamik etkilerin değerlendirilmesi için de önemlidir¹²⁴.

Hepatositler, ilaç eliminasyonunda karaciğerdeki metabolik dönüşümün yalnızca bir adımını yansıttıkları için kontrollü insan çalışmalarının yerini alamazlar. Ekstrahepatik metabolizma, enterohepatik dolaşım, renal filtrasyon, yeniden emilim ve salgılamının yanı sıra dağıtım süreçleri, ana maddenin metabolitlerini ve konsantrasyonlarını değiştirebilir. İnsanlardaki ana metabolitleri farklı matrislerde doğrulamak için altın standart her zaman kontrollü bir uygulama çalışması olmuştur. Ancak, sentetik kannabinoidler söz konusu olduğunda, güvenlik verilerinin olmaması nedeniyle bunun başarılması zor olmaktadır¹³². Ayrıca, kontrollü SK uygulama çalışmaları, etik sınırlamalar nedeniyle ciddi şekilde kısıtlanmıştır.

Gerçek eşleştirilmiş idrar ve kan örneklerinin kullanılması ana bileşiğin varlığının kanda tanımlanabilmesi alternatif bir yaklaşımdır. Çalışmamızda bulunan metabolitlerin pozitif gerçek idrar örnekleri ile karşılaştırılması planlanmıştır. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaşanan Kovid-19 salgını nedeniyle laboratuvar çalışmaları planlanan zamanda yapılamamıştır. Bu nedenle bekletilen idrar örnekleri bozulmuş ve çalışılmıştır. Bu da çalışmamızın bir kısıtlılığıdır.

Çalışmamızın bir diğer aşaması 5F-NPB-22 maddesinin xCELLigence DP Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Cihazı kullanılarak sitotoksik etkileri incelenmiştir. Kontrol ve 5F-NPB-22 konsantrasyonları hesaplanarak deney grubu oluşturuldu ve maddeler E-plate sistemine yerleştirildi. Uygun konsantrasyonlar 5F-NPB-22 için 1 µM, 10 µM, 50 µM ve 100 µM olarak belirlendi. Bileşik aktivitesini izlemek için 96 saat boyunca gerçek zamanlı hücre analiz cihazında okuma alındı. Cihazda yapılan okuma sonucunda elde edilen proliferasyon eğrilerinin zamana bağlı grafiğine göre 5F-NPB-22 maddesi için hücrelerin yarısını öldürmeye yetecek toksik değer IC₅₀ değeri 66 µM olarak hesaplanmıştır. Yapılan çalışmanın kontrolünü sağlamak için aynı konsantrasyonun hücreye tekrar verilip yöntemin doğruluğunun kontrolü yapılabilir. Aynı zamanda 5F-NPB-22 maddesinin apoptoz/nekroz gibi farklı hücre ölümü mekanizmaları bakılabilir. Çalışmamızda THLE-2 karaciğer hücrelerini -80°C' de çoğaltarak saklamıştık. Dondurucu bozulduğu için bakmayı planladığımız hücre ölümü yöntemi, hücrelerin canlılık özelliğini kaybetmesinden dolayı yapılamadı. Dondurucunun zamansız bir şekilde bozulması çalışmamızın ikinci önemli kısıtlılığıdır.

5F-NPB-22 maddesinin 1µM konsantrasyonunda hücre proliferasyonunda azalma kontrol grubuna ve zamana göre bakıldığında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($p>0,05$). 10, 50 ve 100 µM konsantrasyonunda hücre proliferasyonundaki azalma kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0,05$). Zamana göre bakıldığında da 10µM grubunda hücre proliferasyonundaki azalma 48nci saatte başlarken, 50 ve 100 µM grubunda hücre proliferasyonundaki azalma 24ncü saatten itibaren başlamıştır ($p<0,05$). Bu bize uygulanan maddenin miktarı arttıkça maruz kalma süresi uzadıkça maddenin hücre canlılığına verdiği zararın artacağını göstermektedir. Literatürde 5F-NPB-22'nin sitotoksik etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle elde edilen bu değerin diğer çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

2014 yılından beri bir çok Avrupa ülkesinde ve aynı zamanda Türkiye'de satılan 5F-ADB(metil2-[[1-(5-floropentil)-1H-indazol-3-karbonil]amino]-3,3 dimetilbütanoat), sıklıkla kötüye kullanılan sentetik kannabinoidlerden biridir. Yeter ve ark. yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisini (LC-HRMS) kullanarak insan karaciğer mikrozom (HLM) inkübasyonları ile 5F-ADB'nin in vitro metabolizmasını incelemişlerdir. Gerçek idrar numunelerinin analizleri ile in vivo metabolizması incelemiş ve in vitro çalışmasından alınan verilerle karşılaştırmışlardır. 3 saatlik inkübasyondan sonra ana bileşiğin hiç saptanamadığını belirtmişlerdir. Elde ettikleri 3 metaboliti 5F-ADB'nin alımını kanıtlamak için hassas ve spesifik idrar belirteçleri olarak tanımlamışlardır¹³³.

İnsan hepatositleri, SK'lerin insan metabolitlerini tanımlamak için HLM'ye göre birçok avantaj sunar. Hepatositler, tüm faz I ve II ilaç metabolize edici enzimleri, kofaktörleri (NADPH gibi) ve ilaç taşıyıcılarını içeren fizyolojik karaciğer ortamını daha çok temsil eder. Fizyolojik bir karaciğer ortamını daha iyi simüle etmek için HLM yerine insan hepatositleri seçilmektedir. Ek olarak, bileşiklerin metabolize edilmeden önce hücre zarlarından geçmesi gerekir ki bu HLM için geçerli değildir. Hepatosit inkübasyon modelinin AB-FUBINACA, AB-PINACA ve AH-7921 tüketimini doğrulamada başarılı olduğu kanıtlanmıştır¹²⁴. HLM çalışmalarında ara basamaklara olması istenen reaksiyolar için belirli kofaktörler, koenzimler, katkı maddeleri eklenmektedir. Bu durumda olası konjugasyon reaksiyonları bilinmektedir. Bizim çalışmamızda hepatositler kullanılmıştır. Bu yüzden HLM çalışmalarında olduğu gibi konjugasyonlar bilinmemektedir. Belirlediğimiz metabolitler LC/Q-TOF MS cihazında kullandığımız yazılım sayesinde yoğun sinyallerin cihazın verdiği kapalı formüllerle

karşılaştırılmasıyla elde edilmiştir.

İnsan hücre hattında faz 1 metabolitleri ile ilgili bir çalışmayı Joana ve ark. yapmışlardır. Çalışmada nöroblastom (SH-SY5Y) ve böbrek (HEK-293T) hücre hatları JWH-018 ve metaboliti N-(3-hidroksipentil)'e maruz bırakılmıştır. Hücre toksisitesi MTT ve LDH protokolleri ile değerlendirilmiştir. Ayrıca çift boyama metodolojisiyle hücre ölümünün apoptoz mu yoksa nekroz mu olduğu gösterilmiştir. Sonuçlara göre JWH-018'in anlamlı bir şekilde hücre canlılığında azalmaya neden olmadığı ama metabolitin 25µM üstünde önemli azalma olduğunu belirtmişlerdir. Her iki hücre hattı da metabolitten etkilenmiştir yani toksisitesinin daha fazla olduğu belirtilmiştir¹²³.

Sentetik kannabinoidlerin kötüye kullanımı, birçok acil servis ve ölümle sonuçlanan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Hükümetler tarafından yasadışı uyuşturucu planlamasına rağmen, yeni SK'ler sürekli olarak tanıtılmaktadır. Bu büyüyen zorluğa karşı koymak için küresel işbirliği kritik öneme sahiptir. Bunlarla ilgili çaba gösteren Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (EMCDDA), Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi (UNODC), Amerika Uyuşturucu Kullanımı Erken Uyarı Sistemi (EWS) kuruluşları bulunmaktadır. İzleme için maddelerin belirleyici metabolitlerinin hızlı bir şekilde yayınlanması ve insan idrar örneklerinde de çalışılması gereklidir.

Başlıca engeller, hedeflenmemiş idrar SK taraması için gerekli cihazların maliyeti, SK insan hepatosit inkübasyonlarının enjeksiyonundan sonra elde edilen oldukça karmaşık cihaz verileri, optimal SK majör metabolitlerini belirlemek için gereken zaman ve becerilerdir. Ayrıca, hedeflenmemiş SK tarama tekniklerinde üretilen verilerin boyutu çok büyüktür. Bu yüzden verimli ve doğru veri tabanlarının oluşturulması için yeni tekniklerin geliştirilmesi gereklidir.

Sentetik kannabinoid metabolit taraması ve doğrulama analizlerinin, ortaya çıkan SK alımını belirlemek için sürekli olarak güncellenmesi gerekir. Adli toksikoloji laboratuvarları ile analitik standartların meşru tedarikçileri arasındaki işbirliği, gelecekteki SK salgınlarına daha iyi hazırlık ve daha zamanında yanıt verilmesiyle sonuçlanabilir. Klinisyenler ve sağlık personeli tarafından artan tanınma ve raporlama, devam eden bu SK salgınıyla mücadeleye yardımcı olabilir. Klinisyenlerin ve sağlık personelinin yerel eğilimlerden haberdar olması ve gerektiğinde eczacılar, kanun uygulayıcılar, toksikologlar ve psikiyatristler ile ortaklaşa SK alımını ve bunların ortaya

ıkan toksisitelerini tartışması nemlidir¹³⁴.

Ayrıca diğer yaklaşımlarla karşılaştırıldığında, örn. insan karaciğer mikrozomları ile inkübasyon veya sıçanlara kontrollü ilaç uygulaması, insan hepatositleri, metabolitlerin belirlenmesinde en gerçekçi spektrumu saęlamaktadır¹³⁴.

Diao ve ark. yaptıkları çalışmada, insan hepatositleri ve insan karaciğer mikrozomları (HLM) gibi en yaygın in vitro metabolizma modellerini avantajları ve dezavantajları ışığında karşılaştırmışlardır. Ayrıca in silico yazılım tahmini, in vivo sıçan, zebra balığı inkübasyonu ve mantar Cunninghamella elegans (C. elegans) modelleri gibi diğer yaklaşımları da gözden geirmışlerdir. İnsan karaciğer mikrozomları ile inkübasyon veya sıçanlara kontrollü ilaç uygulaması, bütün yaklaşımlarla karşılaştırıldığında, metabolitlerin belirlenmesinde en gerçekçi sonuçları sağladığını belirtmişlerdir.¹³².

Bilimsel çalışmalardaki bilgi eksikliğinin yanı sıra yeni SK'lerin sürekli uyurucu kullanıcıları tarafından kullanımına devam edilmektedir. Hill ve ark. 5F-NPB-22 maddesinde dahil olduğu 5 sentetik kannabinoid reseptör agonistinin sentezini yapmışlardır. 160 hastanın kan ve idrar örneklerinde bu maddeleri belirlemişlerdir. Ancak sentezlenen 5 madde için toksisite ile ilişkili konsantrasyonlar mevcut olmadığından ve yayınlanmış nicel klinik vakalar bilinmediğinden, küçük numune boyutu, numuneye maruz kalma süresiyle ilgili belirsizlik ve birlikte alınan diğer katkıların nedeniyle toksisitenin ciddiyetini konsantrasyonla ilişkilendirmenin mümkün olmadığını belirtmiřlerdir⁶³.

5F-NPB-22 maddesinin kullanımı madde kullanıcıları arasında azalsada, literatrda henüz insan hepatosit çalışmaları yapılmamış, toksisite etkisi belirlenmemiştir. Bu durum çalışmamızın diğer çalışmalara öncülük edeceğini ve bu madde ile ilgili literatüre katkı sağlayacağını göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Bu çalışmada yeni tasarım psikoaktif maddelerden 5F-NPB-22' nin THLE-2 (ATCC® CRL-2706™) karaciğer hücre hattında 3 saat inkübasyonu sağlandı.
2. İnkübasyon sonucu hücre kültürü ortamından alınan örnekler LC/Q-TOF MS cihazında analiz edildi.
3. Cihazdan elde edilen ham veri dataların işlenmesi ve metabolitlerin değerlendirilmesi MetaboliteID yazılım programı ile yapıldı. 5F-NPB-22 maddesinin teorik olarak olası metabolitleri oluşturulup programa göre ester hidroliz ürünü, metil ester ve etil ester olmak üzere 3 ana metaboliti belirlendi. Bunlardan en yoğun olan ana metabolitin m/z 251,1186 olan ester hidroliz ürünü olduğu söylenebilir, ancak gerçek idrar örnekleriyle konfirme edilmesi gerekmektedir.
4. 5F-NPB-22 maddesinin farklı konsantrasyonları hazırlanarak xCelligence gerçek zamanlı hücre analiz cihazı kullanılarak sitotoksik etkileri incelendi. Deney okuma 96. saatte sonlandırıldı.
5. Yapılan gerçek zamanlı hücre analiz çalışmasında elde edilen proliferasyon eğrilerinin zamana bağlı grafiğine göre 5F-NPB-22 maddesi için hücrelerin yarısını öldürmeye yetecek toksik değer IC₅₀ değeri 66 µM olarak bulundu.
6. Sitotoksisite deney sonuçlarına göre, uygulanan maddenin miktarı arttıkça ve maruz kalma süresi uzadıkça maddenin hücre canlılığına verdiği zararın artacağı gösterildi.
7. Sentetik kannabinoidlerin metabolitlerinin toksikolojik profillerinin belirlenmesi, bu maddelerin uzun vadeli ve kronik yan etkilerini anlamak için anahtar olabileceğini düşündürmektedir.
8. Adli ve klinik laboratuvarların sentetik kannabinoidlerin yeni belirteçlerini tarama yöntemlerine dahil etmesi için, sentetik kannabinoidlerin metabolik profilleri belirlenmelidir. Sentetik kannabinodlerin de birçok metaboliti ana maddeden daha fazla toksisite göstermektedir. Bu yüzden madde alımının gösterilmesi için çeşitli in vitro ve in vivo sistemler kullanılarak sentetik kannabinoidlerin metabolitleri belirlenmelidir.

9. Sentetik kannabinoid kullanımının sürekli artması önemli bir halk sağığı sorunudur. Bu büyüyen zorluklar karşısında küresel işbirliğı büyük öneme sahiptir. Devlet kurumları ve bilim topluluğı arasında hızlı bilgi paylaşımı yapılmalıdır.
10. İdrarda sentetik kannabinoid taraması için ve insan hepatosit inkübasyonlarından sonra elde edilen karmaşık cihaz verilerinden ana metabolitleri belirlemek için zamana ve deneyimli personele ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca bunların belirlenmesi için verimli ve doğru tekniklerin geliştirilmesi ve sürekli güncellenmesi gerekmektedir.
11. Adli toksikoloji laboratuvarları ile analitik standartların tedarikçileri arasındaki işbirliğı, gelecekteki sentetik kannabinoid kullanımını belirlemek için daha hazırlıklı bir alt yapı ile hızlı yanıt verilmesiyle sonuçlanabilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Türkiye uyuşturucu raporu.** EGM Yayın Katalog No: 703, 2019, Ankara.
2. **Asicioglu Faruk.** New Psycho-Active Substances: The Legal Procedure Used in European Union Countries and Turkey. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni, 2010; Cilt: 20, Sayı: 4.
3. **Dresen S, Ferreira N, Putz M, Westphal F, Zimmermann R, Auwarter V.** Monitoring of herbal mixtures potentially containing synthetic cannabinoids as psychoactive compounds. J Mass Spectrom. 2010; 45(10): 1186-1194.
4. **Graham, S.E., Peterson, J.A.** ‘‘How similar are P450s and what can their differences teach us’’, Arch. Biochem. Biophys. 1999;369, 24-29.
5. **Werck-Reichhart, D, Feyereisen, R.** ‘‘Cytochromes P450: a success story’’, Gen. Biol. 2001. 1,1-8.
6. **Kong T.Y., Kim J.H., Kim D.K. Lee H.S.** Synthetic cannabinoids are substrates and inhibitors of multiple drug-metabolizing enzymes. Arch. Pharm. Res. 2018 Jul;41(7):691-710.
7. **Efeoğlu P.** İnhalasyon yoluyla Kannabimimetik etkiler gösteren bitkisel ürüne maruz kalan ratların biyolojik örneklerinde sentetik kannabinoid tespiti. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 2017.
8. **Atasoy A.** Denetimli Serbestlik Hastalarında Sentetik Kannabinoidlerin Kullanım Sıklıklarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 2019.
9. **Ulugöl A.** Kannabis Bitkisi ve Kannabinoidlere Giriş. Türkiye Klinikleri:J Pharmacol-Special Topics 2018;6(1):1-5.
10. **The Health Effects of Cannabis and Cannabinoids:** The Current State of Evidence and Recommendations for Research. The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. Washington (DC)2017.
11. **ElSohly M, Gul W.** Constituents of Cannabis Sativa. In: Pertwee R, editor. Handbook of Cannabis. New York: Oxford University Press; 2014. p. 3-22.
12. **Hillig KW.** Genetic evidence for speciation in Cannabis (Cannabaceae). Genet Resour Crop Ev 2005;52(2):161-80.
13. **de Lamarck JB.** Encyclopédie méthodique: botanique. Paris, France 1785. p. 694-5.

14. **Laursen L.** The cultivation of weed. *Nature* 2015; 525(7570):S4-S5.
15. **Small E.** Evolution and Classification of *Cannabis sativa* (Marijuana, Hemp) in Relation to Human Utilization. *Bot Rev* 2015; 81(3):189-294.
16. **Turner CE, Elsohly MA, Boeren EG.** Constituents of *Cannabis-Sativa* L .17. A Review of the Natural Constituents. *J Nat Prod* 1980; 43(2):169-234.
17. **Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG.** Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Brit J Pharmacol* 2007;150(5):613-23.
18. **Iffland K, Grotenhermen F.** An Update on Safety and Side Effects of Cannabidiol: A Review of Clinical Data and Relevant Animal Studies. *Cannabis Cannabinoid Res* 2017;2(1):139-54.
19. **Hillig KW, Mahlberg PG.** A chemotaxonomic analysis of cannabinoid variation in *Cannabis* (Cannabaceae). *Am J Bot* 2004;91(6):966-75.
20. **Fischedick JT, Hazekamp A, Erkelens T, Choi YH, Verpoorte R.** Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L, cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochemistry* 2010; 71(17-18):2058-73.
21. **McPartland JM, Duncan M, Di Marzo V, Pertwee RG.** Are cannabidiol and Delta(9)-tetrahydrocannabinol negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. *Brit J Pharmacol* 2015;172(3):737-53.
22. **Vemuri VK, Makriyannis A.** Medicinal Chemistry of Cannabinoids. *Clin Pharmacol Ther.* 2015;97(6):553-8.
23. **Schrot RJ, Hubbard JR.** Cannabinoids: Medical implications. *Annals of Medicine* 2016; 48(3):128-41.
24. **Akgür SA, Coşkunol H.** Bağımlılık Yapan Maddeler ve Toksikolojisi. Ege Üniversitesi Yayınları. Madde Bağımlılığı,Toksikoloji ve İlaç Bilimleri Enstitüsü Yayın No:3, İzmir 2014.
25. **World Health Organization.** Neuroscience of Psychoactive Substance Use and Dependence. 2004; Geneva.
26. **Iversen LL.** The Science of Marijuana. Oxford University Press, New York,2008.
27. **Wollner HJ, Matchett JR, Levine J, Loewe S.** Isolation of a physiologically active tetrahydrocannabinol from *Cannabis sativa* resin. *Journal of the American Chemical Society,* 1942;64(1):26-29.

28. **Gaoni Y, Mechoulam R.** Isolation, Structure and Partial Synthesis of an Active Constituent of Hashish. *J Am Chem Soc*, 1964;86(8):1646-1647.
29. **Levine B.** Principles of Forensic Toxicology. 2nd. Ed, AACPress:Washington, 2003.
30. **Karch SM.** Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Abused Drugs, CRC Press 2008.
31. **Mackie K.** Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *Journal of neuroendocrinology*, 2008;20 Suppl 1:10-4.
32. **Demuth DG, Molleman A.** Cannabinoid signalling. *Life sciences* 2006;78(6):549-63.
33. **Benard G, Massa F, Puente N, Lourenco J, Bellocchio L, Soria-Gomez E.** Mitochondrial CB(1) receptors regulate neuronal energy metabolism. *Nature neuroscience* 2012;15(4):558-64.
34. **Maccarrone M, Wenger T.** Effects of cannabinoids on hypothalamic and reproductive function. In: Pertwee RG, editor. *Cannabinoids*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005; (168): 555-571.
35. **Mackie K.** Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. In: Pertwee RG, editor. *Cannabinoids*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005; (168):299-325.
36. **Szabo B.** Effects of phytocannabinoids on neurotransmission in the central and peripheral nervous systems. In: Pertwee RG, editor. *Handbook of Cannabis*. UK: Oxford University Press; 2014. 157-173.
37. **Pertwee RG.** The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *International Journal of Obesity* 2006;30:13-8.
38. **Bouaboula M, Rinaldi M, Carayon P, Carillon C, Delpech B, Shire D.** Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes. *European Journal of biochemistry* 1993;214(1):173-80.
39. **Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P.** Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European journal of biochemistry* 1995;232(1):54-61.
40. **Pertwee RG.** Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacology & therapeutics* 1997;74(2):129-80.
41. **Shire D, Carillon C, Kaghad M, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G.** An aminoterminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing. *The Journal of biological chemistry* 1995;270(8):3726-31.

42. **Djeungoue-Petga MA, Hebert-Chatelain E.** Linking Mitochondria and Synaptic Transmission: The CB1 Receptor. *Bioessays*. 2017.
43. **Cota D.** CB1 receptors: emerging evidence for central and peripheral mechanisms that regulate energy balance, metabolism, and cardiovascular health. *Diabetes/metabolism research and reviews* 2007;23(7):507-17.
44. **Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Batkai S.** Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *The Journal of clinical investigation* 2005;115(5):1298-305.
45. **Cabral GA, Griffin-Thomas L.** Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert reviews in molecular medicine* 2009;11:e3.
46. **Gong JP, Onaivi ES, Ishiguro H, Liu QR, Tagliaferro PA, Brusco A.** Cannabinoid CB2 receptors: immunohistochemical localization in rat brain. *Brain research* 2006;1071(1):10-23.
47. **Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA.** Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;1074:514-36.
48. **Fernandez-Ruiz J, Romero J, Velasco G, Tolon RM, Ramos JA, Guzman M.** Cannabinoid CB2 receptor: a new target for controlling neural cell survival? *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28(1):39-45.
49. **Romero-Sandoval EA, Kolano AL, Alvarado-Vazquez PA.** Cannabis and Cannabinoids for Chronic Pain. *Current rheumatology reports* 2017;19(11):67.
50. **Vemuri VK, Makriyannis A.** Medicinal chemistry of cannabinoids. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2015;97(6):553-8.
51. **Topuz RD.** Pharmacology of cannabinoids. *Türkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics* 2018;6(1):6-14
52. **Huestis M.A.** Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chemistry&Biodiversity*,2007; 4(8):1770-1804.
53. **Pertwee RG.** New developments in the pharmacology of cannabinoids, *Pharmacochemistry Library*, 2002; Vol 32, 249-258.
54. **Seely KA, Lapoint J, Moran JH, Fattore L.** Spice drugs are more than harmless herbal blends: A review of the pharmacology and toxicology of syntheticcannabinoids, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2012; 39(2,3), 234-243.

55. **Harris CR, Brown A.** Synthetic Cannabinoid Intoxication: A Case Series and Review, The Journal of Emergency Medicine. 2013;Vol 44, Issue 2,360-366.
56. **Gurdal F, Asirdizer M, Aker RG, Korkut S, Gocer Y, Kucukibrahimoglu EE.** Review of detection frequency and type of synthetic cannabinoids in herbal compounds analyzed by Istanbul Narcotic Department of the Council of Forensic Medicine, Turkey. Journal of Forensic and Legal Medicine, 2013;20(6), 667-672.
57. **EMCDDA 2009 Report.** http://www.emdocs.net/category/toxicology/march_3, 2014 by Cynthia Santos.
58. **Huffman JW, Dia D, Martin BR, Compton DR.** Design, synthesis and pharmacology of cannabinimimetic indoles. Bioorg Med Chem Lett. 1994; 4:563-566.
59. **Merola G, Aturki Z, D'Orazio G, Gottardo R, Macchia T, Tagliaro F, Fanali S.** Analysis of synthetic cannabinoids in herbal blends by means of nano-liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. December 2012; Volume 71, Pages 45-53.
60. **EMCDDA:** <http://www.emcdda.europa.eu/topics/pods/synthetic-cannabinoids#panel2>, 2009
61. **Dip A.** Synthetic cannabinoids and Synthetic cannabinoid abuse. Turkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics 2018;6(1):51-6.
62. **Bachliński R, Mroczek A.** Identification of a synthetic cannabinoid 5F-NPB-22 (indazole analog 5F-PB-22) by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) method. Forensic Practice. Issues of Forensic Science 2016;293(3).
63. **Hill SL., Dunn M, Cano C, Harnor SJ., Hardcastle IR., Grundlingh J, Dargan PI., Wood DM., S Tucker S, Bartram T. Thomas SHL.** Human Toxicity Caused by Indole and Indazole Carboxylate Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists: From Horizon Scanning to Notification. Clinical Chemistry. 2018;64:2,346-354.
64. **Alves VL, Gonçalves JL, Aguiar J., Teixeira HM, Câmara JC.** The synthetic cannabinoids phenomenon: from structure to toxicological properties. A review. Critical Reviews in Toxicology. 2020; 50:5, 359-382.
65. **Evren C, Bozkurt M.** Sentetik Kannabinoidler: Son Yılların Krizi. Düşünen Adam: Psikiyatri ve Nörolojik Bilimler Dergisi: 2013;26:1-11.
66. **Gertsch J, Peree RG, Di Marzo V.** Phytocannabinoids beyond the Cannabis plant - do they exist? Br J Pharmacol 2010;160(3):523-529.
67. **Carvalho A, Hansen EH, Kayser O, Carlsen S, Stehle F.** Designing Δ^9 microorganisms for heterologous biosynthesis of cannabinoids. FEMS Yeast Research. 2017; 17(4):fox037

68. **Cohen K, Weinstein A.** The effects of cannabinoids on executive functions: evidence from cannabis and synthetic cannabinoids—a systematic review. *Brain Sci.* 2018; 8(3):40.
69. **Hourani W, Alexander S.** Cannabinoid ligands, receptors and enzymes: Pharmacological tools and therapeutic potential. *Brain Neurosci Adv.* 2018; 2:1-8.
70. **Castaneto MS, Gorelick DA, Desrosiers NA, Hartman RL, Pirard S, Huestis MA.** Synthetic cannabinoids: epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. *Drug Alcohol Depend.* 2014; 144:12-41.
71. **Debruyne D, Le Boisselier R.** Emerging drugs of abuse: current perspectives on synthetic cannabinoids. *Subst Abuse Rehabil.* 2015; 6:113-129.
72. **Hess C, Schoeder CT, Pillaiyar T, Madea B, Muller CE.** Pharmacological evaluation of synthetic cannabinoids identified as constituents of spice. *Forensic Toxicol.* 2016; 34:329-343.
73. **UNODC. 2011.** Synthetic cannabinoids in herbal products. [accessed 2019 Mar 10]. https://www.unodc.org/documents/scientific/Synthetic_Cannabinoids.pdf.
74. **Fattore L, Fratta W.** Beyond THC: The new generation of cannabinoid designer drugs. *Front Behav Neurosci* 2011; 5:60- 66. 21.
75. **Verty ANA, Stefanidis A, McAinch AJ, Hryciw DH, Oldfield B.** Antiobesity effect of the CB2 receptor agonist JWH-015 in diet-induced obese mice. *PloS One.* 2015;10(11):e0140592-19.
76. **Aso E, Ferrer I.** CB2 cannabinoid receptor as potential target against Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* 2016;10:243-243.
77. **Banister SD, Stuart J, Kevin RC, Edington A, Longworth M, Wilkinson SM, Beinat C, Buchanan AS, Hibbs DE, Glass M.** Effects of bioisosteric fluorine in synthetic cannabinoid designer drugs JWH-018, AM-2201, UR-144, XLR-11, PB-22, 5F-PB-22, APICA, and STS-135. *ACS Chem Neurosci.* 2015; 6(8):1445-1458.
78. **Tait RJ, Caldicott D, Mountain D, Hill SL, Lenton S.** A systematic review of adverse events arising from the use of synthetic cannabinoids and their associated treatment. *Clin Toxicol (Phila).* 2016;54 (1):1-13
79. **Schaefer N, Kettner M, Laschke MW, Schlote J, Ewald AH, Menger MD, Maurer HH, Schmidt PH.** Distribution of synthetic cannabinoids JWH-210, RCS-4 and D 9-tetrahydrocannabinol after intravenous administration to pigs. *Curr Neuropharmacol.* 2017; 15(5):713-723.
80. **Karinen R, Tuv SS, Øiestad EL, Vindenes V.** Concentrations of APINACA, 5F-APINACA, UR-144 and its degradant product in blood samples from six impaired drivers compared to previous reported concentrations of other synthetic cannabinoids. *Forensic Sci Int.* 2015;246: 98–103.

81. **Diao X, Huestis MA.** New synthetic cannabinoids metabolism and strategies to best identify optimal marker metabolites. *Front Chem.* 2019; 7:109-109.
82. **Knittel JL, Holler JM, Chmiel JD, Vorce SP, Magluilo J, Jr, Levine B, Ramos G, Bosy TZ.** Analysis of parent synthetic cannabinoids in blood and urinary metabolites by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol.* 2016;40(3):173-186.
83. **Diao X, Huestis MA.** Approaches, challenges, and advances in metabolism of new synthetic cannabinoids and identification of optimal urinary marker metabolites. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;101(2):239-253.
84. **Auwärter V, Dargan PI, Wood DM.** Chapter 13 - synthetic cannabinoid receptor agonists. In: Dargan PI, Wood DM, editors. *Novel psychoactive substances.* Boston: Academic Press; 2013; 317-343.
85. **Tai S, Fantegrossi WE.** Pharmacological and toxicological effects of synthetic cannabinoids and their metabolites. *Curr Top Behav Neurosci.* 2017;32:249-262.
86. **Zhang Q, Ma P, Iszard M, Cole RB, Wang W, Wang G.** In vitro metabolism of R(p)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl)methyl]pyrrolo [1,2,3-de]1,4-benzoxazinyl]-(1-naphthalenyl) methanone mesylate, a Cannabinoid Receptor Agonist. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(10): 1077-1086.
87. **Zhang Q, Ma P, Wang W, Cole RB, Wang G.** Characterization of rat liver microsomal metabolites of AM-630, a potent cannabinoid receptor antagonist, by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2004;39(6): 672-681.
88. **Zhang Q, Ma P, Cole R, Wang G.** Identification of in vitro metabolites of JWH-015, an aminoalkylindole agonist for the peripheral cannabinoid receptor (CB2) by HPLC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2006;386(5): 1345-1355.
89. **Sobolevsky T, Prasolov I, Rodchenkov G.** Detection of JWH-018 metabolites in smoking mixture post-administration urine. *Forensic Sci Int.* 2010;200(1-3):141-147.
90. **Chimalakonda KC, Seely KA, Bratton SM, Brents LK, Moran CL, Endres GW, James LP, Hollenberg PF, Prather PL, Radomska-Pandya A.** Cytochrome P450-mediated oxidative metabolism of abused synthetic cannabinoids found in K2/Spice: identification of novel cannabinoid receptor ligands. *Drug Metab Dispos.* 2012; 40(11):2174-2184.
91. **Toennes SW, Geraths A, Pogoda W, Paulke A, Wunder C, Theunissen EL, Ramaekers JG.** Pharmacokinetic properties of the synthetic cannabinoid JWH-018 and of its metabolites in serum after inhalation. *J Pharm Biomed Anal.* 2017;140:215-222.

92. **Hutter M, Broecker S, Kneisel S, Auwärter V.** Identification of the major urinary metabolites in man of seven synthetic cannabinoids of the aminoalkylindole type present as adulterants in 'herbal mixtures' using LC-MS/MS techniques . J Mass Spectrom. 2012;47(1):54-65.
93. **Wintermeyer A, Möller I, Thevis M.** In vitro phase I metabolism of the synthetic cannabimimetic JWH-018. Anal Boanal Chem. 2010;398:2141-2153.
94. **Aldlgan AA, Torrance HJ.** Bioanalytical methods for the determination of synthetic cannabinoids and metabolites in biological specimens, Trends in Analytical Chemistry. 2016;80:444-457.
95. **Mazzarino M, Torre X, Botrè F.** A liquid chromatography-mass spectrometry method based on class characteristic fragmentation pathways to detect the class of indole-derivative synthetic cannabinoids in biological samples. Analytica Chimica Acta. 2014 Jul 21;837:70-82.
96. **Gottardo R, Sorio D, Musile G, Trapani E, Seri C, Serpelloni G, Tagliaro F.** Screening for synthetic cannabinoids in hair by using LC-QTOF MS: a new and powerful approach to study the penetration of these new psychoactive substances in the population. Medicine, Science and the Law. 2014, Vol 54(1) 22-27.
97. **Gottardo R, Chiarini A, Dal Prà I, Seri C, Rimondo C, Serpelloni G, et al.** Direct screening of herbal blends for new synthetic cannabinoids by MALDI-TOF MS. J Mass Spectrom. 2012;47(1):141–6. 1.
98. **Lin JH.** Species similarities and differences in pharmacokinetics. Drug Metab. Dispos. 1995, 23, 1008-1021.
99. **Lin JH.** Applications and limitations of interspecies scaling and in vitro extrapolation in pharmacokinetics. Drug Metab. Dispos. 1998, 26, 1202-1212.
100. **Hawksworth GM.** Advantages and disadvantages of using human cells for pharmacological and toxicological studies. Human Exp. Toxicol. 1994, 13, 568-573.
101. **Boobis AR, McKillop D, Robinson DT, Adams DA, McCormick DJ.** Interlaboratory comparison of the assessment of P450 activities in human hepatic microsomal samples. Xenobiotica. 1998, 28:493-506.
102. **Rodrigues AD, Wong SL.** Application of human liver microsomes in metabolism-based drug-drug interactions: in vitro-in vivo correlations and the Abbott Laboratories experience. Adv. Pharmacol. 1997;43:65-101.
103. **Pakiş I, Polat O.** Sentetik Kannabinoidler. ACU Sağlık Bil Derg 2016(1):6-13.
104. **Yeni Nesil Psiko-aktif Maddeler Sempozyumu.** 26 Kasım 2013. İstanbul. www.atk.gov.tr/Pdf/psikoaktifmaddeler.pdf. Erişim tarihi:20.04.2015.

- 105.Psychonaut Web Mapping Research Group.** Spice Report. www.psychonautproject.eu/documents/reports/Spice.pdf. Erişim tarihi:15.03.2015.
- 106.EMCDDA 2011 report** (2010 data). ‘TURKEY’ New Development , Trends and in-depth information on selected issues. Reitox National Focal Point, 2012. http://www.emcdda.europa.eu/attachments.cfm/att_191577_EN_Turkey_2011.pdf. Erişim tarihi:15.03.2015.
- 107.**2313 sayılı uyururucu maddelerin murakabesi hakkındaki kanun 13 şubat 2011/Resmi gazete:sayı:27845. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/02/20110213-4.htm>. Erişim tarihi:15.03.2015.
- 108.Sentetik Cannabinoid (Bonzai).** www.uyusturucumaddeler.com. Erişim tarihi:15.03.2015.
- 109.Zucco F, Angelis DI, Stammati A.** Cellular Models for In Vitro Toxicity Testing. In “Animal Cell Culture Techniques”, Ed; Clynes M, Springer Verlag, Germany. 1998.
- 110.Gilbert DF, Boutros M.** A protocol for a high-throughput multiplex cell viability assay. Methods Mol Biol. 2016: 1470, 75-84.
- 111.Riss TL, Moravec RA.** Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. Assay Drug Dev Techn. 2004;2, 1, 51- 62.
- 112.Galluzzi L et al.** Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. Cell Death Differ. 2009: 16, 1093-1107.
- 113.Riss TL, Moravec RA.** Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture. In “Cell Biology”, Ed; Celis JE, Elsevier Academic Press, Burlington. 2006.
- 114.Niles AL, Moravec RA, Hesselberth PE, Scurria MA, Daily WJ, Riss TL.** A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. Anal Biochem. 2007;336, 2, 197-206.
- 115.Crouch SPM, Kozłowski R, Slater KJ, Fletcher J.** The use of ATP bioluminescence as a measure cell proliferation and cytotoxicity. J Immunol Methods. 1993: 160, 81-88.
- 116.Fan F, Wood KV.** Bioluminescent assays for high-throughput screening.Assay Drug Dev Techn. 2007: 5, 1, 127-136.
- 117.Longo-Sorbello GSA, Saydam G, Banerjee D, Bertino JR.** Cytotoxicity and cell growth assays. In “Cell biology: a laboratory handbook”, Ed; Celis JE, Elsevier Academic Press, Burlington. 2006.

- 118.Borenfreund E, Puerner JA.** Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* 1985;24(2-3), 119-124.
- 119.Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M.** Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocol.* 2016, DOI:10.1101/pdb.prot087379.
- 120.Duellman SJ, Zhou W, Meisenheimer P, Vidugiris G, Cali JJ, Gautam P, Wennerberg K, Vidugiriene J.** Bioluminescent, nonlytic, real-time cell viability assay and use in inhibitor screening. *Assay Drug Dev Techn.* 2015;13(8), 456-465.
- 121.Korzeniewski C, Callewaert DM.** An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods.* 1983;64, 313-320.
- 122.Tokur O, Aksoy A.** In vitro sitotoksiste Testleri. *Harran Üniv Vet Fak Derg,* 2017;6 (1): 112-118.
- 123.Couceiro J, Bandara S, Sultan H, Bell S, Constantino S.** Toxicological impact of JWH-018 and its phase I metabolite N-(3-hydroxypentyl) on human cell lines. *Forensic Sci. Int.* 2016; 264:100-105.
- 124.Diao X, Ariane W, Shaokun P, Karl B., Huestis MA.** High-Resolution Mass Spectrometry for Characterizing the Metabolism of Synthetic Cannabinoid THJ-018 and Its 5-Fluoro Analog THJ-2201 after Incubation in Human Hepatocytes. *Clinical Chemistry* 2016; (62:1) 157-169.
- 125.Boumrah Y, Humbert L, Phanithavong M, Khimeche K, Dahmani A.** In vitro characterization of potential CYP- and UGT-derived metabolites of the psychoactive drug 25B-NBOMe using LC-high resolution MS. *Drug Test.Analysis* 2016, 8, 248-256.
- 126. THLE-2 (ATCC®CRL-2706™).** Erişim: (https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2706.aspx?geo_country=tr#) Erişim tarihi: 30.04.2021.
- 127.AcceGen, THLE-2.** Erişim: (<https://www.accegen.com/product/thle-2-abc-tc1337/>) Erişim tarihi: 30.04.2021.
- 128.Yeşiltepe O, Çelik EG, Geyik C, Gümüş ZP, Demirkol D, Coşkunol H, Timur S.** Preparation of glutathione loaded nanoemulsions and testing of hepatoprotective activity on THLE-2 cells. *Turk J Chem.* 2021;45: 436-451.
- 129.Apirakkan O, Gavrilović I, Floresta G, Pierre C, Canaert A, Stove CP, Dargan PI, Cowan DA, Couchman L, Abbate V.** Evidence of enzyme-mediated transesterification of synthetic cannabinoids with ethanol: potential toxicological impact. *Forensic Toxicology.*2020;38,95-107.
- 130.Gerostamoulos D, Elliott S, Walls HC, Peters FT, Lynch M, Drummer OH.** To Measure or Not to Measure? That is the NPS Question. *J Anal Toxicol.* 2016;40(4):318–20.

- 131.Negreira N, Kinyua J, Brabanter ND, Maudens K.** Identification of in vitro an in vivo human metabolites of the new psychoactive substance nitracaine by liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2016; 408:5221-5229.
- 132.Wohlfarth A, Gandhi A, Pang S, Zhu M, Scheidweiler KB, Huestis MA.** Metabolism of synthetic cannabinoids PB-22 and its 5-fluoro analog, 5F-PB-22, by human hepatocyte incubation and high-resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2014; 406:1763–1780.
- 133.Yeter O, Ozturk YE.** Metabolic profiling of synthetic cannabinoid 5F-ADB by human liver microsome incubations and urine samples using high-resolution mass spectrometry. *Drug Test Anal.* 2019;11:847-858.
- 134.Diao X, Huestis MA.** New Synthetic Cannabinoids Metabolism and Strategies to Best Identify Optimal Marker Metabolites. *Frontiers in Chemistry, Review*, 2019;7:109.



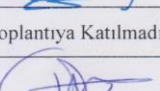
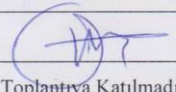
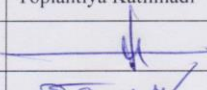
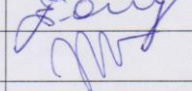
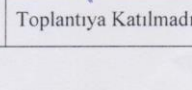
EKLER

EK-1

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Sayısı	Tarih
79	6 Temmuz 2018

KARAR NO 49- Çukurova Üniversitesi Bağımlılık ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Bilimler Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Nebile Dağlıoğlu yönetiminde, Fadile Defne Yıldız tarafından yürütülmesi öngörülen, "Yeni Tasarım Psikoaktif Maddelerden 5F-NPB-22'nin İnsan Karaciğer Hücre Hattı İnkübasyonu ile Elde Edilen Metabolitlerinin Değerlendirilmesi" başlıklı doktora tez projesi araştırma etiği yönünden değerlendirildi. Toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

BAŞKAN	Doç Dr Selim Kadioğlu Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	
ÜYELER	Prof Dr Davut Alptekin Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
	Prof Dr Dinçer Yıldızdaş Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Prof Dr Gülşah Seydaoğlu Biyoistatistik Anabilim Dalı	
	Prof Dr Gürhan Sakman Genel Cerrahi Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Prof Dr Murat Gündüz Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı	
	Doç Dr Ezgi Özyılmaz Sarıç Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı	
	Av. Zehra Bulut Hukukçu Üye	
	Dr Neşe Kayrın Kurum Dışı Üye	Toplantıya Katılmadı

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası, Balcalı 01330 Adana
Telefon: 0322 338 60 60 dahili 3465, Faks: 0322 338 67 22

EK-2

Ç.Ü.BAĞIMLILIK VE ADLI BİLİMLER ENSTİTÜSÜ YÖNETİM KURULU KARARLARI

TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI	TOPLANTI TARİHİ
14	6	17.07.2018

17.07.2018 tarihinde saat 11.45'de toplanan Enstitü Yönetim Kurulu aşağıdaki Kararları oy birliği ile karar verildi.

KARAR:3 Adli Bilimler Anabilim Dalı'nın 17.04.2018 Tarih ve 13/1 No'lu Akademik Kurul Kararı görüşüldü.

Adli Bilimler Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Fadile Defne YALDIZ'ın "Yeni Tasarım Psikoaktif Maddelerden 5F-NPB-22'nin İnsan Karaciğer Hücre Hattı İnkübasyonu ile Elde Edilen Metabolitlerinin Tanımlanması" başlıklı Tez Önerisinin kabulüne oybirliği ile karar verildi.

Prof.Dr.Mete Korkut GÜLMEN (Enstitü Müdürü)
Başkan

Prof. Dr. Necmi ÇEKİN (Enstitü Müdür Yrd.)
Üye

Doç.Dr. Ayşe SERİN (Enstitü Müdür Yrd.)
Üye

Prof. Dr. Pınar ÇIRAGIL
Üye

Prof.Dr. Gonca KARAKUŞ
Üye
(KATILAMADI)

Doç.Dr. Fulya ÇENKSEVEN ÖNDER
Üye