T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

YENİ NESİL PSİKOAKTİF MADDELERDEN AM-2201'İN KALP HÜCRELERİ ÜZERİNE TOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ESRA NİŞİKLİ

DANIŞMAN
PROF. DR. GÜL ÖZHAN

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, DOKTORA Programında Doktora öğrencisi Esra NİŞİKLİ tarafından Prof.Dr. Gül ÖZHAN'ın danışmanlığında hazırlanan "Yeni Nesil Psikoaktif Maddelerden AM-2201'in Kalp Hücreleri Üzerine Toksik Etkilerinin Araştırılması başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 16 /07/ 2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Pınar AKSOY SAĞIRLI
İstanbul Üniv. Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

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

Jüri
Prof.Dr. Türkan YURDUN
Marmara Üniv. Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Jüri
Doç.Dr. Sibel ÖZDEN
İstanbul Üniv. Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Jüri
Doç.Dr. Muhammed HAMİTOĞLU
Yeditepe Üniv. Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

BEYAN

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

Esra Nişikli

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve tez sürecimde bana verdiği emek, tezime katkıları, ayırdığı zaman ve gösterdiği özen için Değerli tez danışmanım Prof. Dr. Gül Özhan'a,

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden istifade etme şansına ulaştığım değerli hocalarım İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Buket Alpertunga, öğretim görevlisi Doç. Dr. Sibel Özden, Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim görevlisi Prof. Dr. Sıdıka Toker'e

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nda birlikte çalıştığım arkadaşlarım Müzeyyen Çeliksöz, Ezgi Öztaş, Ecem Fatma Karaman, Yağmur Emre Arıcan, Mehtap Kara, Ayşe Tarbın Jannuzzı'ye, Fatih Sarı'ya ve Bengül Çalık'a,

Doktora çalışmamın desteklemesinden dolayı (Proje No:21787) İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
İTHAF ..... İİİ
BEYAN ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ X
ÖZET ..... Xİİİ
ABSTRACT ..... XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 15
2. GENEL BİLGİLER 17
2.1. Sentetik Kannabinoidler 17
2.2. AM 2201 24
2.3. Hücre Kültürü 25
2.4. Sitotoksisite 25
2.5. Oksidatif Hasar 28
2.6. Apoptozis ve Otofaji 33
2.7. Kardiak Biyogöstergeler 36
3. GEREÇ VE YÖNTEM 37
3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar 37
3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler 38
3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler 38
3.4. Kullanılan Yöntemler 39
3.4.1. Hücre Kültürü 39
3.4.2. Maruziyet Ortamı 41
3.4.3. Sitotoksisitenin Tespiti 41
3.4.4. Oksidatif Hasar Potansiyelinin Tespiti 43
3.4.5. Apoptoz Potansiyelinin Tespiti 46

3.4.6. Otofajik Potansiyelin Tespiti 47
4. BULGULAR.....49
4.1. Sitotoksisitenin Değerlendirilmesi.....49
4.2. Oksidatif Hasar Potansiyelinin Değerlendirilmesi.....51
4.3. Apoptoz Potansiyelinin Değerlendirilmesi 53
4.4. Otofajik Potansiyelin Değerlendirilmesi.....55
5. TARTIŞMA 56
KAYNAKLAR 61
İNTİHAL RAPOR FORMU.....71
ÖZGEÇMİŞ 72

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4-1: AM-2201'in H9c2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri için WST-1 ve LDH sonuçlarının kıyaslanması. 50

Tablo 4-2: H9c2 hücreleri üzerinde AM-2201 maddesinin apoptotik etkileri. 53

Tablo 4-3:H9c2 hücreleri üzerinde AM-2201 maddesinin nekrotik etkileri. 54

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: AM-2201'in kimyasal yapısı (Kim ve ark. 2017). 24

Şekil 3-1: Flow sitometride apoptoz tayini için elde edilen grafiğin şematik gösterimi. 47

Şekil 4-1: AM-2201'in H9c2 hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin WST-1 testi ile 48 saatlik maruziyet sonucunun değerlendirilmesi 49

Şekil 4-2:AM-2201'in H9c2 hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin LDH testi ile 48 saatlik maruziyet değerlendirilmesi. 50

Şekil 4-3: AM-2201'in H9c2 hücreleri üzerine oksidatif hasar oluşturma potansiyelinin Flow sitometrik yöntem ile değerlendirilmesi. 51

Şekil 4-4: Trolox standart eğrisi. 52

Şekil 4-5: AM-2201'in H9c2 hücreleri üzerine TAK düzeyi. 52

Şekil 4-6: AM-2201'nin apoptotik/nekrotik etki potansiyelinin değerlendirilmesinde FSC ve SSC analiz verileri. 54

Şekil 4-7: AM-2201'in H9c2 hücreleri üzerine otofajik etkilerinin akridin orange yöntemi ile değerlendirilmesi. 55

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
8-OHdG	8-Hidroksi-2-deoksiguanozin
AIF	Apoitoz indükleyici faktör
AM-2201	[1-(5-Fluoropentil)-1H-indol-3-yl]-1-naphthalenylmethanone
ATCC	Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu
ATP	Adenozin trifosfat
BSA	Sığır serum albumini
CAD	Kaspaz aktive edici DNAaz
cAmp	Siklik adenozin monofosfat
CAT	Katalaz
CB	Kannabinoid
CO_2	Karbondioksit
CP	Siklohekzilfenol
DCF	2′-7′-Diklorofluoresein
DCFH-DA	2′-7′-Diklorodihidrofluoresein diasetat
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco’nun modifiye edilmiş besiyeri
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
ELISA	Enzim-bağlı immun test
FADH	Flavin adenin dinükleotit
FBS	Fötal sığır serumu

FITC	Fluoresein izotiyosiyanat
FMNH	Flavin mononükleotit
g	Gram
GSH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSH- Rd	Glutatyon redüktaz
GSSG	Okside glutatyon
GST	Glutatyon transferaz
IC50	Medyan inhibisyon konsantrasyonu
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LDH	Laktat dehidrogenaz
MAO	Monoaminoksidaz
mL	Mililitre
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimethoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NMDA	N-metil-D-aspartat
NRU	Nötral kırmızısı alımı
OD	Optik dansite
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PES	Fenazin etil sülfat
PI	Propidium iodür
PI3K	Fosfotidilinozitol 3 kinaz

PMS	Fenazin metil sülfat
PSS	Periferik sinir sistemi
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SOD	Süperoksit dismutaz
SRB	Sülforodamin B
SSS	Santral sinir sistemi
TdT	Terminal deoksinükleotidil transferaz
THC	Δ9-tetrahidrokannabinol
TNF	Tümör nekroz faktör
TRAIL	TNF bağımlı apoptoz indüklü ligand
TUBİM	Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
WST-1	4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyo]-1,3-benzen Disulfonat
TAK	Total Antioksidan Kapasite

ÖZET

Nişikli, E. (2018). Yeni Nesil Psikoaktif Maddelerden AM-2201'in Kalp Hücreleri Üzerine Toksik Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Sentetik kannabinoidler kötüye kullanımı özellikle son yıllarda giderek yaygınlaşan moleküller olmakla birlikte; nispeten yeni olan bu moleküllerin etkileri, farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri hususunda literatürde sınırlı veri bulunmaktadır. Mevcut bilgiler ağırlıklı olarak bu moleküllerin saptanmasına yönelik yeni metod geliştirilmesi ve klinik etkiler hakkında olgu sunumlarıyla kısıtlıdır. Sentetik kannabinoidlerin kullanımı sonrası kardiak klinik bulgular görüldüğü pek çok çalışmada belirtilmekle birlikte; bu maddelerin kalp üzerine toksik etkilerini ve toksisite mekanizmalarını araştıran çalışma sayısı oldukça kısıtlıdır. Çalışmalarda bu gruptaki her molekülün ayrı ayrı kardiak toksisitesini tanımlamaktan ziyade genel olarak grup içindeki ilk tanımlanmış olan moleküllerin etkileri üzerinde durulmaktadır. Sentetik kannabinoidler içerisinde özellikle klinik ve toksikolojik anlamda literatürün incelenmesinde mevcut verilerin azlığı gözlemlenerek bu grup içinde bulunan AM-2201 ile çalışma yapılmasının konudaki eksikliği gidermede faydalı olacağı kararına varılmış ve tez çalışmasıyla kardiak hücre kültüründe AM-2201 molekülünün kardiotoksisitesi ve toksik etki mekanizmalarının tanımlanması hedeflenmiştir. Çalışmada IC_{50} değerleri tespit edilmiş olup, nekrotik hücre ölümünün ön planda olduğu görülmüştür. Elde edilen sonuçların literatüre katkı sağlaması ve bu alandaki yeni araştırmaların planlanmasında kaynak oluşturması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: AM-2201, Sentetik kannabinoid, Kardiotoksisite, Apoptoz, Nekroz

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 21787.

ABSTRACT

Nişikli, E. (2018). Investigation of Toxic Effects of A New Psychoactive Substance, AM-2201 to Cardiac Cells. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Toxicology. Doctorate Thesis. Istanbul.

Synthetic cannabinoid abuse especially in recent years become more common, although literature data about effects, pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of this relatively new molecules is not adequate. Common data mainly limited with development of new methods to determine the molecules and the case reports about the clinical effects of this molecules. Plenty of the articles discuss cardiac clinical effects seen with synthetic cannabinoid abuse however articles that research toxic effects and toxicity mechanism of this molecules to heart are limited. This studies are not defined cardiac toxicity of every simple molecule in the group but rather they commonly defined the effects of first defined molecules in the group. At the research of the literature because of observation of the data about AM-2201 molecule is less than the others in this group, we concluded study with this molecule to be useful for fulfil a need about this subject. The aim of this study was to define the cardiotoxicity and mechanism of toxicity of the AM-2201 molecule with cardiac cell culture. In this study IC50 values evaluated and primarily necrotic cell death was occured. With the results of this research we aimed to contribute the literature and plan a new resource in the field.

Keywords: AM-2201, Syntethic cannabinoid, Cardiotoxicity, Apoptosis, Necrosis

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 21787.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sentetik kannabinoidler, tüm dünyada sentez ve kullanımlarının hızla yaygınlaşmasına karşın etkileri hakkındaki sınırlı bilgi nedeniyle giderek önemli bir halk sağlık sorunu haline gelen moleküllerdir. İlk olarak bilimsel amaçlarla yapılan farmasötik araştırmalarda sentezlenmişlerse de, ilerleyen süreçte özellikle 2000'lerin başlarından itibaren tüm dünyada bu maddelerin psikoaktif etkileri nedeniyle keyif verici olarak kullanılmaya başlandığı görülmüş ve bu amaçla kullanıldığı saptanan sentetik kannabinoidlerin kullanımı hızla yasaklanmaya başlanmıştır.

Yeni ve etkileri az bilinen bu moleküllerin piyasada ilk saptanan formları yasaklandığında molekül yapısında ufak değişiklikler yapılarak sentezlenen yeni formlar piyasaya sürülmeye başlanmış ve bu şekilde yasalardan kaçınılmaya çalışıldığı görülmüştür. Ancak bu durum zaten ilk olarak yaygınlaşan formları hakkında bile yeterli klinik ve toksikolojik araştırma bulunmayan bu moleküllerin giderek büyük bir sağlık sorunu haline gelmesine neden olmuştur.

Yeni nesil sentetik kannabinoidlerin etkileri, farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri hususunda literatürde sınırlı veri bulunmamaktadır. Mevcut bilgiler ağırlıklı olarak sürekli yeni şekilleri piyasaya sürülen bu moleküllerin çeşitli matrikslerde saptanmasına yönelik yeni metotların geliştirilmesi ve kullanım sonucu görülen klinik etkileri hakkında olgu sunumlarından oluşmaktadır. Olgu sunumları üzerinden bu moleküllerin etkileri ile ilgili değerlendirme yapılmaya çalışıldığında ise; sentetik kannabinoidlerin değişen kompozisyonları ve toksikolojik incelemelerin sınırlı olması nedeniyle kullanımı doğrulamanın sıklıkla hastanın kendi ifadesine dayanması, kullanıcılarda önceden var olan psikiyatrik ve medikal durumlar, başka madde kullanımı da bulunması gibi faktörler nedeniyle hangi etkilerin sentetik kannabinoid kaynaklı olduğunu anlamak güçleşmektedir. Mevcut durum bu alanda yapılacak toksikoloji çalışmalarının önemini ve gerekliliğini açıkça göstermektedir.

Yapılan literatür incelemesi neticesinde; sentetik kannabinoidlerin kullanımı sonrası kardiak klinik bulgular ve ani ölüm görüldüğünün rapor edildiği pek çok olgu sunumuna rastlanılmıştır. Ancak, bu maddelerin psikoaktif amaçlı kullanımları nedeniyle doğal olarak bu moleküllerle ilgili mevcut çalışmaların santral sinir sistemi üzerine etkilerine odaklandığı görülmektedir. Yeni nesil sentetik kannabinoidlerin kalp

üzerine toksik etkileri ve etki mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalar sınırlıdır. Bu bilgiler ışığında; tez çalışması ile sentetik kannabinoidler içerisinde özellikle klinik ve toksikolojik alandaki mevcut verilerin azlığı gözetilerek AM-2201 ([1-(5-fluoropentil)-1H-indol-3-il]-1-naftalenilmetanon) maddesinin *in vitro* koşullarda kalp hücreleri üzerine toksik etki potansiyelleri ile toksik etkiye sebep olan mekanizmaların araştırılması ve tanımlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sentetik Kannabinoidler

Psikoaktif maddeler; bilince etki eden ve bilinç durumunu özellikle algı ve duygudurumunu değiştiren kimyasallardır (Introduction to Psychology 2010). Yeni nesil psikoaktif maddeler; reseptörlerini aktive ettikleri bileşiklere benzer şekilde, özellikle psikotropik, halüsinojen ya da stimülan etkiler oluşturmak amacıyla imal edilen, sentetik kimyasal maddeler olarak tanımlanmakta, kannabinomimetik olarak da bilinen ve suistimal edilen sentetik kannabinoidler bu sınıfta yer almaktadırlar (Gurney ve ark. 2014).

Sentetik kannabinoidler; prototip Δ9-tetrahidrokannabinol (THC)'ün etkilerinin korunduğu, ancak belirsiz bir yasal konumda kalmalarını sağlayacak şekilde üst üste çeşitli yapısal modifikasyonlar geçiren, sürekli olarak sayıları artan ve gelişen geniş bir kimyasal aile serisidir (Gurney ve ark. 2014). Sentetik kannabinoidler ilk olarak; endokannabinoidlerin iştah kesilmesi, bulantı, ruh hali bozukluğu, ağrı ve inflamasyonu azaltma potansiyellerinin fark edilmesi üzerine endüstriyel ve akademik araştırma grupları tarafından iştah kontrolü, ağrı yönetimi ve antiinflamasyon gibi terapötik amaçlı kullanım için geliştirilmiş moleküllerdir (Gurney ve ark. 2014, Cooper 2016). 1980'lerin başında Pfizer ilaç şirketinin araştırma grubu tarafından analjezik amaçlı kullanım için birçok sentetik kannabinoid araştırılmış ve bu bileşikler siklohekzilfenol (CP) serisi olarak bilinmektedir. 1990'lardan beri Clemson Üniversitesinden Profesör John W Huffman ve araştırma ekibi vücuttaki endokannabinoid reseptörlerini hedef alan JWH bileşikleri olarak anılan 450'den fazla bileşik geliştirmiştir. Hebrew Üniversitesi'nden Dr. Mechoulam ve ark. tarafından geliştirilen bir seri bileşik Üniversitenin baş harfleri kullanılarak HU-210 olarak adlandırılmıştır (Somerville 2012). Diğer geliştirilen sentetik kannabinoidler ise Alexandros Makriyannis tarafından geliştirilen AM-serisi ile ve AB-FUNICA olup indazol-karboksamid türevi ikinci kuşak sentetik kannabinoidler olarak tanımlanmaktadırlar (Castaneto ve ark. 2014; Dolengevich-Segal ve ark. 2017).

Yapıları ve etkili reseptörler

Yeni nesil sentetik kannabinoidlerin çoğu en az 4 yapısal komponent içerir: bir indol ya da indazol çekirdek, bir ester, amid ya da keton bağlayıcı, bir kinolinil, naftil,

adamantil ya da tetrametilsiklopropilden meydana gelen bir halka ile indol ya da indazol halka sisteminin azot atomuna bağlı bir hidrofobik yan zincir (Hess ve ark. 2016). Birçok sentetik kannabinoidin yapısında bileşiğin etkisini arttıran, yarı ömrünü uzatan ve daha stabil olmasına imkan veren bir florizasyon gözlenmektedir (Dolengevich-Segal ve ark. 2017). Sentetik kannabinoidler çoğunlukla lipofilik ve nonpolar maddelerdir. Ayrıca küçük ve uçuculuğu olan moleküllerdir (EMCDDA 2015; Lafaye ve ark. 2017; Dolengevich-Segal ve ark. 2017).

Sentetik kannabinoidler; kannabisin primer psikoaktif komponenti olan THC'ye benzer olarak kannabinoid tip 1 (CB1) ve tip 2 (CB2) reseptörlerine bağlanır ve psikoaktif ve davranışsal etkilerini CB1 reseptörüne agonist etki ile oluştururlar (Cooper 2016). Sentetik kannabinoid kullanımı insanlarda niteliksel olarak kannabisin etkisine benzer bir etki oluşturmakla birlikte kannabisin etkisinden daha uzun ve daha yoğun fizyolojik ve psikolojik etkiler oluşturur (Castaneto ve ark. 2014; Lafaye ve ark. 2017; Weinstein ve ark. 2017).

CB1 reseptörleri baskın olarak santral sinir sistemi (SSS) hücreleri olmak üzere periferik sinir sistemi (PSS), kemik, kalp, karaciğer, akciğer, vasküler endotel ve üreme sisteminde bulunur. CB2 reseptörleri ise primer olarak immün sistemde, ama aynı zamanda CB1 reseptörlerinden daha düşük seviyelerde SSS'nde bulunur. CB reseptörleri, G proteini bağlı reseptörler olduklarından, reseptörlerin aktivasyonu adenilat siklaz inhibisyonuyla sonuçlanarak, hücresel siklik adenozin monofosfat (cAMP) seviyelerini azaltarak kannabinomimetik cevap oluşturur (Castaneto ve ark. 2014; Hess ve ark. 2016). Sentetik kannabinoid agonistleri voltaj bağımlı iyon kanallarıyla etkileşir ve membran potansiyelini azaltarak potasyum, sodyum ve N-P ve Q tipi kalsiyum kanallarını inhibe eder (Castaneto ve ark. 2014). CB reseptörleri, kannabinoidlerin tek hedefi değildir (Hess ve ark. 2016). G proteini ile eşleşmiş reseptörlerden (GPCR) GPR 18 ve GPR 55'in de kannabinoidlerle etkileşime girdiği bildirilmiştir (Hess ve ark. 2016). Ayrıca bazı sentetik kannobinoidler, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonizmi, monoaminoksidaz (MAO) kapasitesinin inhibisyonu ve 5-hidroksi triptamin 2A (5-HT2A) reseptör agonizmi gibi başka farmakodinamik etkiler de gösterebilmektedir (Dolengevich-Segal ve ark. 2017).

Kannabis ve sentetik kannabinoid etkileri arasındaki farklar muhtemelen birçok sentetik kannabinoid ve metabolitinin THC'ye göre CB1 reseptörlere daha fazla afinite göstererek daha fazla etki oluşturmasına yani farmakolojik profillerinin farklı olmasına bağlıdır (Cooper 2016). Bazı sentetik kannabinoidlerin non-kannabinoid reseptörlere bağlanması da kısmen literatürde yayınlanan farklı sonuçlara katkıda bulunmaktadır (Cooper 2016).

Sentetik kannabinoidler karaciğerde konjugasyon ve oksidasyon yolu ile metabolize edilmekle birlikte kompleks farmokinetik özellikleri halen tam olarak bilinmemektedir (Castellanos ve Gralnik 2016).

Kullanımı

Sentetik kannabinoidler orijinal olarak 1960'larda sentezlenmiş ancak, Avrupa'da keyif için kullanılan bağımlılık yapıcı maddeler olarak 2004-2005 yıllarında, Amerika'da 2008 yılında, Türkiye'de ise ilk defa 2010 yılı ortalarında görülmeye başlanmış ve tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de hızla yaygınlaşmıştır (Castellanos ve Gralnik 2016; CDC 2017; Türkiye uyuşturucu raporu 2017). 12.06.1933 tarih ve 2313 sayılı Uyuşturucu Maddelerin Murakabesi Hakkındaki kanun kapsamına alınmaya başlanan sentetik kannabinoidlerle ilgili verilere bakıldığında; Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi (TUBİM) verilerine göre 2011 yılında Türkiye'de sentetik kannabinoid ilişkili olay sayısı 166 iken 2015 yılında 11.567'e yükselmiş, 2016 yılında ise 2015'e göre %32,8 oranında artış ile 15.366 sentetik kannabinoid olayı gerçekleşmiştir (Türkiye uyuşturucu raporu, 2017).

Sentetik kannabinoidlerin sorun teşkil eden en önemli özellikleri üretimlerinin oldukça ucuza mal olması ve sürekli değişen yeni bileşik sentezinin oldukça kolay olmasıdır (Çaplı ve ark. 2016). Yasadışı üretim tabiri olan merdiven altı üretimle bu maddelerin kimyasal yapıları çok çabuk değiştirilmektedir. Bu durum yeni nesil sentetik kannabinoidlerin tespitini zorlaştırmakta, dolayısıyla da şüpheli bitkisel ürünlerde, kan, serum, idrar, tükürük ve kıl gibi biyolojik örneklerde tanımlanmaları ve miktarlarının belirlenmesi zorlaşmakta ve hassas analitik yöntemlerin geliştirilmesini gerektirmektedir (Özşeker ve ark. 2017).

Adli Tıp Kurumu ve İstanbul Narkotik Birimine 01 Ağustos 2010 ile 31 Mart 2012 tarih aralığında gönderilen bitkisel bileşenlerin incelenmesi sonucu 1200 bitkisel

bileşenin 1179'unun (%98,3) sentetik kannabinoid içerdiği tespit edilmiştir (Artuç ve ark. 2014). 2013 Yılında ülkemiz sınırları içinde 780 kg sentetik kannabinoid yakalanmış ve yakalanan sentetik kannabinoid miktarının 2012 yılına göre 2013 yılında %79,7 oranında arttığı bildirilmiştir (Özşeker ve ark. 2017). 2016 yılında Adli Tıp Kurumu Narkotik bölümü tarafından bitkisel ürünlerde yeni nesil sentetik kannabinoidlerden CUMYL-4CN-BINACA'yı tespit etmiş ve yasaklı maddeler listesine ilave edilmiştir (Resmi Gazete 2016). CUMYL-4CN-BINACA'nın kurum kayıtlarında çok sık kullanılan sentetik kannabinoidlerden biri olduğu belirtilmiş ve Öztürk ve ark. (2018) tarafından yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi kullanılarak insan karaciğer mikrozomlarında ve idrar örneklerinde madde ve metabolitlerin tayin metotu geliştirilmiştir.

Kullanıcıların sentetik kannabinoid preparatlarını yasal ve tespit edilemeyen bir şekilde kafa yapmanın doğal bir yolu olarak algıladıkları ile ilgili çok sayıda rapor bulunmaktadır. Bu durum sentetik kannabinoid kullanımın hızlı yaygınlaşmasındaki ana faktörlerden biridir. Sentetik kannabinoidlerin sürekli olarak küçük molekül değişiklikleriyle yeni preparatları sentezlenmekte ve bu durum güvenilir tespit yöntemleri geliştirmede zorluklara yol açmaktadır. Tanımlanmış birçok sentetik kannabinoid formu yasaklanmıştır ve kullanımları illegaldir, ancak yeni sentezlenen sentetik kannabinoidler onları yasaklayan yasalar ve düzenlemelerden kurtulabilecek şekilde tasarlanmaktadırlar. Bu maddelerin piyasa değişimi çok hızlı olduğundan piyasada bulunan maddeleri yasal listelere alma girişimleri geride kalmaktadır. Kullanıcılarda doğal algısı oluşturulan bu preparatlar aslında bitki karışımlarına püskürtülen sentetik kannabinoidlerin sıvı formundan oluşmakta ve birçok belirlenemeyen kimyasal yapı içermekte olup doğallıktan uzaktırlar (Castaneto ve ark. 2014; Gurney ve ark. 2014; Castellanos ve Gralnik 2016).

Sentetik kannabinoidler; Spice, Bonzai, K2, Mr. Nice Guy, Green Buddha, Blonde, Summit, Standard, Blaze, Red Dawn X, Citron, Green Giant, Smacked, Wicked-X, AK-47, Special K, Kronic, Barely Legal, Fake Weed gibi pek çok farklı ticari isimle satılmaktadırlar (Castellanos ve Gralnik 2016). Türkiye'de sıklıkla Bonzai adıyla bilinmektedirler (Aksel ve ark. 2015).

Sentetik kannabinoidler sentezlendikten sonra alkol, aseton gibi çözücülerle çözünerek bitkisel materyalin üzerine sprey şeklinde püskürtülmekte ve sonrasında paketlenerek bitkisel karışım olarak satılmaktadır (Cooper 2016). Paketlerdeki bileşiklerin kimyasal içerik ve konsantrasyonları değişiklik göstermektedir (Cooper 2016). Sentetik kannabinoidlerin yan etkilerinin maddenin intrinsik özellikleri ve üretim süreciyle ilişkili olduğu bildirilmektedir. Sentetik kannabinoid imal sürecinde maddenin bitkisel materyalde düzensiz şekilde dağılması da bazı ürünlerin planlanandan daha fazla madde içermesine neden olabilmektedir. Sentetik kannabinoidler aynı zamanda stimülanlar, halüsinojenler ve sedatifler ile küçük bir grup vakada extacy olarak satılan tabletler gibi diğer psikoaktif maddeleri içeren bileşiklerde de saptanmıştır (Castellanos ve Gralnik 2016).

Sentetik kannabinoidler başlıca sigara şeklinde sarılarak ya da nargile şeklinde içilmekle birlikte oral (bitkisel çaylara ya da yiyeceklere eklenerek) ya da intranazal olarak kullanılabilirler (Weaver ve ark. 2015; CDC 2017). Bir diğer yeni gelişim; elektronik sigaralarda kullanılan sıvı kartuşların içine sentetik kannabinoid eklenmesi yolu ile kullanımıdır (Castellanos ve Gralnik 2016; CDC 2017).

Klinik veriler

Sentetik kannabinoidlerin etkilerinin inhalasyondan sonraki 10 dk içinde başladığı ve çoğu etkinin kullanımdan 2-6 saat sonra sona erdiği bildirilen yayınlar bulunmakla birlikte (Weaver ve ark. 2015; Lafaye ve ark. 2017) akut etkilerin tipik olarak 30 dk’dan 120 dk’ya kadar sonlandığı ancak bazı semptomların (Hangover-akşamdan kalma hissi) bir sonraki güne kadar azalarak devam edebildiğini (Castellanos ve Gralnik 2016; Lafaye ve ark. 2017) bildiren makalelerde bulunmaktadır.

Sentetik kannabinoid kullanımı sonrası ölüme neden olmayan intoksikasyon durumları ile ilişkili çok sayıda olgu olmakla birlikte az sayıda ölüm olgusu da rapor edilmiştir. Sentetik kannabinoidlerin bir kısmının çok potent olduğu ve toksik etki potansiyelinin yüksek olduğu bildirilmektedir. Sentetik kannabinoid kullanımı sonrasında birçok farklı sistemi etkileyen çok sayıda semptom tanımlanarak rapor edilmiştir (Castellanos ve Gralnik 2016).

Sentetik kannabinoid kullanımı sonrası bildirilen kardiovasküler etkilere bakıldığında; en sık görülen yan etkilerin taşikardi ve kan basıncında artma olduğu

görülmektedir (Aksel ve ark. 2015; Davis ve Boddington 2015; CDC 2017; Weinstein ve ark. 2017). Taşikardi, direkt bir sempatomimetik etkiden ziyade azalmış periferik vasküler direnç ve takiben gelişen kardiak outputu kalp hızını arttırarak sürdürme ihtiyacına bağlı olarak görülmektedir (Weaver ve ark. 2015). Aynı zamanda göğüste sıkışma hissi, disritmiler bildirilmiş olup göğüs ağrısı, kardiak iskemi ve myokardial enfarktüs belirtilerini içeren olgu sunumları da bulunmaktadır (Davis ve Boddington 2015; Weinstein ve ark. 2017). Sentetik kannabinoid kullanımı sonrası daha az sıklıkla da olsa bradikardi ve hipotansiyon da görülebilmektedir (Aksel ve ark. 2015; Altınışık ve ark. 2015).

Gastrointestinal sistem bulgularına bakıldığında; sentetik kannabinoid kullanımı sonrası en sık bulantı, kusma, öğürme görüldüğü bildirilmekte, ağız kuruluğuna neden olduğuna dair olgu sunumları bulunmaktadır (Altınışık ve ark. 2015; Davis ve Boddington 2015; CDC 2017). Birçok sentetik kannabinoid bileşiği (özellikle JWH 018, JWH 073 ve AM-2201) kannabinoid hiperemesis sendromuyla[1] ilişkili görülmektedir (Weaver ve ark. 2015; Cooper 2016; Weinstein ve ark. 2017).

Sentetik kannabinoid kullanımı sonrası görülen nörolojik bulgulara bakıldığında; tremor, ataksi, fasikülasyonlar[2], hipertonisite[3], hiperfleksiyon ve hiperekstansiyon[4] gibi motor nörolojik etkiler, baş ağrısı, uyuşukluk, uykuya meyil, konfüzyon, sersemlik rapor edilmektedir (Altınışık ve ark. 2015; Castellanos ve Gralnik 2016). Daha ciddi nörolojik etkilerde bilinç kaybı, koma, inme görüldüğü ile ilgili raporlar mevcuttur (Gurney ve ark. 2014; Orsin ve ark. 2015; Castellanos ve Gralnik 2016).

Psikiyatrik bulgular içerisinde; dikkat, konsantrasyon ve hafıza bozuklukları en sık gözlenen kognitif etkilerdir. Dizartrik[5], yavaş, dezorganize konuşma, uygunsuz gülme, ajitasyon ve huzursuzluk, halüsinasyon, dezorganize düşünceler, delüzyonlar gibi psikotik semptomlar, öfori, anksiyete ve panik semptomları görüldüğü

---

[1] Kronik kannabis kullanıcıları arasında görülen siklik kusma ve karın ağrısı olan bir kronik hastalık

[2] Seğirme, istemsiz küçük kas kasılmaları

[3] Kas tonüsünde artma

[4] Fleksiyon ve ekstansiyon hareketlerinde nötral sıfıra göre artma

[5] Motor konuşma bozukluğu, peltek konuşma

bildirilmektedir. Self mutilasyon[6] davranışları da sentetik kannabinoid kullanımına sekonder nadir olarak ortaya çıkabilmektedir. Sentetik kannabinoid kullanımı sonrası intihar düşünceleri görülebildiği de bildirilmektedir (Gurney ve ark. 2014; Altınışık ve ark. 2015; Orsin ve ark. 2015; Castellanos ve Gralnik 2016; CDC 2017; Lafaye ve ark. 2017; Weinstein ve ark. 2017).

Sentetik kannabinoid kullanımı sonrası böbrekte; akut tübüler nekroz ve akut böbrek yetmezliği, akciğerlerde pulmoner disfonksiyon, hiperventilasyon, apne ve pnömoni bildirilmiştir (Gurney ve ark. 2014; Orsin ve ark. 2015; Castellanos ve Gralnik 2016; CDC 2017; Weinstein ve ark. 2017). Oftalmolojik olarak; kırmızı göz, bulanık görme, ışığa duyarlılık, pupil değişiklikleri (miyozis ya da midriazis) görülebildiği bildirilmiştir (Castellanos ve Gralnik 2016).

Diğer fiziksel bulgulara bakıldığında ise hipertermi, rabdomyoliz, uykusuzluk, cilt problemleri, kulak çınlaması görülebildiği bildirilmektedir (Castellanos ve Gralnik 2016).

Sentetik kannabinoid kullanımı sonrası laboratuar testleri hafif lökositoz (WBC: 13.000-14.000) ve hipokalemi dışında genelikle normaldir (Castaneto ve ark. 2014). Sentetik kannabinoid kullanımı sonrası metabolik olarak hipokalemi yanı sıra hiperglisemi ve asidoz da görülebilmektedir (Castaneto ve ark. 2014; Castellanos ve Gralnik 2016).

Olgu sunumlarında sentetik kannabinoid kullanımı sonrasında esrar kullanımına benzer ancak daha ciddi geri çekilme semptomları görülebildiği bildirilmektedir (Weaver ve ark. 2015; Castellanos ve Gralnik 2016; Weinstein ve ark.2017). Sık kullanım sonrası sentetik kannabinoid kullanmayı aniden bırakanlarda inme, kalp atış hızında artma, çarpıntı, nefes darlığı semptomları bildirilmiştir (CDC 2017).

Sentetik kannabinoidlerin kronik etkileriyle ilgili çalışmalar henüz mevcut değildir (Weaver 2015; CDC 2017).

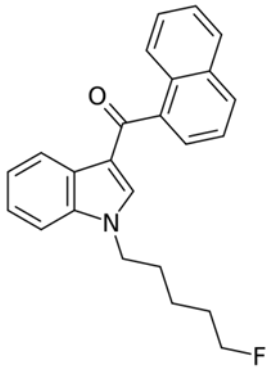
---

[6] Kendi kendine zarar verme davranışı

2.2. AM 2201

AM-2201 ([1-(5-fluoropentil)-1H-indol-3-il]-1-naftalenilmetanon) kannabinoid reseptörlerine potent agonist etki gösteren, kötüye kullanımı artan bir sentetik kannabinoiddir. AM-2201, beyin fonksiyonlarında psikoaktif ve keyif verici etkilere neden olan güçlü farmakolojik etkiler oluşturur (Kim ve ark. 2017).

AM-2201, JWH-018'den pentil zincirindeki bir flor atomu farklı olan, bir indol türevidir (Şekil 2-1). Bileşik aminoalkilindollerdendir (Koller ve ark, 2015). Moleküler formülü $C_{24}H_{22}FNO$, moleküler ağırlığı 359,43 g/mol, erime noktası 93.7 °C'dir (WHO 2014; Weinstein ve ark. 2017).



Şekil 2-1: AM-2201'in kimyasal yapısı (Kim ve ark. 2017).

AM-2201'in sentezi ilk olarak 2001 yılında Alexandros Makriyannis ve Hongfeng Deng tarafından açıklanmıştır (WHO 2014). AM-2201 ismi, Alexandros Makriyannis'in ilk harflerinden gelmektedir (Koller ve ark, 2015). AM-2201, THC'ye kıyasla CB1 ve CB2 reseptörlerine görece yüksek bağlanma afinitesine sahiptir. Klinik gözlem ve verilere göre; AM-2201'in sedasyon, kognitif disfonksiyon, taşikardi, postural hipotansiyon, ağız kuruluğu, ataksi, immunsupresyon, psikotrofik etkiler gibi CB1 agonist etkileri gösterebileceği kabul edilebilir. AM-2201 çeşitli sitokrom P450 ailesi enzimleri tarafından metabolize edilir. Yüksek ısılarda AM-2201, küçük ölçüde JWH-018 ve JWH22'ye dönüşebilir (WHO 2014).

AM-2201'in kullanımın doğrulandığı non-fatal vakalarda konvülsiyon, kusma, taşikardi, sersemlik, kannabinoid hiperemezis sendromu ve diffüz pulmoner infiltratlar bildirilmiştir (WHO 2014).

2.3. Hücre Kültürü

Hücre kültürü orijinal dokudan alınan hücrelerden, primer kültürden, bir hücre hattından veya bir hücre soyunun enzimatik, mekanik ya da kimyasal ayrıştırılmasından elde edilir (Freshney, 1994). Primer hücre kültürü; cerrahi olarak bir organizmadan alınan hücrelerin büyüyüp bölünebilecekleri uygun kültür ortamına konulması ile oluşturulur (Ryan, 2008; Nema ve Khare, 2012).

Mevcut kültürden bazı hücrelerin ya da tüm hücrelerin taze bir medyuma transferiyle yeni hücre kültürü yapılmasına subkültür (alt kültür) ya da pasajlama denir (Nema ve Khare, 2012). Primer kültür kabındaki hücrelerin büyüyüp tüm uygun kültür substratını doldurduğunda hücrelerin büyümeye devam edebilmelerine alan sağlanması için pasajlanmaları gerekir (Ryan, 2008). Bir kültürün pasajlanması genel olarak medyumun uzaklaştırılması, tripsin ya da alternatif proteazlarla (az bağımlı hücrelerde çalkalanma yeterlidir) hücrelerin ayrılması ve medyumda toplanması ve yeni kaplarda uygun taze medyumla dilüe edilmesi aşamalarını içerir (Freshney, 1994). Hücreler ihtiyaçtan fazla olduğunda dimetilsülfoksit (DMSO) ya da gliserol gibi uygun kriyoprotektif ajanlarla işleme tabi tutularak dikkatlice dondurulup kriyojenik ısılarda ihtiyaç olana kadar saklanabilir (Ryan, 2008).

2.4. Sitotoksisite

Bir test maddesinin hücre canlılığı ve çoğalması üzerine etkilerini saptamak üzere kullanılan testlerdir (Rampersad 2012). İn vitro sitotoksisite testleri, çoğaltılan hücre kültürlerinde ve test edilecek maddenin en basit düzeyde hücre canlılığı üzerine etkisini tespit etmek üzere kullanılan testler olup, elde edilen veriler hücre üzerinde yapılacak diğer incelemelerdeki maruziyet dozlarının belirlenmesinde öncü verilerdir. Benzer şekilde, hayvan deneylerinde ilk dozun seçimi ve kullanılacak hayvan sayısının azaltılması amacıyla yardımcı test olarak önerilirler. İn vitro sitotoksisite değerlendirmesinde genellikle kullanılan metotlar; nötral kırmızı ya da floresan DNA boyaları gibi intakt membranı olan hücre fraksiyonlarının ölçümü, MTT testi gibi canlı hücrelerin metabolizmalarının ölçümü veya ATP içeriğinin, hücre sayısının, total DNA ya da protein içeriğinin, hücre proliferasyonun ölçümlerini içerir (The National Academies of Sciences, Engineering, Medicine, 2015).

Tripan Mavisi Testi

Tripan mavisi testi; canlı hücrelerin sahip olduğu intakt hücre membranlarının tripan mavisi boyasını hücre içine almamasını temel alır. Tripan mavisi; canlı olmayan hücrelerde - hücrenin membran bütünlüğünün kaybına bağlı boyayı alması sonucu - mikroskop altında belirgin gözlenebilen mavi renk bırakan vital bir boyadır. Hücre süspansiyonu boyayla karıştırılır ve hücrelerin boyayı alması ya da hücre dışında bırakması görsel olarak değerlendirilir. Bu protokolde canlı hücrelerin sitoplazması berrak, canlı olmayan hücrelerin ise mavidir. Tripan mavisi ile hücre canlılık analizinde geleneksel metot, manuel boyama ve sayım için hemositometre kullanımıdır (Strober 2001; Louis ve Siegel 2015).

Nötral Kırmızısı Alım Testi

Nötral kırmızısı alım testinde canlı hücrelerin nötral kırmızı boyasını lizozomlarına alabilme özelliği temel alınarak canlılık ölçülür. Zayıf katyonik boya hücre membranlarını noniyonize pasif difüzyonla geçerek matriksin anyonik ve/veya fosfat gruplarına elektrostatik-hidrofobik bağlarla bağlanarak lizozomlarda birikir. Biriken boya canlı hücrelerden asitlendirilmiş etanol solüsyonu kullanılarak çıkartılır ve solüsyonda çözülmüş boyanın absorbansı 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçülür. Ölü hücrelerin değişen membran özellikleri nötral kırmızısının membrandan alınmasını engeller. Bu nedenle tutulan boya miktarı canlı hücre sayısıyla orantılıdır (Akremi ve ark. 2016; Repetto ve ark. 2008).

Tetrazolyum Redüksiyon Testleri (MTT, MTS, XTT, WST-1)

Hücre canlılığının tespitinde kullanılan kolorimetrik testlerde genel olarak renksiz bir substratın canlı hücre tarafından renkli bir ürüne dönüşmesi esası kullanılır. Canlı hücrelerin saptanmasında MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür), MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimethoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolyum), XTT (2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid) ve WST-1 (4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyo]-1,3-benzen disulfonat) en sıklıkla kullanılan tetrazolyum bileşikleridir. Bu bileşikler iki temel kategoriye ayrılmaktadır. MTT; pozitif yüklü olup kolaylıkla canlı ökaryotik hücrelere girebilirken; daha yakın zamanlarda geliştirilmiş tetrazolyum bileşiklerinden oluşan ikinci grup bileşikler MTS, XTT ve WST-1 negatif yüklüdürler ve tipik olarak

tetrazolyumun formazan ürününe redüksiyonuna yardımcı olmak için elektronları stoplazma ya da plazma membranına transfer edebilen fenazin metil sülfat (PMS) ya da fenazin etil sülfat (PES) gibi bir orta seviye elekron alıcıyla birlikte kullanılırlar. Bu ikinci grup tetrazolyum bileşikleri canlı hücreler tarafından direkt hücre kültür medyumunda çözünebilen formazan ürünleri oluşturmak için indirgenebilir. Bu gelişmiş tetrazolyum bileşikleri test prosedüründeki bir basamağı formazan çökeltilerinin çözünmesi için test ortamına ikinci bir reaktif eklenmesi gerekmediğinden elimine ederler, dolayısıyla da bu protokoller daha çok tercih edilmektedirler (Mossman 1983; Riss ve ark. 2016).

MTT testi; tetrazolyum tuzu MTT'ye dayalı olarak canlı hücreleri spektrofotometre ile ölçebilen bir kolorimetrik testtir. MTT testi; soluk sarı renkli tetrazolyum tuzu MTT'nin hasarsız hücrelerdeki mitokondrial süksinat dehidrogenaz enzim aktivitesiyle mavi-mor renkli formazan ürününe indirgenmesini belirler (Vian ve ark. 1995). Tetrazolyum halkası aktif mitokondride parçalandığından reaksiyon sadece canlı hücrelerde oluşur (Mossman 1983). Testte; MTT substratı fizyolojik dengeli solüsyonda hazırlanarak kültüre hücrelere eklenir (son konsantrasyon genellikle 0,2-0,5 mg/ml olacak şekilde) ve 1 ile 4 saat arasında inkübe edilir (Riss ve ark. 2016). Formazan ürün miktarı 540-590 nm aralığında spektrofotometrede ölçülür ve nispi hücre canlılığı değerlendirilir (Wang ve ark. 2011). Test şartları optimize edilirken göz önünde bulundurulması gereken; oluşan sinyal miktarının MTT konsantrasyonu, inkübasyon süresinin uzunluğu, canlı hücre sayısı ve canlı hücrelerin metabolik aktivitelerini içeren çeşitli parametrelere bağlı olduğudur (Riss ve ark. 2016).

Laktat Dehidrojenaz (LDH) Testi

Ekstrasellüler medyumdaki LDH aktivitesinin ölçümüne dayalı bir testtir. LDH hemen hemen tüm hücrelerde bulunan stoplazmik bir enzimdir. İntrasellüler LDH kaybı ve LDH'ın kültür ortamında saptanması hücre membran hasarına bağlı hücre ölümünün bir göstergesidir. LDH iki basamaklı reaksiyon ile ölçülür. İlk basamakta; LDH laktatın pirüvata oksidasyonunu katalizlerken redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) oluşturur. İkinci basamakta bu yeni sentezlenen NADH kullanılarak bir tetrazolyum tuzu (nitroblue tetrazolyum) renkli bir formazan ürününe (metil hidrazin) dönüştürülür. Ürün miktarı LDH miktarıyla orantılıdır ve kolorimetrik olarak 490-520 nm arasında

spektrofotometre ile ölçülür (Fotakis ve Timbrell 2006; Chan ve ark. 2013; Zou ve ark. 2013).

Alamar Mavisi Testi

Alamar mavisi; aktif bileşeni olan resazurin (7-hidroksi-10-oksidofenoksazin-10-yum-3-on) suda çözünen, toksik olmayan, hücre membranından penetre olabilen, pembe renkte yüksek floresans gösteren resofurine redükte olan mavi renkte bir boyadır. Kültür ortamına eklendiğinde alamar mavisinin okside formu sitozole girer ve mitokondrial enzim aktivitesiyle indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH), indirgenmiş flavin adenin dinükleotit (FADH) ve flavin mononükleotit (FMNH) ile NADH'dan elektron alarak redükte forma dönüşür. Bu redoks reaksiyonu ile beraber kültür medyumunun renginde 540-570 nm'de kolorimetrik ya da 530-560 nm'de fluorometrik olarak ölçülebilen çivit maviden floresan pembeye bir değişim olur (Al-Nasiry ve ark. 2007; Rampersad 2012).

Sulforodamin B (SRB) Testi

SRB parlak pembe, iki sulfonik grubu olan amino ksantin yapısında bir boyadır. SRB'nin esası doku kültüründe trikloroasetik asitle fikse edilmiş hücrelerin protein komponentlerine elektrostatik ve pH bağımlı bağlanma yeteneğine dayanır. Hafif asidik koşullarda boya bağlanırken hafif bazik koşullarda boya hücrelerden ekstre edilebilir ve ölçüm için çözünebilir. SRB'ye bağlanan boyanmış hücrelerden ekstre edilen boya miktarı direkt olarak hücre kütlesiyle orantılıdır (Vicahia ve Kirtikara 2006; Voight, 2005).

2.5. Oksidatif Hasar

Serbest radikaller, dış orbitalinde eşlenmemiş elektron içeren atom veya bileşiklerdir. Serbest radikaller oldukça dayanıksız ve aynı zamanda reaktif moleküller olup, elektronları hücredeki diğer moleküllerle etkileşime girerek hasar meydana getirirler. Oksijen kaynaklı serbest radikaller reaktif oksijen türleri (ROS), nitrojen kaynaklı serbest radikaller ise reaktif nitrojen türleri (RNS) olarak adlandırılır (Çakatay ve Kayalı 2006; Karabulut ve Gülay, 2016).

Serbest radikaller aracılığıyla gelişen hücre zedelenmesi özellikle, membranlarda lipit peroksidasyonu, DNA hasarı ve proteinlerin çapraz bağlanması ile

ilişkilidir. Serbest radikaller; sülfidril aracılı protein çapraz bağları oluşturarak parçalanmada artma veya enzimatik aktivitenin kaybına neden olabildikleri gibi direkt olarak polipeptidlerin parçalanmasına neden olabilirler. Hücre membranında çift bağlı poliansatüre lipitler oksijen türevi serbest radikallerin etkisiyle kolayca zedelenebilir. Bu reaksiyonlar hücre membran özelliklerini (akışkanlık, iyon transportu vb.) değiştirebilir. ROS hem nükleer hem mitokondrial DNA'da başlıca DNA zincirinde kırılma, nükleik asit baz modifikasyonları, deoksiriboz oksidasyonu ve DNA-protein çapraz bağları şeklinde oksidatif hasar oluşturabilirler (Bandyopadhyay ve ark. 1999; Robbins ve ark. 2003).

Oksidatif hasar (stres), ateroskleroz, inflamatuar hastalıklar, belli kanserler ve yaşlanma sürecinde rol oynadığı gibi iskemi/reperfüzyon hasarı, nörodejeneratif hastalıklar, alerji gibi bir grup hastalığın patogenezinde etkilidir (Young ve Woodside 2001; Mates ve ark. 1999).

ROS, UV radyasyon, toksik kimyasal ve ilaçlar gibi dış kaynaklar, yaşlanma ya da zedelenme/inflamasyon gibi fizyolojik değişiklikler veya plazma membranında NADPH oksidaz enzimleri, fagositlerdeki myeloperoksidaz, mitokondrideki solunum zinciri ürünleri gibi hücre içi endojen kaynaklara bağlı ortaya çıkabilir (Morry ve ark. 2016). ROS'lar arasında; süperoksit, hidroksil, peroksil, lipit peroksil ve alkoksil radikalleri sayılabilir. Superoksit radikali; oksijen molekülüne bir elektron eklenmesiyle meydana gelir. Süperoksitin spontan dismutasyon reaksiyonuyla hidrojen peroksit oluşmaktadır. Hidrojen peroksitin önemli özelliklerinden biri süperoksit radikalinin tersine hücre membranını geçebilme yeteneğidir. Hidrojen peroksit aslında gerçek bir serbest radikal olmamakla birlikte, hidroksil radikali oluşumuna yol açabildiğinden önemli bir moleküldür. Hidroksil radikali çok reaktif olup, canlı hücrede bulunan hemen hemen her tip molekülle yüksek oranda reaksiyona girebildiğinden; oksidatif hasarda en olası toksik reaktan olarak görülmektedir (Erenel ve ark. 1992; Delibaş ve Özcankaya 1995; Young ve Woodside 2001; Karabulut ve Gülay 2016).

Oksidatif stres tayininde sıklıkla lipit peroksidasyon son ürünleri (malondialdehid vb), 8-hidroksi-2′-deoksiguanozin (8-OHdG), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz (GSH-Rd) gibi antioksidan enzimler ile α-tokoferol, askorbik asit, Glutatyon (GSH), ubikinon,

sistein gibi antioksidanların spektrofotometre, HPLC, GC/MS, ELISA ve radyoimmunassay yöntemlerle ölçümleri kullanılmaktadır (Eken 2011; Ho ve ark. 2013).

ROS Tayini

ROS tayininde floresans problar kullanılarak flow sitometrik veya florimetrik tayinler tercih edilir (Eruslanov ve Kusmartsev 2010). 2′-7′-Diklorodihidrofluoresein diasetat (DCFH-DA) oksidatif stres için intrasellüler prob olarak kullanılabilen, hücre zarını geçebilen, floresan özellik göstermeyen bir 2′-7′-diklorofluoresein (DCF) prekürsörüdür. DCFH-DA'dan hücre içi esterazlarla hücre membranını geçemeyen görece olarak polar H_2DCF oluşur. Bu floresans özellik göstermeyen molekül hücre içinde birikir ve daha sonra oksidasyonla yüksek floresans gösteren DCF ürününe yerini bırakır. DCF'in hücrede birikimi 530 nm dalga boyunda floresans düzeyindeki artış ile ölçülebilir ve hücredeki hidrojen peroksit konsantrasyonuyla orantılı olarak kabul edilir (Eruslanov ve Kusmartsev 2010).

Aerobik organizmalar enzimatik ve nonenzimatik antioksidanları içeren entegre antioksidan sistemlere sahiptirler. Enzimatik antioksidanlar arasında; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), hidroperoksidaz, tioredoksin redüktaz, eosinofil peroksidaz enzimleri sayılabilir (Sezer ve Keskin 2014). SOD enzimi; süperoksitin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalize etmektedir (Young ve Woodside 2001; Krishnamurthy ve Wadhwani, 2012). Hidrojen peroksit daha sonra CAT ya da GSH-Px enzimleri tarafından ortadan kaldırılır (Young ve Woodside 2001). CAT hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene dönüştüren ve büyük oranda hücrede peroksizomlarda lokalize bir enzimdir (Krishnamurthy ve Wadhwani. 2012). GSH-Px glutatyonu kullanarak hidroperoksitlerin redüksiyonunu katalize eder ve böylece hücreyi oksidatif hasardan korur (Mates ve ark. 1999). GSH-Px yağ asidi hidroperoksitleri gibi diğer peroksitleri de redükte edebilir (Krishnamurthy ve Wadhwani, 2012).

GSH, dokularda redükte (GSH) ve okside (GSSG) olmak üzere iki şekilde bulunan, glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan, hücrenin yükseltgenme ve indirgenme dengesini koruyan önemli bir indirgeyici ajandır ve vücudun oksidatif strese karşı korunmada kullandığı antioksidan bir tripeptitdir (Konukoğlu ve Akçay 1995;

Sezer ve Keskin 2014). GSH-Px enzimi tarafından katalizlenen reaksiyonla redükte formdaki GSH hidrojen peroksit ve lipit peroksitlerle reaksiyona girerek bu moleküllerin detoksifikasyonunda rol alırken, kendisi başka bir GSH molekülüyle disülfit köprüsü oluşturarak GSSG formuna dönüşür (Konukoğlu ve Akçay 1995; Sezer ve Keskin 2014). Hücre içinde serbest radikallerin detoksifikasyonun sürdürülmesi için GSSG NADPH'ın kullanıldığı bir reaksiyonla GSH-Rd enzimiyle tekrar redükte GSH formuna çevrilir (Aktaş ve ark. 2005). GSH protein tiol gruplarının oksidasyonu direk olarak reaktif türlerle reaksiyona girerek ya da indirek olarak glutatyon transferazlar (GSTs) aracılığıyla da engellemektedir (Krishnamurthy 2012). Selenyum, bakır, çinko ve manganezde antioksidan enzimlerin kofaktörleri olduğundan önemli elementlerdir (Krishnamurthy ve Wadhwani 2012).

Nonenzimatik korunmada; C vitamin, E vitamini, beta karoten, ürik asit, glutatyon gibi bir seri düşük molekül ağırlıklı serbest radikal temizleyici, serbest radikallerle reaksiyona girerek onları daha az zararlı ve daha stabil türevlere dönüştürebilmektedirler (Kavas 1989; Erenel ve ark. 1992; Birben ve ark. 2012).

Pek çok kanser türünde yüksek ROS seviyeleri saptanmakta ve malign progresyon ve tedaviye dirençle ilişkilendirilmektedir (Morry ve ark. 2016). ROS, köpük hücre oluşumu ve arterlerde aterosklerotik plakların oluşumuna neden olan, düşük dansiteli lipoprotein (LDL), kolesterol ve kolesterol türevlerinin oksidasyonu ve protein modifikasyonunu uyarabilir. Serbest oksijen radikallerinin membran lipid peroksidasyonu ve proteolize sebep olarak miyokardial kontraktiliteyi azaltıp, miyokontraktil fonksiyonların bozulması ve yapısal anormallikler, endotelyal proinflamatuar sitokinlerin sentezlenmesine bağlı endotelyal disfonksiyon ve katekolaminlerin otooksidasyonu sonucu kardiak disfonskiyona neden olduğu bildirilmektedir. Ayrıca, antioksidan enzim düzeylerinin çeşitli kalp hastalıklarında azaldığı, C ve E vitamini gibi antioksidan alınması durumunda kardiyovasküler hastalıklardan korunulduğu rapor edilmiştir (Ayağ 2010; Sezgin ve ark. 2004; Zhang ve ark. 2014).

Total Antioksidan Kapasite (TAK) tayini

Antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesinde kullanılan ve esası ortamdaki serbest radikal temizleyicilerinin miktarının ölçümüne dayanan bir tayindir. TAK tayininde sıklıkla kullanılan testler; Troloks eşdeğer antioksidan kapasite (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) gibi, bir madde oksidasyonunun inhibisyonu yeteneğini değerlendiren direkt testler ya da Ferri indirgenme antioksidan kapasitesi (ferric reducing–antioxidant power/ferric reducing ability of plasma, FRAP) ve bakır indirgenme antioksidan kapasitesi (cupric reducing antioxidant capacity, CUPRAC) gibi bir örneğin bir metal kompleksi redükte etme yeteneğini değerlendiren indirekt testlerdir. TEAC testi; bir örnekte bulunan antioksidanların test ile oluşturulan okside ürünleri redükte ya da inhibe etme yeteneklerinden temel alır. ABTS (2,2′-azino-bis(3-etilbenz-tiazolin-6-sulfonik asid) uygun kimyasalla inkübe edildiğinde, bir ABTS radikali ($ABTS^{\bullet+}$) oluşur. ABTS radikali 650, 734 ve 820 nm maksimum absorbansta mavi-yeşil renklidir. Örnekteki antioksidanlar ABTS radikalini redükte ederek antioksidan konsantrasyonuyla orantılı olacak bir derecede bu renk oluşumunu süprese ederler. Mavi-yeşil kromofor absorbasında azalma, örneğin antioksidan içeriğiyle ters orantılıdır ve kontrol antioksidan, Trolox, hidrofilik bir E vitamini analoğudur. FRAP testi ferri iyonlarının ferröz iyonlara redüksiyonunu esas alır. Ferri tripridiltriazin (Fe^{3+}-TPTZ) kompleksinin, düşük pH ile örnekteki antioksidanlar tarafından ferröz tripridiltriazin (Fe^{2+}-TPTZ)'e redüksiyonu ve 593 nm maksimum absorbansta mavi renkli olan bu son ürünün absorbansındaki değişiminin plazmanın antioksidan kapasitesi ile ilişkili olması esasından temel alır. CUPRAC testi bir örnekteki antioksidanların, şelat yapıcı ajanların varlığında Cu^{+2}'yi Cu^{+1}'e redükte etme kapasitesini değerlendirir. Bu şelat yapıcı ajanlar Cu^{+1} ile maksimum absorbansa sahip renkli stabil kompleksler oluştururlar. Bu absorbans değeri TAK ile orantılıdır (Kusano ve Ferrari 2008; Rubio ve ark. 2016).

2.6. Apoptozis ve Otofaji

Apoptozis

Aktif, inflamasyon ortaya çıkarmayan programlanmış hücre ölüm süreci olup gelişim ve yaşlanma sürecinde normal olarak, dokulardaki hücre popülasyonun sürdürülmesinde hemostatik mekanizma olarak, aynı zamanda immun reaksiyonlar ya da zararlı ajanlara bağlı hasarda bir defans mekanizması olarak oluşmaktadır (Elmore 2007; Fink ve Cookson 2015). Apoptozis, tümör nekroz faktör-α (tumor necrosis factor, TNF-α), ilk apoptoz sinyal reseptörü (First apoptosis signal receptor, FAS), diferansiasyon kümesi-95 (cluster of differantiation-95, CD-95), apoptoz antijen-1 (Apoptosis antigen-1, APO1) ve TNF bağlantılı apoptoz indükleyici ligand R1 (TNF-related apoptozis inducing ligand R1, TRAIL) reseptörleri gibi hücre yüzey ölüm reseptörleri aracılığıyla ekstrinsik yolla veya mitokondrial sinyal yolakları ile intrinsik yolla tetiklenebilir. Her iki durumda da kaspazların aktivasyonu mitokondrial membran geçirgenliği ile sonuçlanarak hücrenin yıkımına öncülük eder (Nikoletopoulou ve ark. 2013). İki yolağın birbiriyle bağlantılı olduğu ve bir yolaktaki moleküllerin diğer yolağı da etkilediğini gösteren çalışmalar vardır. Bu iki yola ek olarak T hücre aracılı sitotoksisite ve perforin-granzyme bağımlı hücre ölümü de bulunmaktadır (Elmore 2007).

Apoptozise, hücrenin yuvarlaklaşması, çevre hücrelerle olan temasın kaybolması, hücresel hacimde azalma, kromatin kondensasyonu, nükleer fragmantasyon, klasik olarak stoplazmik organellerde ultrastriktüel modifikasyon olmaması ya da çok az olması, hücre membranında tomurcuklanma, sürecin son safhalarına kadar membran bütünlüğünün korunması eşlik eder (Tomatir 2003; Kroemer ve ark. 2009). Apoptozis hücresel fragmanların membranla çevrili parçalara ayrılmasıyla karakterizedir. Bu fragmanlar ya da apoptotik cisimler diğer hücreler tarafından alınarak fagozomlarda yıkılır (Fink ve Cookson 2015). Apoptotik hücrenin hücresel içeriğinin etraftaki dokulara serbestleşmemesi ve makrofajlar ya da komşu normal hücrelerce hızlıca fagosite edilmesi nedeniyle inflamatuar reaksiyon oluşmamaktadır (Elmore 2007).

Apoptozisin regülasyonu p53 ile başlayan kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. Apoptozis regülasyonu Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanır. Bu aileden Bcl-2, Bcl-

xL, Bcl-W, Boo, Mcl-1 apoptozisi inhibe ederken, Bax, BH3 aileleri proapoptotiktir. Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax proteinleri mitokondri zarının permeabilite geçiş poruna bağlanır, bu bağlanma seçici iyon geçirgenliğini azaltır ve sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktör (apoptosis inducing factor, AIF) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler stoplazmaya geçer. Sitokrom c, bir stoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanması prokaspas 9'u aktive eder ve oluşan kompleks apoptosom olarak isimlendirilir (Tomatir 2003). Kaspaz 9 prokaspaz 3'ü aktif kaspaz 3 haline getirmektedir. Ekstrinsik yolakta ise ölüm reseptörü ligand bağlanması ile prokaspaz 8'den aktif kaspaz 8 oluşumu sağlanır ve aktive kaspaz 8 ya direkt olarak ya da indirekt olarak kaspaz 9'u aktive ederek kaspaz 3'ü aktivite eder. Aktif kaspaz 3, kaspaz aktive edici DNAaz (caspase activated DNAase, CAD)'ı serbestleştirir. CAD çekirdekte kromatin yoğunlaşması ve DNA'da fragmantasyona neden olur. Apoptoziste kromatindeki değişikliklerin başlamasından hemen öncesinde sitozolik Ca düzeyinde de önemli bir artış olur (Tomatır 2003; Coşkun ve Özgür 2011).

Apoptozis tayininde sıklıkla elektron ve floresans mikroskopisi, faz kontrast mikroskopisi, Annexin V yöntemi, TUNEL yöntemi, Western Blot ile apoptozise özgü proteinlerin (Bcl-2, kaspaz 3, sitokrom c vb.) tayini yöntemleri kullanılır (Güleş ve Eren 2008).

TUNEL yöntemi; apoptotik hücrelerin tanımlanması ve ölçülmesi için kullanılan DNA zincir kırıklarının flokromlarla etiketlenerek belirlendiği bir yöntemdir. DNA zincir kırıkları apoptoziste görülen en karakteristik olaylardandır. DNA zincir kırığının 3'-OH sonunun florokrom ekzojen terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak etiketlenmesi TUNEL yöntemi olarak bilinmektedir (Darzynkiewicz ve ark 2008; Güleş ve Eren 2008).

Annexin V yönteminde fosfatidilserinin sağlıklı hücrelerde plazma membranının iç yüzünde lokalize olmasından yola çıkılır. Apoptoziste hücre zarının iç yüzeyinden dışarıya fosfotidilserin translokasyonu olur, bu durum aynı zamanda apoptotik cisimin fagositozu için bir uyarıcıdır. Annexin V, bir rekombinant fosfatidilserin bağlayıcı proteindir ve spesifik olarak fosfatidilserine bağlanır. Annexin V floresanla işaretlendiğinde (FITC etiketli) floresans mikroskop ya da flow sitometrik olarak değerlendirilebilir ve apoptozis tayininde kullanılabilir. Propidium iodür (PI) gibi

membranı geçemeyen nükleik asit boyalarının kullanılması ile nekroz kontrolü ve fosfotidilserin pozitif hücrelerin membran bütünlüğü gösterilerek erken ve geç apoptotik hücre ayrımı yapılır (Tomatır 2003; Elmore 2007; Fink ve Cookson 2015).

Flow sitometrik inceleme temel olarak akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin bir ışık demeti önünden tek tek geçirilerek hücrelerin incelenmesi ve elde edilen verilerin istatistiksel analiz ve grafik haline getirilerek yorumlanmasına dayanır. Flow sitometri cihazının farklı detektörleri ile hücrenin boyutu (forward scatter channel (FSC) detektörü), hücrenin granüler içeriği (side scatter channel (SSC) detektörü) ve değişik dalga boylarında floresan ölçümü sağlayan floresan filtre ve dedektörleri ile incelemek istediğimiz antijene ait monoklonal antikorun floresansı ölçülebilir. Flow sitometri ile birden fazla floresans madde kullanılarak aynı anda birden fazla parametrenin incelenmesi de mümkündür. Flow sitometri değerlendirilmesi yapılırken öncelikle hücre dağılımına bakılarak incelenecek hücre grubu seçilir, bu işlem kapı alma olarak adlandırılır. Kapılar başlıca analiz edilen alandaki dışlanmak istenen hücrelerin uzaklaştırılması ve azaltılmasında kullanılır. Elde edilen veriler farklı grafiklerle gösterilebilmektedir. Sıklıkla tek parametre değerlendirmelerinde histogramlar, birden fazla parametre değerlendirmelerinde ise nokta alan grafikleri kullanılmaktadır (Taneli 2007; Karaboz ve ark. 2008; Kanev ve Muranlı 2016).

Otofaji

Otofaji ya da tip 2 hücre ölümü; hücresel komponentlerin ölen hücre içerisinde otofajik vakuollerde yıkımıyla karakterizedir (Fink ve Cookson 2015). Otofaji, apoptoza ek ya da alternatif olarak düşünülen temel ölüm yollarından biridir (Karadağ 2016). Otofajinin morfolojik karakteristikleri vakuolizasyon, stoplazmik içeriğin degradasyonu ve hafif kromatin kondensasyonudur. Otofajik yolak stoplazmik materyalin ve/veya organellerin otofagozom olarak bilinen çift membranlı veziküller içine alınmasıyla başlar (Fink ve Cookson 2015; Karadağ 2016). Otofagozomlar daha sonra lizozomlarla füzyona uğrar ve içerik degrade olur. Otofajinin, apoptozisten farklı olarak, besin yokluğu ya da hücresel stres durumunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hemostazisin korunmasında yardımcı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Karadağ 2016). Fosfotidilinositol 3 kinazlar (phosphotydinil-3 kinaz, PI3K) otofajik vakuol oluşumunun kontrolünde ana sinyal molekülüdür (Karadağ 2016).

Otofaji tip I ve III PI3Klar tarafından düzenlenir. Otofajide temel mekanizmayı oluşturan genler otofaji ile ilişkili genler (autophagy related genes, ATG) olarak adlandırılır (Karadağ 2016). Otofajinin değerlendirilmesinde elektron ve floresans mikroskopisi, Western Blot ve flow sitometrik yöntemler kullanılabilir. Akridin oranj sıklıkla flow sitometride kullanılan hücre membranını geçebilen, proton eklenebilen, yeşil florofor bir boyadır. Akridin oranj, asidik kompartmanlarda kırmızı floresan verir. Akridin oranjın metakromatik değişimi konsantrasyon bağımlıdır. Akridin oranj asidik veziküler organellerde (otolizozom gibi) tutulur ve bu nedenle kırmızı floresans verir. Akridin oranjın otolizozomal birikimi flow sitometrik olarak değerlendirilebilir (Thomé 2016).

Nekroz

Nekroz genel olarak irreversbl ekzojen zedelenme ile oluşan hücre ölümünün makroskopik ve histolojik karşılığı olarak kullanılır. Morfolojik olarak hücre hacminde artma, organellerde şişme, hücre membranının ve takiben hücre içeriğinin kaybıyla karakterizedir. Nekrotik hücreler, inflamatuar cevabı uyaran faktörleri serbestleştirdiğinden nekrotik ölümü tipik olarak inflamatuar reaksiyonlar takip eder (Kroemer ve ark. 2009; Nikoletopoulou ve ark. 2013; Robbins 2003).

2.7. Kardiak Biyogöstergeler

Kalp hasarında kana salınan ve kardiovasküler hasarın göstergesi olarak değerlendirilen başlıca kardiak biyogöstergeler arasında kardiak troponin T ve troponin I, CK-MB (kreatin kinaz), miyoglobin, B tip natriüretik peptid (BNP), C-reaktif protein (hsCRP), myeloperoksidaz ve iskemi modifiye albümin (IMA) sayılabilir (Acosta 2008; Singh ve Nigam 2011).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik dispenser pipet (15-300 µL)	Eppendorf
Ayarlanabilir 8 kanallı otomatik boru (1-10 µL; 30-300 µL)	Eppendorf
Ayarlanabilir otomatik pipet (0,1-2,5 µL; 0,5-10 µL; 10-100 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL)	Eppendorf
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik
Derin dondurucu (-20 °C)	Bosch
Derin dondurucu (-80 °C)	Nuaire Ultralow Freezer
Etüv	Heraeus
Faz-kontrast invert mikroskop	Olympus (CX41)
Flow sitometri	Novocyte 1000 (Acea)
Hassas terazi	Sartorius, Mettler
Karbondioksitli inkübatör	Thermo Scientific (Heracell 150i)
Laminar akımlı kabin (Biyogüvenlik seviyesi 2)	Tezsan
Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre	Biotek (Epoch)
Mili-Q saf su cihazı	Merck Millipore
Orbital çalkalayıcı	Stuart (SSM1)
Otoklav	Hirayama (HV-50L)
Otomatik hücre sayma cihazı	Luna (L10001-LogosBiosystems)
pH metre	Hanna (PH 211)
Soğutmalı mikrosantrifüj	Hettich (Micro 200)
Soğutmalı santrifüj	Hettich (Universal32)

Ultrasonik banyo	Ultrasonic LC 30 H
Vorteks	Ika (NC 28405)

3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Kitler

AM-2201	Lipomed (Lot Nr: 1503.1B1.1)
Antibiyotik çözeltisi	Multicell (450 201EL)
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Biomatik (A2424)
Dulbecco'nun modifiye edilmiş besiyeri (DMEM) (High glucose)	Multicell (319005 CL)
Etil alkol	Merck (K38999227)
Fosfat tampon çözeltisi (PBS) (divalent katyonları (Ca^{++}, Mg^{++}) içermeyen, pH 7,4; 10X)	Multicell (311415CL)
Fötal sığır serum (FBS) (inaktive edilmemiş)	Capricon (FBS-12A)
MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür)	Biomatik (A3338)
TAK tayin kiti	Sigma (MAK187)
Tripan mavisi	Fluka (93595)
Tripsin (1:250)	Multicell (625-035-TG)

3.3. Kullanılan Sarf Malzemeler

Falkon tüp (50 mL)	Interlab
Hücre kültür kabı (25 cm^2; 75 cm^2)	Nest, Corning
Kriyo vial (1,5 mL)	Axygen
Mikroplaka (6, 24 ve 96 kuyulu)	Nest
Mikrosantrifüj tüpü (1000 µL)	Eppendorf
Pastör pipeti (3 mL)	Interlab
Petri kutusu (7-10 cm)	Nest

Pipet ucu (10-100 µL; 100-1000 µL)	Axygen T
Santrifüj tüpü (15 mL)	Interlab
Steril enjektör ucu filtre (0,22 µm)	Millex-GS

3.4. Kullanılan Yöntemler

Çalışma İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı laboratuarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Hücre Kültürü

Hücre Dizisinin Temini

Çalışmada kullanılan sıçan kardiyomiyoblast hücre dizisi; H9c2 (2-1) (ATCC® CRL-1446™) Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (American Type Cell Culture, ATCC) bankasından satın alındı. Hücre dizileri kriyo vialler içerisinde -196 °C′de sıvı azot tankı içerisinde saklandı.

Hücre Dizisinin Açılması

Kullanılan çözeltiler:

FBS çözeltisi: İnaktive edilmemiş FBS 30 dk 56 ºC'de ve 10 dk 37 ºC'de inkübe edilerek inaktive hale getirildi.

Antibiyotik çözeltisi: 1 mL penisilin/streptomisin (10.000 U/10.000 µg/mL) 9 mL steril suda çözüldü.

FBS ve antibiotik çözeltileri hazırlandıktan sonra 0,22 µm çapındaki steril filtrelerden geçirilerek sterilize edildi.

Hücre kültür besiyeri (Serumlu): 10 mL FBS çözeltisi ve 1 mL antibiyotik çözeltisi (%1) 89 mL DMEM (4,5 g/L glukoz) besiyerine ilave edildi. Hücre besiyeri +4 ºC'de muhafaza edildi.

Sıvı azot buharında soğuğa dayanıklı vialde saklanan hücreler 37 °C'lik su banyosunda 1-2 dk süre ile bekletilerek çözünmeleri sağlandı. Hücreler 15 mL'lik falkona alındı ve 5 mL serumlu besiyeri ilave edilerek pipetajlama yapıldı. Hazırlanan hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 3 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Üzerine tekrar 5 mL serumlu besiyeri eklenerek hücre süspansiyonu tekrar 1200 rpm'de 3 dk santrifüj

edildi. Süpernatant atılarak kalan hücre pelletine 1 mL serumlu besiyeri eklenerek pipetajlama yapıldı ve hücre süspansiyonu 25 cm^2'lik ya da 75 cm^2'lik flasklarda 5-10 mL serumlu medyum içerisine ekilerek 37 °C'de, %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat süreyle inkübe edildi. Faz-kontrast invert mikroskop ile hücrelerin yoğunluğu düzenli olarak kontrol edilerek hücre yoğunluğunun yaklaşık %70 konfluent duruma geldiği tespit edilince hücreler pasajlandı ya da testlerde kullanıldı.

Hücrelerin Pasajlanması

Kullanılan çözeltiler:

PBS çözeltisi (1X): 10 mL PBS çözeltisi (10X) 90 mL steril su ile seyreltildi.

Tripsin - EDTA çözeltisi (%0,2 - %0,04): 0,04 g EDTA ve 0,2 g tripsin 100 mL PBS çözeltisi (1X)'nde çözüldü.

Hücre pasajlama işleminde; öncelikle hücre kültür flaskındaki süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı. Hücresel ve serum kaynaklı artıklarının uzaklaştırılması için hücrelerin yüzeyi PBS (1X) ile yıkandı. Hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılmaları için kültür ortamına tripsin-EDTA çözeltisi ilave edilerek 37 °C'de, %5 CO_2'li inkübatörde 5-10 dk bekletildi. Tutundukları yüzeyden ayrılan hücrelerin üzerine serumlu besiyeri eklendi ve hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 3 dk süre ile santrifüj edildi. Bu işlem bir kez daha tekrarlandı. Hücreler otomatik hücre sayma cihazı ile sayılarak yaklaşık 10^5 hücre/mL olacak şekilde yeni kültür ortamlarına aktarılıp serumlu besiyeri eklenerek 37 °C'de, %5 CO_2'li inkübatörde kültüre edildi.

Hücrelerin Stoklanması

Kullanılan çözelti:

Hücre stok besiyeri (DMSO'lu): 1 mL DMSO ve 1 mL FBS çözeltisine 100 µL antibiyotik çözeltisi (%1) ve 7,9 mL hücre kültür besiyeri eklenerek hazırlandı.

Hücre kültüründe meydana gelebilecek risklere karşı hücreler, belli aralıklarla dondurularak saklandılar. Hücre stoklanması amacıyla flasktaki hücreler tripsin uygulaması ile yapıştıkları yüzeyden kaldırıldılar. Serumlu medyum ilavesini takiben hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 3 dk süre ile santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Saklanacak olan hücre pelletinin üzerine hazırlanan hücre stok besiyeri 1

mL ilave edilip, pastör pipeti ile pipetajlama yapılarak karıştırıldı. Yaklaşık 10^6 hücre/mL olacak şekilde hazırlanan hücre stokları soğuğa dayanıklı kriyo viallere alınarak, sırasıyla 30 dk -20 °C'de, 16-24 saat -80 °C'de bekletildikten sonra sıvı azot tankına kaldırılarak saklandı.

3.4.2. Maruziyet Ortamı

AM-2201 ($C_{24}H_{22}FNO$; molekül ağırlığı: 359,44; beyaz liyofilize toz; CAS No: 335161-24-5) Lipomed (Lot Nr: 1503.1B1.1V1; Art. Nr: JWH-1503-1; Arlesheim-İsviçre) firmasından tedarik edilmiştir.

AM-2201 stok çözeltisi (100 mM): 1 mg AM-2201 27 µL DMSO'da çözülerek hazırlandı.

Toksisite testleri için maruziyet süresi 48 saat ve maruziyet konsantrasyonları 12,5; 25; 50 ve 100 µM olarak belirlendi. Maruziyetlerde 6 ve 96 kuyulu mikroplakalar kullanıldı.

3.4.3. Sitotoksisitenin Tespiti

WST-1 Testi

Testte WST-1 (Roche Cell Proliferation Reagent, Roche, Almanya) kullanıldı.

Testin yapılışı:

96 kuyulu mikroplakalara $2{,}5 \times 10^3$ hücre/100 µL medyum/kuyu olacak şekilde hücreler dağıtılarak 37 °C'de %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her bir kuyucuğa test maddesi ½ oranında seyrelen 12,5; 25; 50 ve 100 µM maruziyet konsantrasyonlarında ve 3'er tekrar olacak şekilde tatbik edildi. 48 saatlik maruziyet sonrası her kuyuya 10 µL/kuyu WST-1 eklendi ve 37 °C'de %5 CO_2'li inkübatörde 30 dk bekletildi. Kör kontrol amacıyla kuyucuğa 100 µL besiyeri ve 10 µL WST-1 eklendi. Mikroplaka 150 rpm'de 1 dk. orbital çalkalayıcıda çalkalandı. Spektrofotometre ile 420 nm'de absorbans ölçüldü. Deneyler aynı koşullarda farklı 2 günde, her bir konsantrasyon için 3'er tekrar olacak şekilde yapıldı.

Değerlendirme:

Negatif kontrol hücrelerinde gözlenen absorbans değeri (optik dansite, OD) %100 canlılığa eşdeğer kabul edilerek; test maddesi AM-2201'e maruz kalan

hücrelerdeki ölüm oranı negatif kontrolün yüzdesi şeklinde aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

% inhibisyon konsantrasyonu (IC) = 100 – (ort. OD_{madde} x 100 / ort.$OD_{negatif\ kontrol}$)

Bir mikroplakadaki tekrarlar için absorbans değerlerinin ortalaması alınarak ve kontrol ile örnek absorbanslarından kör absorbansı çıkarılarak düzeltilmiş absorbans değerleri elde edilerek hesaplama yapıldı. Çalışmada sitotoksik etki potansiyelleri %50 inhibisyon konsantrasyonu (IC_{50}) üzerinden değerlendirildi. Ölüm-konsantrasyon ölçü eğrisinin elde edilmesinin ardından IC_{50} değeri eğri üzerinden hesaplandı.

LDH Testi

Testte Roche LDH cytotoxicity detection kit (Roche, Almanya) kullanıldı.

Reaksiyon karışımı (100 test için);

250 µL Katalist (şişe 1- mavi kapak - diaforaz/NAD karışımı)

11,25 mL Boya solüsyonu (şişe 2 - kırmızı kapak - iodotetrazolyum klorür/sodyum laktat karışımı)

Testin Yapılışı:

96 Kuyulu mikroplakalara $2{,}5x10^3$ hücre/100 µL medyum/kuyu olacak şekilde hücreler dağıtılarak 37 °C'de %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi. Besiyeri inkübasyon süresince hücrelerden salınan LDH'yı uzaklaştırmak için mikroplakadan uzaklaştırıldı ve her kuyuya 100 µL taze besiyeri eklendi. Başka bir mikroplakada seri dilüsyonlar halinde test maddesi hazırlandı ve her kuyucuğa 100 µL besiyeri içinde test maddesi eklendi. 12,5; 25; 50 ve 100 µM maruziyet konsantrasyonlarında 48 saatlik maruziyet sonrası mikroplakalardan 100 µL supernatant; alttaki hücre pelletine değmeden uzaklaştırılarak başka bir mikroplakaya alındı. Alınan supernatanta taze hazırlanan reaksiyon karışımından 100'er µL eklendi ve ışıktan korunarak 30 dk inkübe edildi. Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre ile 490 nm'de absorbans ölçüldü.

Kontrol grupları olarak; kör kontrol (besiyerindeki LDH aktivitesi) olarak sadece besiyeri eklenen kuyular, pozitif kontrol olarak hücre ve besiyerinde triton X-100 (son konsantrasyon %1 olacak şekilde; LDH aktivitesini etkilemeden hücrelerin

lizisiyle LDH‘ın serbest kalarak değerlendirilebilmesi için) eklenen kuyular, negatif kontrol (normal test maddesi uygulanmamış hücrelerden spontan LDH salınımını görmek için) olarak da besiyeri ve hücre eklenen kuyular kullanıldı.

Değerlendirme:

Mikroplakadaki tekrarlara göre absorbans değerlerinin ortalaması alınarak ve örnek absorbanslarından kör absorbansı çıkarılarak düzeltilmiş absorbans değerleri elde edildi. Aşağıda belirtilen formüle göre % sitotoksisite hesabı yapıldı;

$\%IC=(OD_{madde}-OD_{negatif\ kontrol})x100/(OD_{triton\ X\text{-}100}-OD_{negatif\ kontrol})$

Deneyler aynı koşullarda iki farklı günde her bir konsantrasyon için 3’er tekrar olacak şekilde yapıldı.

3.4.4. Oksidatif Hasar Potansiyelinin Tespiti

Diklorofluoressein (DCF) Testi

Kullanılan çözeltiler:

2',7'-diklorodihidrofluoressein diasetat (H_2DCF-DA) (stok çözeltisi): 20 mM olacak şekilde DMSO’da çözündürülerek hazırlandı.

BSA çözeltisi: 30 mg Bovine Serum Albumin (BSA) 3 mL PBS içerisinde çözündürülerek hazırlandı.

Testin Yapılışı:

Hücreler 6 kuyulu mikroplakalara yaklaşık $2,5x10^5$/mL/kuyu olacak şekilde dağıtıldı ve 37 °C’de %5 CO_2’li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda ortamdaki süpernatant uzaklaştırılarak, kuyular 1 mL PBS (1X) ile yıkandı. 12,5; 25; 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda AM-2201 eklendi ve 48 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyular 1 mL PBS (1X) ile 2 defa yıkandı. %0,2’lik tripsin çözeltisinden 0,5 mL ilave edilerek hücreler tripsinize edildi ve mikrosantrifüj tüpüne (1,5 mL) alındı. Hücre süspansiyonu 1200 rpm’de 3 dk süre ile santrifüj edildikten sonra 3 kere 1 mL PBS (1X) ile yıkandı. Hücre pelleti 1 mL PBS (1X) ile süspande edildi. Hücre süspansiyonuna 1 µL 20 mM olacak şekilde H_2-DCFDA ilave edilerek 37 °C’de %5 CO_2'li inkübatörde 30 dk süre ile inkübe edildi. Hücreler PBS (1X) ile yıkanıp 150 µL BSA ile süspande edildi. Ardından flow sitometri

cihazında Ex/Em: 488/535 nm'de okutuldu. Flow sitometri ile hücrelerin floresans yoğunluğu ölçüldü ve her tüpte 20.000 hücre değerlendirildi.

Değerlendirme:

Bilgisayar programı (NovoExpressSoftware) ile analiz edilen hücrelerden FSC/SSC grafiğindeki alanlardan DCF floresanı gösteren hücreler belirlenerek kapılama yapıldı (M2 kapısı). Sonuçlarda, serbest oksijen radikallerinin varlığı, total hücre miktarının yüzdesi olarak (M2 %) ifade edildi. Negatif kontrol olarak PBS kullanıldı. Deneyler aynı koşullarda iki farklı günde her bir konsantrasyon en az üç tekrar olacak şekilde yapıldı.

TAK Testi

Çalışmada Total Antioxidant Capacity Assay Kit (Almanya) kullanıldı. Kit protokolüne göre; bakır (Cu^{+2}) iyonu hem küçük moleküller hem de proteinler tarafından Cu^{+}'ya dönüştürülür. Bununla birlikte, protein maskesinin kullanımı protein ile Cu^{+2} indirgemesini engeller ve yalnızca küçük molekül antioksidanlarının analizini sağlar. Cu^{+1} iyonu kolorimetrik prob ile şelat yapar ve bu şelat 570 nm'de maksimum absorbans verir, bu absorbans değeri total antioksidan seviyesi ile orantılıdır.

Antioksidan standart olarak vitamin E'nin suda çözünen eşdeğeri Trolox ((±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) kullanılır

Kuyucuklara 4-20 nmol konsantrasyon aralığında olacak şekilde stok Trolox çözeltisinden eklendi. Örneklere ve Trolox standartlarına aşağıda belirtilen prosedür uygulandı.

Kit içeriği:

Cu^{+2} reaktifi	0,2 mL
Seyreltme çözeltisi	10 mL
Protein maske	10 mL
Trolox standard (1 µmol)	1 vial

Testin yapılışı:

Cu^{+2} test solüsyonu hazırlamak için, 1 kısım Cu^{+2} reaktifi ile 49 kısım seyreltme çözeltisi karıştırıldı. Trolox standardına 20 µL DMSO ilave edilerek vorteks ile

karıştırıldı. Üzerine 980 µL su ilave edilerek 1 mM Trolox standart çözeltisi elde edildi. Pipetleme ile iyice karıştırılan çözelti -20 °C'de ışıktan korunarak saklandı.

Yaklaşık $2.5x10^3$/100 µL/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu siyah mikroplakalara dağıtılan hücreler 37 °C'de %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ortamdaki süpernatant uzaklaştırıldı ve kuyular 100 µL PBS (1X) ile yıkandı. Trolox standart çözeltilerini hazırlamak üzere; 96 kuyulu mikroplakalarda 0 (boş, kör), 4, 8, 12, 16 ve 20 nmol/kuyu olacak şekilde 1 mM (1 nmol/µL) Trolox standart çözeltisinden 0, 4, 8, 12, 16 ve 20 µL ilave edildi ve kuyuların hacimleri 100 µL'e bidistile su ile tamamlandı. AM-2201 maruziyeti için ise kuyulara 12,5; 25; 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda AM-2201 eklendi. Mikroplaka 48 saat süre ile inkübe edildi. Her bir konsantrasyon için 3 kuyu planlandı. Deney günü her kuyuya 100 µL Cu^{+2} test solüsyonu ilave edildi, oda sıcaklığında ve karanlıkta 90 dk inkübe edildi ve 570 nm'deki absorbansları spektrofotometride ölçüldü. Deneyler aynı koşullarda iki farklı günde her bir konsantrasyon en az 3 tekrar olacak şekilde yapıldı.

Değerlendirme

Trolox standart konsantrasyonlarının absorbsiyon değerleri ile linear regresyon analizi uygulanarak Trolox standart eğrisine ve bu eğriyi tanımlayan eşitliğe ulaşıldı. Sonuçlar Trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC) değeri olarak ifade edildi. Örneklerin total antioksidan seviyeleri de bu eğri denkleminden yola çıkarak hesaplandı. Trolox 0 standardı kör olarak kullanıldı ve tüm değerlerden çıkartıldı. Trolox standartlarıyla elde edilen absorbans değerleri kullanılarak absorbans-standart eğrisi çizildi. Test her çalışıldığında yeni bir standart eğri hazırlandı.

$$C = SA / SV$$

C = Trolox eşdeğer konsantrasyonu (mM Trolox eşdeğeri; Örneğin antioksidan konsantrasyonu nmol/µL)

SV = Kuyucuğa eklenen örnek hacmi (µL)

SA = Örneğin standart eğriden elde edilen Trolox eşdeğeri (nmol)

3.4.5. Apoptoz Potansiyelinin Tespiti

Anneksin V-FTIC/PI Apoptozis Testi

Kit İçeriği:

Anneksin V-FITC	0,5 mL
Propidium iyodür(PI)	1 mL
10 X Bağlayıcı tampon	30 mL

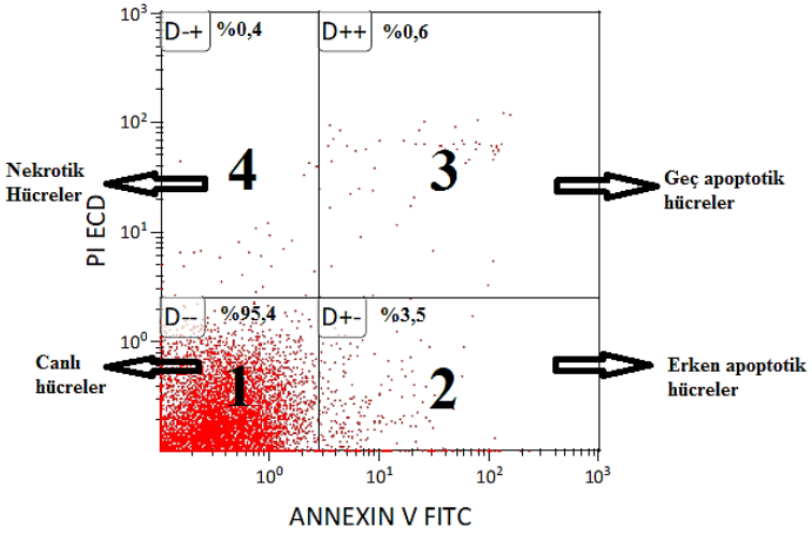
Testin Yapılışı:

Hücreler, 6 kuyulu mikroplakalara yaklaşık $2.5x10^5$/mL/kuyu olacak şekilde dağıtılıp 37 °C'de %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrası ortamdaki süpernatant uzaklaştırıldı ve kuyular 1 mL PBS (1X) ile yıkandı. Kuyulara 12,5; 25; 50 ve 100 µM konsantrasyonlarda AM-2201 maddesi eklenerek 48 saat süre ile inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, kuyular 1 mL PBS (1X) ile 2 kez yıkandı ve %0,2'lik tripsin çözeltisinden 0,5 mL ilave edilip hücreler tripsinize edildi. Mikrosantrifüj tüpüne (1,5 mL) alınan hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 3 dk süre ile santrifüj edildi. Hücre pelleti 1 mL PBS (1X) ile yıkandı. Distile su ile 1/10 oranında seyreltilen bağlayıcı tampondan 1 mL ilave edilerek hücreler yıkandı ve 1200 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Hücre pelleti $1\text{-}5x10^6$/mL olacak şekilde bağlayıcı tampon (1X) ile süspande edildi. 100 µL hücre süspansiyonuna 5 µL Annexin V eklendikten sonra 15 dk süreyle oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. Hücre pelleti 1 mL bağlayıcı tampon (1X) ile tekrar yıkanarak 200 µL bağlayıcı tampon ile süspande edildi. Süspansiyonun üzerine 5 µL PI eklendi ve flow sitometri cihazında Annexin V-FTIC için Ex/Em: 494/518 nm, PI için Ex/Em: 535/617 nm olarak kullanılarak okutuldu.

Değerlendirme:

Flow sitometri cihazında bilgisayar programı (NovoExpress Software) ile analiz edilen hücreler FSC/SSC grafiğinde belli alanlara düşer ve bu alanlardan incelenecek hücrelerin yeri belirlenerek kapılama yapılır. Grafiğin 4 bölgesine düşen hücrelerin her birisi farklı özellikteki hücreleri göstermektedir. Nekrotik hücreler Annexin V (negatif) / PI (pozitif); canlı hücreler Annexin V (negatif) / PI (negatif), erken apoptotik hücreler

Annexin V (pozitif) / PI (negatif), geç apoptotik hücreler Annexin V (pozitif) / PI (pozitif) ekspresyonu ile tayin edilir. Bu çalışmada her tüpte 20.000 hücre değerlendirilerek, sonuçlar total hücre miktarının yüzdesi (%P1) olarak bildirilmiştir. Deneyler aynı koşullarda iki farklı günde her bir konsantrasyon için en az 3 tekrar olacak şekilde yapıldı.



Şekil 3-1: Flow sitometride apoptoz tayini için elde edilen grafiğin şematik gösterimi.
1 numaralı bölge canlı hücreleri, 2 numaralı bölge erken apoptotik hücreleri, 3 numaralı bölge geç apoptotik hücreleri ve 4 numaralı bölge nekrotik hücreleri gösterir.

3.4.6. Otofajik Potansiyelin Tespiti

Akridin Oranj ile Otofaji Tespiti

Kullanılan çözelti:

2 g Akridin orange 100 mL bidistile suda çözülerek stok akridin orange süspansiyonu taze hazırlandı.

Testin yapılışı:

6 Kuyulu mikroplakalara yaklaşık $2.5x10^5$/mL olacak şekilde dağıtılan hücreler 37 °C'de %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ortamdaki süpernatant uzaklaştırıldı ve kuyular 1 mL PBS (1X) ile yıkandı. Kuyulara 12,5; 25; 50 ve 100 µM konsantrasyonlarında AM-2201 eklendi ve 48 saat inkübe edildi. 1 mL PBS (1X) ile 2 defa yıkandı ve %0,2 tripsinden 0,5 mL ilave edilerek hücreler tripsinize

edildi ve 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Hücre süspansiyonu 1200 rpm'de 3 dk süre ile santrifüj edildi ve hücreler sayıldı. $5x10^5$ hücre 500 µL L-DMEM'de süspande edildi. Stok akridin orange süspansiyondan 2,5 µL ilave edildi ve 15 dk karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi. Flow sitometride (PerCP filtre: Ex/Em: 488/676 nm) ölçüm gerçekleştirildi.

Değerlendirme:

Bilgisayar programı (NovoExpress Software) ile FSC/SSC grafiğinde belli alanlara düşen hücrelerin yerlerini belirlemek için kapılama yapıldı (M2 kapısı). Her tüpte 20000 hücre değerlendirildi ve sonuçlar toplam hücreye oranla otofaji görülme yüzdesi (%M2) olarak ifade edildi. Deneyler aynı koşullarda iki farklı günde her bir konsantrasyon için 3'er tekrar olacak şekilde yapıldı.

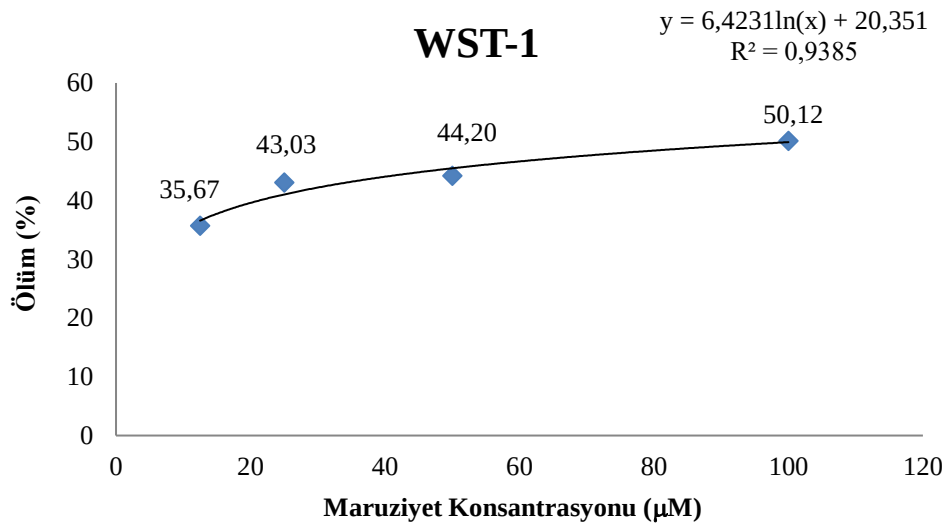
4. BULGULAR

Tez çalışmasında sentetik kannabinoidlerden AM-2201'in sıçan kardiyomyoblast H9c2 hücre dizisi üzerinde kardiyotoksik etki potansiyelinin değerlendirilebilmesi amacıyla sitotoksisite (WST-1 ve LDH testleri ile), oksidatif hasar (H_2DCFDA ile ROS düzeyleri, TAK tespiti), apoptoz (Anneksin V-FTIC/PI apoptoz testi ile) ve otofaji (Akridin orange ile) tespiti yapıldı.

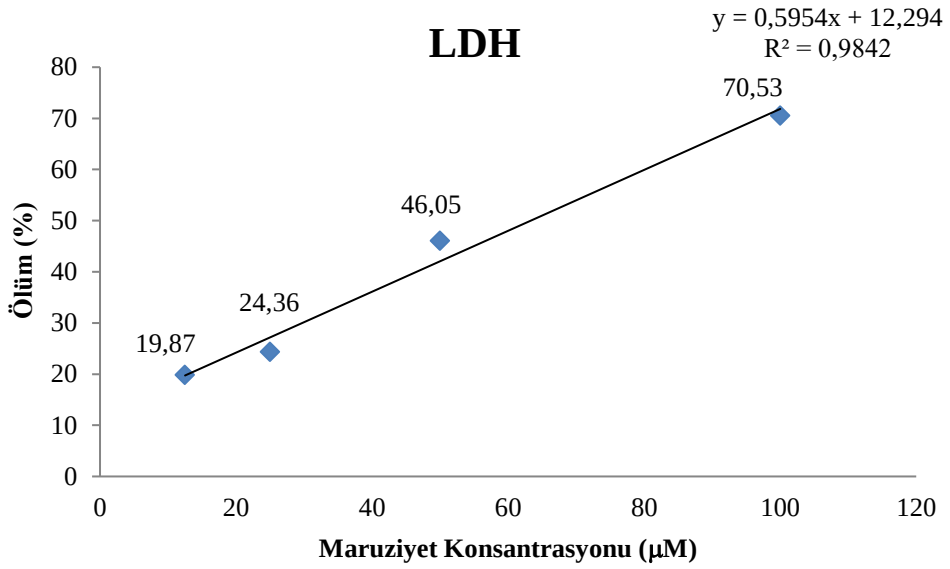
4.1. Sitotoksisitenin Değerlendirilmesi

Bölüm 3.4.3'te belirtildiği üzere AM-2201'in H9c2 hücre dizisi üzerine sitotoksik etki potansiyelleri 12,5-100 µM konsantrasyon aralığında AM-2201 maruziyetini takiben WST-1 ve LDH sitotoksisite testleri kullanılarak 24 ve 48 saat maruziyet süreleri için değerlendirildi. Ancak, her iki test için de 24 saatlik maruziyette IC_{50} değerlerine ulaşılamadı. WST-1 ve LDH test sonuçlarına göre 24 saatlik maruziyette en yüksek ölüm oranı 100 µM maruziyet konsantrasyonu için sırasıyla maksimum % 4,15 ve % 5,9 olarak tespit edildi.

Maruziyet süresinin 48 saat olması durumunda WST-1 ve LDH testleri ile elde edilen sonuçlar sırasıyla Şekil 4-1 ve Şekil 4-2'de gösterilmiştir. AM-2201 için WST-1 ve LDH sitotoksisite test sonuçlarına göre IC_{50} değerleri sırası ile 101,49 ve 63,33 µM olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4-1: AM-2201'in H9c2 hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin WST-1 testi ile 48 saatlik maruziyet sonucunun değerlendirilmesi



Şekil 4-2:AM-2201'in H9c2 hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin LDH testi ile 48 saatlik maruziyet değerlendirilmesi.

WST-1 ve LDH sitotoksisite testleri ile elde edilen sonuçların kıyaslaması Tablo 4-1'de verilmiştir.

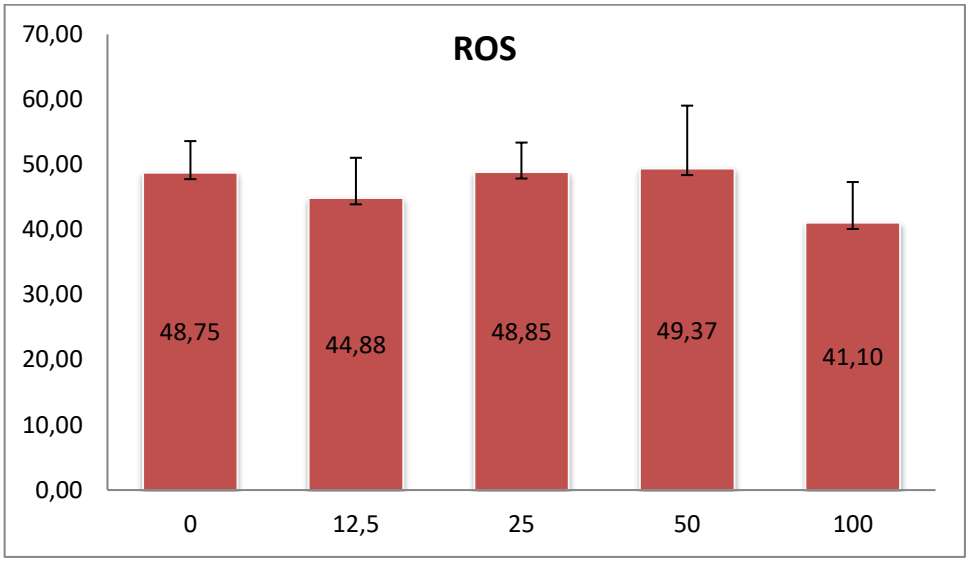
Tablo 4-1: AM-2201'in H9c2 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri için WST-1 ve LDH sonuçlarının kıyaslanması.

Maruziyet konsantrasyonu	% Ölüm (ortalama ± standart hata)	
(µM)	**WST-1**	**LDH**
6,25	-	-
12,5	35,66 ±1,25	19,87 ±1,25
25	43,02 ±2,24	24,36 ±2,56
50	44,19 ±2,68	46,04 ±4,65
100	50,11 ±3,69	70,53 ±5,29
IC_{50}	**101,49 µM**	**63,33 µM**

WST-1 ve LDH testlerinde elde edilen veriler değerlendirildiğinde hücrelerin AM-2201 ile 48 saatlik maruziyetinin uygun olacağına karar verilmiş ve diğer testler 48 saatlik maruziyet üzerinden gerçekleştirilmiştir.

4.2. Oksidatif Hasar Potansiyelinin Değerlendirilmesi

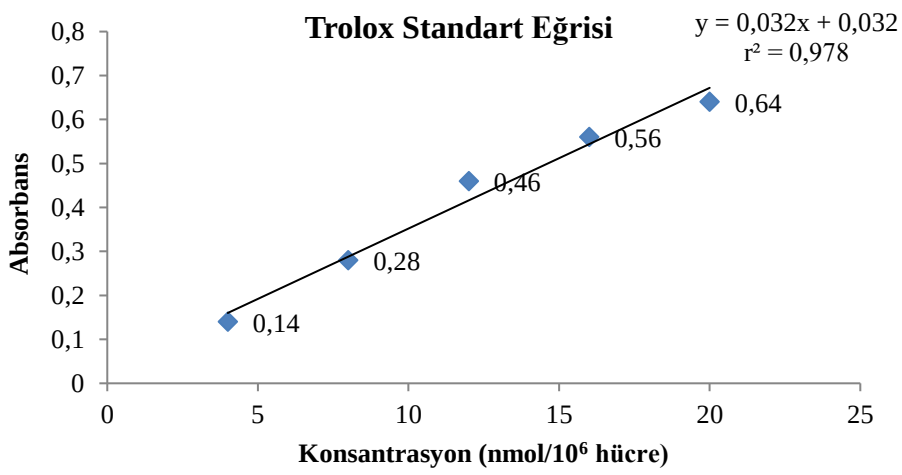
Bölüm 3.4.4'te belirtildiği üzere AM-2201'ün H9c2 hücre dizisi üzerine ROS oluşturma potansiyeli 48 saat süre ile 12,5-100 µM konsantrasyon aralığında AM-2201 maruziyetini takiben flow sitometrik yöntem ile test edildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4-3'de gösterilmiştir.



Şekil 4-3: AM-2201'in H9c2 hücreleri üzerine oksidatif hasar oluşturma potansiyelinin Flow sitometrik yöntem ile değerlendirilmesi.

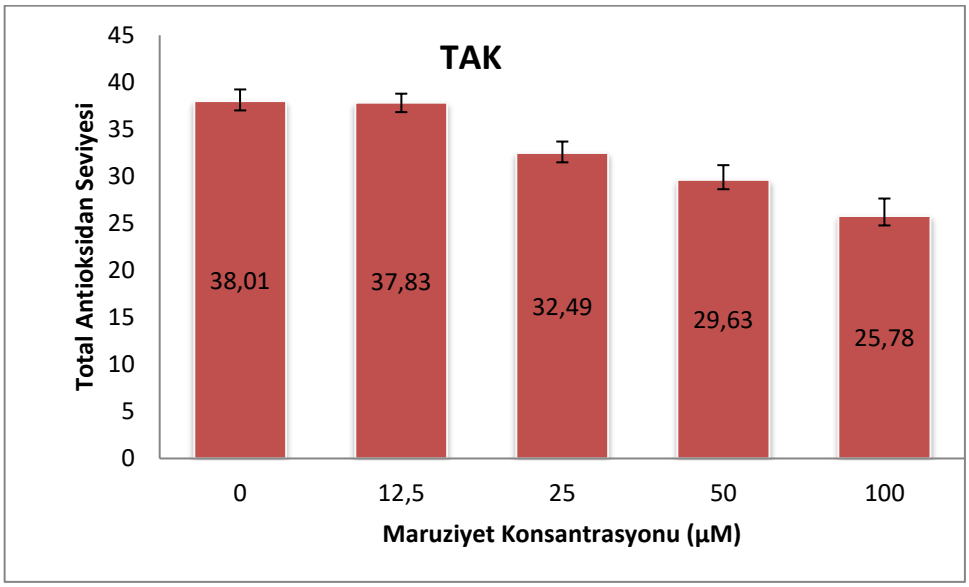
AM-2201'in 12,5; 25; 50 ve 100 µM maruziyet konsantrasyonlarında ROS seviyelerinde kontrole kıyasla <%15,69 azalma tespit edilmekle birlikte elde edilen verilerin istatistiksel düzeyde anlamlı olmadığı görüldü.

Bölüm 3.4.4'te belirtildiği üzere AM-2201'ün H9c2 hücre dizisinde oksidanlara karşı savunma sistemini tüketme potansiyeli (TAK düzeyi üzerine etkisi) 48 saat süre ile 12,5-100 µM konsantrasyon aralığında AM-2201 maruziyetini takiben Elisa yöntemi ile test edildi. Trolox standart eğrisine ait veriler Şekil 4-4'de, eğriye göre Trolox eşdeğeri üzerinden AM-2201'e maruz bırakılan H9c2 hücrelerindeki TAK düzeyleri Şekil 4-5'de gösterilmiştir.



Şekil 4-4: Trolox standart eğrisi.

AM-2201'e maruz hücrelerde antioksidan kapasitesinin konsantrasyona bağımlı olarak azaldığı tespit edildi. Ancak azalma istatistiksel düzeyde anlamlılık taşımamaktadır ($p \geq 0{,}05$). Kontrole kıyasla ≥%32,18 oranında kapasitede azalma gözlendi. Ancak, en yüksek maruziyet konsantrasyonları olan 50 ve 100 µM maruziyet durumunda sitotoksisitenin yüksek olduğu göz ardı edilmemelidir.



Şekil 4-5: AM-2201'in H9c2 hücreleri üzerine TAK düzeyi.

4.3. Apoptoz Potansiyelinin Değerlendirilmesi

Bölüm 3.4.5'te belirtildiği üzere AM-2201'ün H9c2 hücre dizisi üzerine apoptotik etki potansiyelleri için 48 saat süre ile 12,5-100 µM konsantrasyon aralığında AM-2201 maruziyetini takiben Anneksin V-FTIC/PI yöntemi kullanılarak değerlendirildi (Tablo 4-2).

AM-2201'e maruz kalan H9c2 hücrelerinde en yüksek maruziyet konsantrasyonu olan 100 µM için gözlenen ölümlerde erken apoptoz görülmez iken, toplam hücreye oranla geç apoptozis görülme yüzdesi maksimum %1,17 olarak tespit edildi. H9c2 hücrelerinde negatif kontrole kıyaslandığında AM-2201 ile 100 µM maruziyet konsatrasyonu için toplam apoptozisin 3 kat artmış olduğu görüldü. Ancak bu indüksiyonun kontrole kıyasla istatistiksel anlamlılık taşımadığı tespit edildi ($p \geq 0,05$). Anneksin V yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre AM-2201'ün apoptotik etki potansiyeli Tablo 4-2'de verilmiştir.

Tablo 4-2: H9c2 hücreleri üzerinde AM-2201 maddesinin apoptotik etkileri.

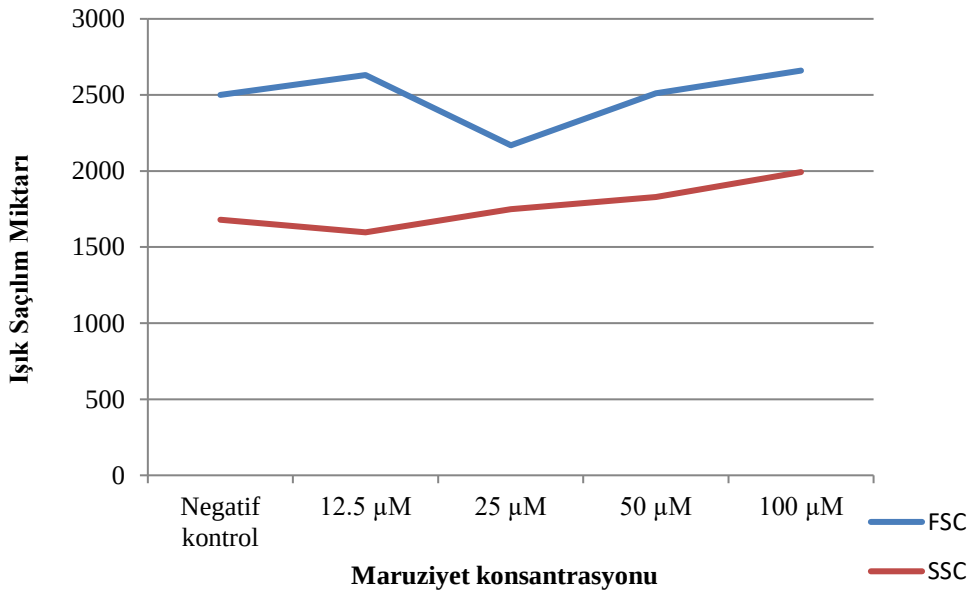
Maruziyet konsantrasyon (µM)	Apoptoz(%)± standart hata
Negatif kontrol	0,31 ±0,03
12,5	0,36 ±0,04
25	0,48 ±0,06
50	0,76 ±0,08
100	0,94 ±0,08

AM-2201'e maruz kalan H9c2 hücrelerinde en yüksek maruziyet konsantrasyonu olan 100 µM için gözlenen ölümlerde toplam hücreye oranla nekroz görülme yüzdesi maksimum % 9.43 olarak tespit edildi. H9c2 hücrelerinde negatif kontrole kıyasla AM-2201 ile 100 µM maruziyet konsatrasyonu için nekrozun 9,16 kat olduğu görüldü ($p \leq 0,05$). Anneksin V yöntemi ile elde edilen sonuçlara göre AM-2201'ün nektrotik etki potansiyeli Tablo 4-3'de verilmiştir.

Tablo 4-3:H9c2 hücreleri üzerinde AM-2201 maddesinin nekrotik etkileri.

Maruziyet konsantrasyonu(µM)	Nekroz (%)± standart hata
Negatif kontrol	1,03 ±0,08
12,5	3,94 ±0,07
25	8,27 ±1,12
50	7,22 ±1,05
100	8,05 ±1,11

AM-2201 maddesinin 12,5, 25, 50 ve 100 µM konsantrasyonuna maruziyet durumundaki FSC ve SSC dedektörleri yardımı ile H9c2 hücrelerindeki büyüklük ve granülaritedeki değişiklik Şekil 4-6'da gösterilmiştir.



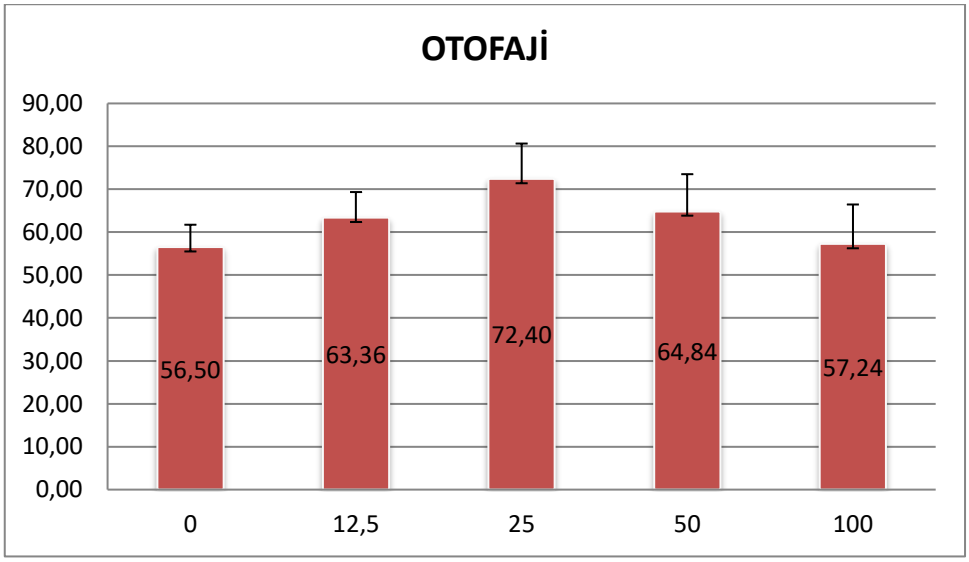
Şekil 4-6: AM-2201'nin apoptotik/nekrotik etki potansiyelinin değerlendirilmesinde FSC ve SSC analiz verileri.

Sitotoksisite test sonuçlarında da görüldüğü üzere WST-1 sonuçlarına göre LDH testinde AM-2201'in sitotoksik etkisine H9c2 hücreleri daha hassastır. Flow sitometrik tayin ile hücre büyüklüğü (FSC) ve granülariteleri (SSC) ifade eden Şekil 4-6'da

görüldüğü üzere; en yüksek maruziyet konsatrasyonu olan 100 µM için kontrole ve diğer maruziyet dozlarına oranla hücre popülasyonundaki granülaritenin 1,5 kat ve 2,2 kat arttığı tespit edildi. Bu sonuç nekrotik etki potansiyelini desteklemektedir. Nekrozun saptanması için önemli bir yöntem olan LDH testinde de anlamlı sonuç gözlendi (Şekil 4-2).

4.4. Otofajik Potansiyelin Değerlendirilmesi

Bölüm 3.4.3.5'de belirtildiği üzere AM-2201'ün H9c2 hücre dizisi üzerine otofajik etki potansiyeli 48 saat süre ile 12,5-100 µM konsantrasyon aralığı için akridin orange yöntemi kullanılarak değerlendirildi (Şekil 4-7). H9c2 hücrelerinde AM-2201'e maruziyet durumunda gözlenen ölümlerde toplam hücreye oranla otofaji görülme yüzdesi % 57,24-72,40 olarak tespit edildi. H9c2 hücrelerinde negatif kontrole kıyasla AM-2201 ile otofajinin maksimum 1,01-1,28 kat indüklendiği ancak bu indüksiyonun kontrole kıyasla istatistiksel anlamlılık taşımadığı tespit edildi ($p \geq 0,05$).



Şekil 4-7: AM-2201'in H9c2 hücreleri üzerine otofajik etkilerinin akridin orange yöntemi ile değerlendirilmesi.

5. TARTIŞMA

Sentetik kannabinoidlerin günümüzde hızla yaygınlaşması ve gün geçtikçe kullanımlarının artmasına karşın toksikolojik etkileri hakkındaki sınırlı bilgi nedeniyle son yıllarda bu moleküllerin toksisiteleri ile ilgili yapılan çalışmalar önem kazanmaktadır. Bu nedenle yürütülen tez çalışmasında yeni nesil sentetik kannabinoidlerden AM-2201 maruziyetinin kalp hücreleri üzerine toksik etkilerinin *in vitro* şartlarda tespiti H9c2 sıçan kardiyomiyoblast hücre dizisi üzerindeki sitotoksik, oksidatif ve apoptotik hasar oluşturma potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Tomiyama ve Funada (2011) tarafından nöroblastom-gliom hibrid hücre hattı (NG 108-15) üzerinde CP 55,940, CP 47,497 ve CP 47,497-C8 sentetik kannabinoidleri ile yapılan çalışmada; öncelikle 2 saatlik 10, 20 ve 30 µM konsantrasyonlardaki maruziyet durumunda sitotoksik etki tespit edilmiştir. En yüksek maruziyet konsantrasyonu olan 30 µM'de sitotoksisitenin indüklendiği gözlendi. CP 55,940, CP 47,497 ve CP 47,497 ile indüklendiklerinde doza bağımlı sitotoksisite tespit edilirken selektif CB1 reseptör antagonisti AM-251 uygulandığında önemli düzeyde reseptörlerin suprese olduğu, selektif CB2 reseptör antagonisti AM-630 ile ise tersine sitotoksisitede değişim olmadığı gözlendi. Çalışmada sentetik kannabinoidlerin NG 108-15 hücre hattında indükledikleri sitotoksisitede CB1 reseptörlerinin önemli rol oynadığı rapor edilmiştir.

Tomiyama ve Funada (2014) tarafından yapılan bir diğer çalışmada; AM-2201 dahil 8 farklı sentetik kannabinoid türünde (AM-2201, MAM 2201, JWH-018, JWH-210, CP 55,940, CP 47,497, CP 47,497-C8 ve HU-210) fare ön beyin nöronal hücrelerinin primer kültüründe sitotoksik potansiyel değerlendirilmiştir. Çalışmada sentetik kannabinoide maruz bırakılan hücrelerin kontrol hücrelerine (%0,05 DMSO) göre luminesans sinyal oranını değiştiren değer rölatif sitotoksisite olarak ifade edildiğinde; rölatif sitotoksisite kontrol grubu için 1,0 ±0,04, pozitif kontrol (%10 DMSO) için 3,4 ±0,7, AM-2201'in 10 µM konsantrasyonu için 2,4 ±0,3, 30 µM konsantrasyonu için ise 2,8 ±0,1 olduğu bildirilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarına (Tomiyama ve Funada, 2011) benzer şekilde AM-2201, MAM 2201, JWH-018, JWH-210, CP 55,940, CP 47,497, CP 47,497-C8 ve HU-210 sentetik kannabinoidlerin

sitotoksisitelerinin AM-251 ile preinkübasyon yapıldığında suprese olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da en yüksek maruziyet konsantrasyonu olan 30 μM'de sitotoksisitenin indüklendiği rapor edilmiştir. Ayrıca selektif CB2 reseptör agonistleri JWH-133 ve CB-65'in CP 55,940 ile benzer koşullarda sitotoksisiteyi indükleyip indüklemediğini incelemişler ve her iki selektif CB2 reseptör agonisti de sitotoksisiteyi indüklememiştir. Sonuçların ön beyin hücre kültüründe sitotoksisitenin indüksiyonunda CB 1 reseptörlerinin önemli rol oynadığını gösterdiğini vurgulamışlardır.

Couceiro ve ark. (2016) tarafından JWH-018 ve JWH-018'in faz 1 metaboliti N-(3-hidroksipentil) ile insan böbrek hücre hattı HEK293T ve insan nöroblastom SH-SY5Y hücre hatlarında yapılan çalışmada; JWH-018'in faz 1 metabolitinin her iki hücre hattında sitotoksisite gösterdiği bildirilmiş ve bunun hücre ölümünün CB1 reseptör varlığından bağımsız olarak hücrenin membran bütünlüğünün potansiyel bir toksisite mekanizması olduğu düşüncesini desteklediğini, CB1 reseptörünün varlığına bağlı olmaksızın hücrelerdeki etkisinin CB1 aracılı olmayan bir sitotoksisite mekanizmasına işaret ettiğini rapor etmişlerdir. MTT ve LDH sitotoksisite testlerinin kullanıldığı çalışmada; 24 saat süre ile 1, 2, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 μM konsantrasyonlarda maruziyet sonrası JWH-018'in belirtilen konsantrasyonlarda hücre canlılığını azaltmadığı, LDH serbestleşmesi gözlenmediği ve toksik olmadığı gözlenmiştir. JWH-018'in faz 1 metaboliti ile aynı süre ve konsantrasyonlarda her iki test sonucuna göre JWH-018'in tersine HEK293T hücre hattında 25 μM konsantrasyondan itibaren, SH-SY5Y hücre hattında ise 50 μM konsantrasyondan itibaren hücre canlılığında anlamlı düşme gözlenmiştir. LDH testinde düşük konsantrasyonlarda kontrole benzer LDH serbestleşmesi mevcutken 25-50 μM konsantrasyonlardan itibaren kontrole kıyasla LDH serbestleşmesinde artma gözlenmiş ve JWH-018'in aksine faz 1 metabolitinin sitotoksisite gösterdiği bildirilmiştir.

Koller ve Zlabinger (2013) tarafından yapılan bir çalışmada JWH-018, JWH-073, JWH-122, JWH-210 ve AM-694 bileşikleri ile bukkal (TR146), meme (MCF-7) ve insan hepatoma hücre hatlarında tüm bileşiklerin TR146 ve MCF-7 hücrelerinde 100 μM konsantrasyonda hücre membran hasarını indüklediği, LDH testinde etkilerin doz bağımsız ve sadece yüksek dozlarda (100 μM) gözlendiği bildirilmiştir.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre ise sıçan kardiyomiyoblast H9c2 hücre dizisi üzerine AM-2201 ile 48 saatlik maruziyet sonunda WST-1 ve LDH testleri ile elde edilen sonuçlara göre IC_{50} değerleri sırası ile 101,49 ve 63,33 µM olarak tespit edilmiştir.

Tomiyama ve Funada (2011) tarafından nöroblastom-gliom hibrid hücre hattı (NG 108-15) üzerinde CP 55,940, CP 47,497 ve CP 47,497-C8 sentetik kannabinoidleri ile yapılan çalışmada; CP 55,940'ın floresans mikroskopik incelenmesinde hücrelerde nükleer fragmantasyon ve kondensasyona neden olduğu gözlenmiştir. Takiben yapılan Annexin V-PI boyaması sonucu CP 55,940'a 2 saatlik maruziyet sonrası Annexin V pozitif hücrelerde önemli düzeyde artış gözlenmiş, CP 55,940'ın NG 108-15 hücre hattında apoptozu indüklediği bildirilmiştir. Bununla birlikte çalışmada hem Annexin V hem de PI pozitif boyanan hücreler bulunduğu, bunun da CP 55,940 tarafından indüklenen bazı morfolojik değişikliklerin nekrotik ya da geç apoptotoik hücreleri yansıttığı görüşü paylaşılmıştır. Çalışmada kaspas 3'ün irreversibl inhibitörü Z-DEVD-FMK ile inkübasyon neticesinde CP 55,940, CP CP 47,497 ve CP 47,497-C8 ile indüklenen sitotoksisitede önemli azalma (%40-60 azalma) tespit edilmiş, NG 108-15 hücrelerinin kaspas 3 inhibitörü ile pre-inkübasyonun sentetik kannabinoidlerin sitotoksisitesini önemli ölçüde azalttığı, kaspas kaskatlarının sentetik kannabinoidlerce indüklenen apoptoziste önemli rolü olabileceği bildirilmiştir.

Tomiyama ve Funada (2014) tarafından yapılan diğer çalışmada da benzer şekilde Annexin V pozitif boyanan hücrelerde önemli düzeyde artış, dolayısıyla da apoptozun indüklendiği gözlenmiştir. Çalışmada Annexin V pozitif boyanan hücre sayısı kontrol grubunda 9,5 ±2,3, AM-2201'e 2 saatlik maruziyet sonrası 26,3 ±3,4 olarak raporlanmıştır.

Couceiro ve ark. (2016) JWH-018 ve faz 1 metaboliti N-(3-hidroksipentil) ile insan böbrek HEK293T ve insan nöroblastom SH-SY5Y hücrelerinde yaptıkları çalışma neticesinde JWH-018 metabolitinin sebep olduğu hücre azalmasının Annexin-V FTIC/PI ile incelendiğinde nekroz aracılığıyla meydana geldiği bildirilmiştir.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre ise AM-2201'e maruz kalan H9c2 hücrelerinde en yüksek maruziyet konsantrasyonu olan 100 µM için gözlenen ölümlerde erken apoptoz görülmezken, toplam hücreye oranla geç apoptozis görülme yüzdesi

maksimum %1,17 olarak tespit edilmiştir. H9c2 hücrelerinde negatif kontrole kıyaslandığında AM-2201 ile 100 μM maruziyet konsatrasyonu için toplam apoptozisin 3 kat artmış olduğu görülmüş, ancak bu indüksiyonun kontrole kıyasla istatistiksel anlamlılık taşımadığı tespit edilmiştir. Ancak, Tomiyama ve Funada (2011; 2014) çalışmalarında da belirtildiği üzere AM-2201 nekrozu indüklemiştir.

Sentetik kannabinoidlerin otofajik etki potansiyeli ile ilgili herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu konuda yapılmış ilk çalışma olan tez çalışmasından elde edilen sonuçlara göre *in vitro* koşullarda sıçan kardiyomiyoblast (H9c2) hücrelerinde negatif kontrole kıyasla AM-2201 ile otofajinin maksimum 1,01-1,28 kat indüklendiği ancak bu indüksiyonun kontrole kıyasla istatistiksel anlamlılık göstermediği görülmüştür. Çalışmanın ileri düzey teknikler ile ve *in vivo* şartlarda irdelenmesi gerekmektedir.

Rajesh ve ark. (2010) tarafından yürütülen bir çalışmada CB1 reseptörlerinin endokannabinoid anandamid ve sentetik agonist HU-210 ile aktivasyonun insan primer koroner arter endotelyal hücreleri (HCAECs) üzerine hücre ölümü ve ilişkili sinyal transduksiyon yolaklarındaki etkileri değerlendirilmiş ve 3 saatlik maruziyeti takiben endokannabinoid anandamid ve HU-210'un ROS oluşumunu arttırdığı, CB1 reseptör antagonisti ya da antioksidan (N-asetil sistein) uygulaması ile düzeyin azaldığı bildirilmiştir. Almada ve ark. (2017) tarafından İnsan koryokarsinoma hücreleri (BeWo) ve plasentadan primer kültüre ettikleri sitotrofoblast hücreleri (hCTs) üzerinde sentetik kannabinoidlerden WIN-55,212'in plasental gelişim ve gebelik üzerine etkisi araştırılmıştır. BeWo hücrelerinin WIN-55,212'ye 24 saatlik maruziyeti sonrası canlılığa etkilerini değerlendirmek için MTT ve LDH testleri uygulanmış ve WIN-55,212'nin 2 μM düzeyinin hücre canlılığını %16 azalttığı gözlenmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığında azalmanın LDH salınımı ile birlikte olduğu bildirilmiştir. Hücrelerdeki morfolojik değişimleri Giemsa ve Höechst boyamaları ile analiz edildiğinde hücre dansitesinde azalma ve apoptotik morfolojik değişiklikler (kromatin kondensasyonu ve fragmantasyon gibi) görülmüştür. Pozitif kontrol olarak H_2O_2 kullanıldığında H_2DCFDA ile ROS tayini yapılmış ve WIN 55,212'in kontrole kıyasla ROS/RNS oluşumuna neden olmadığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde, AM-2201'in 12,5-100 μM maruziyet konsantrasyonlarında ROS seviyelerinde kontrole

kıyasla <%15,69 azalma tespit edilmekle birlikte, elde edilen verilerin istatistiksel düzeyde anlamlı olmadığı görüldü.

Kalbin toksikolojik etkenlere yanıtı; genel olarak kardiak aritmi, kardiak hipertrofi veya kalp krizi şeklinde kendini gösterir. Kalbe toksik etkenlerin bir bölümü; fetal gen program aktivasyonu, kardiak myositlerde artmış protein sentezi ve son olarak hipertrofik fenotipe neden olan G-protein-bağlı reseptörler, mitojen tarafından aktive edilen protein kinaz (mitogen-activated protein kinaz, MAPK), protein kinaz C ve AMP tarafından aktive edilen protein kinaz (AMP-activated protein kinaz, AMPK) gibi protein kinazlar, kalsiyum ve kalsinörin, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/glikojen sentez kinaz (GSK3β) ve transkripsiyon faktörleri gibi proteinleri etkiler. Her birinin aktivasyonu miyokardial hipertrofiyi indükleyebilen sinyal transduksiyon yolaklarını aktive ederken, bir bölümünün aritmi ya da disritmi olarak bilinen; kalbin otomatik ve son derece düzenli olan atım ritminin bozulmasına sebep olduğu, bu aritmojenik toksinlerin hücre membran hareketlerinin hafifçe indüklenmesi yoluyla kalpteki ileti yollarına etki ettiği ve bu nedenle ya çok az yapısal hasar oluşturup ya da hiç yapısal hasar oluşturmadan kalp ritmini bozarak, kalpte anormal ve etkisiz ve hatta ölümcül disfonksiyonlara neden olabildiği bilinmektedir (Boor 1999; Kang 2008 pp 699-739). AM-2201'in kalp hücreleri üzerine toksisitesinin değerlendirildiği çalışmada elde edilen veriler IC_{50} (<63,33 μM) değerlerinin altındaki maruziyet durumunda sadece nekrotik etkinin ön planda olduğu yönündedir. Bu bakımdan AM-2201'in kardiyotoksik etkisinin kardiomyoblast hücre düzeyindeki hücre ölümüne sebep etkilerden ziyade hipertrofik ve/veya aritmojenik etkilerden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle ileri dönemde yapılacak çalışmalarda hipertrofik sinyal yolakları ve kardiak ileti yollarına etkinin *in vivo* araştırılması, ayrıca sentetik kannabinoid içeriklerine pek çok farklı tür maddenin eklenerek genellikle karışım halinde bu maddelerin kullanılmasının da madde etkileşimleri aracılığıyla ortaya çıkabilecek etkiler ve metabolit etkileri açısından incelenmesi gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Acosta D.J.(Ed.). (2008). *Cardiovascular Toxicology, Fourth Edition*, New York, Taylor& Francis Group.

Akremi, N., Cappoen, D., Anthonissen, R., Bouraoui, A., Verschaeve, L. (2016). Evaluation of the Genotoxicity and Cytotoxicity of Semipurified Fractions from the Mediterranean Brown Algae, *Dictyopteris membranacea*. *Pharmacognosy Magasine*, 12, 395–399.

Aksel, G., Bozan, O., Kayacı, M., Guneysel, O., Sezgin, S.B., (2015). Rising Threat; Bonsai, *Turkish Journal of Emergency Medicine*, 15, 75–78.

Aktaş, M., Değirmenci, U., Ercan, S.K., Tamer, L., Atik, U. (2005). Redükte glutatyon ölçümünde HPLC ve spektrofotometrik yöntemlerin karşılaştırılması. *Türkiye Klinikleri Biyokimya Dergisi*, 3, 95-99.

Almada, M., Costa, L., Fonseca, B.M., Amaral, C., Teixeirab, N.,Correia-da-Silva, G.(2017). The synthetic cannabinoid WIN-55,212 induced-apoptosis in cytotrophoblasts cells by a mechanism dependent on CB1 receptor. *Toxicology*, 385, 67–73.

Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C., Pijnenborg, R. (2007). The use of alamar blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cell. *Human Reproduction*, 22, 1304-1309.

Altınışık, U. Altınışık, H.B.,Şimşek, T.,Doğu, T.,Şimşek, E., Aydın H.(2015). Yoğun Bakım Ünitesinde Takip Edilen Sentetik Kannabinoid (Bonzai) Zehirlenmesi Olgularının Klinik Özellikleri. *Journal of Turkish Socity Intensive Care*,13, 117-21.

Ayağ, H. (2010). Kronik Böbrek hastalarında prooksidan ve antioksidan parametrelerin ateroskleroz belirteçleri ve ekokardiografik bulgularla ilişkisinin değerlendirilmesi, Uzmanlık tezi, Diyarbakır, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı.

Bandyopadhyay, U., Das, D., Banerjee, R.K. (1999). Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current Science*, 77, 658-664.

Birben, E., Şahiner, Ü.M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalaycı, Ö. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5, 9-19.

Boor, J.,P. (1999). Cardiovasculer System. İçinde Marquadt H., Schofer S.G, Mccellan R.O.,Welch F. (Ed.),Toxicology. Cambridge: Academic Press; 587-599.

Castaneto, M. S., Gorelick, D.A., Desrosiers, N.A., Hartman, R.L., Pirard, S., Huestis, M.A. (2014). Synthetic Cannabinoids: Epidemiology, Pharmacodynamics and Clinical Implications. *Drug Alcohol Dependence*, 12–41

Castellanos, D., Gralnik, L.M. (2016). Synthetic cannabinoids 2015: an update for pediatricians in clinical practice. *World Journal of Clinical Pediatrics*, 5, 16-24.

CDC (2017, August). *Synthetic cannabinoids: What are they? What are their effects? About synthetic cannabinoids, Synthetic Cannabinoids: An Overview for Healthcare Providers.* Erişim 30.01.2018. https://www.cdc.gov/nceh/hsb/chemicals/sc/default.html

Chan, F.K., Moriwaki, K., Rosa, M.J.D. (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods in Moleculer Biology*, 979, 65-70

Chung, D.M., Kim, J.H., Kim, J.K. (2015). Evaluation of MTT and Trypan Blue assays for radiation induced cell viability test in Hep G2 cells. *International Journal of Radiation Research*, 13, 331-335.

Cooper Z.D. (2016). Adverse Effects of Synthetic Cannabinoids: Management of Acute Toxicity and Withdrawal. *Current Psychiatry Report*, 18, 52.

Couceiro, J., Bandarra, S., Sultan, H., Bell S., Constantino, S., Quintas, A.(2016). Toxicological impact of JWH-018 and its phase I metabolite N-(3-hydroxypentyl) on human cell lines. *Forensic Science International*, 264, 100–105.

Coşkun, G., Özgür H. (2011) Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Dergipark Arşiv*, 20, 145.

Çakatay, U., Kayalı, R. (2006). Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 37, 162-167.

Darzynkiewicz, Z., Galkowski, D., Zhao, H. (2008). Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods*, 44, 250–254.

Davis, C., Boddington, D.(2015). Teenage Cardiac Arrest Following Abuse of Synthetic Cannabis. *Heart, Lung and Circulation*, 24, 162-163.

Debruyne, D., Boisselier, R.L. (2015). Emerging drugs of abuse: current perspectives on synthetic cannabinoids. *Substance Abuse and Rehabilitation*, 6, 113-129.

Delibaş, N., Özcankaya, N. (1995). Serbest Radikaller. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 2, 11-17.

Dolengevich-Segal, H., Rodríguez-Salgado, B., Gómez-Arnau, J., Daniel Sánchez-Mateos, D. (2017). An approach to the new psychoactive drugs phenomenon. *Salud Mental*, 40, 71-82.

Eken, A. (2011). Rat, Kan ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 69-73

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35, 495–516.

EMCDDA. (2015, Ocak). *Synthetic cannabinoids and 'Spice' drug profile. Erişim 31.1.2018* http://www.emcdda.europa.eu/publications/drug-profiles/synthetic-cannabinoids#pharmacology

Erenel, G., Erbaş, D., Arıcıoğlu, A. (1992). Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi Tıp Dergisi*, 3, 243-250.

Eruslanov, E., Kusmartsev. S. (2010). Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*, 57-72.

Fink, S.L., Cookson, B.T. (2005). Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, 70, 1907–1916.

Fotakis, G., Timbrell, J.A. (2006) In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160, 171–177.

Freshney, R.I. (1994). *Culture of animal cells*, a manual of basic technique, 4th edition, Canada, Wiley-Liss.

Gurney S.M.R, Scott K. S, Kacinko S.L, Presley B.C, Logan B.K. (2014). Pharmacology, Toxicology, and Adverse Effects of Synthetic Cannabinoid Drugs, *Forensic Science Review*, 26.

Güleş, Ö., Eren Ü. (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi,* 2: 73-78

Hess, C., Schoeder, C.T., Pillaiyar, T., Madea, B., Müller, C. E. (2016). Pharmacological evaluation of synthetic cannabinoids identified as constituents of spice. *Forensic Toxicology*, 34, 329–343.

Ho, E., Galougahi, K.K., Liu, C.C., Bhindi, R., Figtree, G.A. (2013). Biological markers of oxidative stress: applications of cardiovascular research and practice. *Redox Biology*, 483-491

Introduction to Psychology. 5.2 Altering Consciousness With Psychoactive Drugs. 2010. University of Minnesota Libraries Publishing, eLearning Support Initiative. Erişim: 05/02/2018 http://open.lib.umn.edu/intropsyc/chapter/5-2-altering-consciousness-with-psychoactive-drugs/

Kanev, M.O., Muranlı, F.D.G. (2016). Flow sitometri ve kullanım alanları. *SAÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 20, 33-38.

Kang, Y.J., (2008). Toxic responses of the heart and vasculer system, İçinde Klaassen. C.D., *Casarett&Doull's Toxicology, The basis Sceince of Poisons, Seventh edition*. ABD. McGraw-Hill, 699-739.

Karaaziz, M., Keskindağ, B. (2016). Gençler Arasındaki Popüler Psikoaktif Madde; Sentetik Kannabinoid (bonzai): Bir Gözden Geçirme. *Klinik Psikiyatri*, 1, 137-144.

Karaboz, İ., Kayar, E., Akar, S. (2008). Flow Sitometri ve Kullanım Alanları *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 6, 1-18.

Karabulut, H., Gülay, M.Ş. (2016). Serbest Radikaller. *MAKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi,* 4, 50-59.

Karadağ, A. (2016). Otofaji: Programlı hücre ölümü. *Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi*, 15, 19-26.

Kavas(Özelçi), G. (1989). Serbest Radikaller ve Organizma Üzerine Etkileri. *Türkiye Klinikleri*, 9, 1-8.

Kim, J. H., Kwon, S., Kong, T. Y., Cheong J. C., Kim, H. S., Kyo In, M., Lee, H.S. 2017. AM-2201 Inhibits Multiple Cytochrome P450 and Uridine 50-Diphospho-Glucuronosyltransferase Enzyme Activities in Human Liver Microsomes. *Molecules*, 22, 443.

Koller, V. J., Ferk, F., Al-Serori, H., Mišík, M., Nersesyan, A., Auwärter, V., Grummt, T., Knasmüller, S.(2015). Genotoxic properties of representatives of alkylindazoles and aminoalkyl-indoles which are consumed as synthetic cannabinoids. *Food and Chemical Toxicology*, 80, 130–136.

Koller, V.J., Zlabinger, G.J.(2013). Toxicological profiles of selected synthetic cannabinoids showing high binding affinities to the cannabinoid receptor subtype CB1. *Archives Toxicology*, 87, 1287–1297.

Konukoğlu, D., Akçay, D. (1995). Glutatyon metabolizması ve klinik önemi, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*, 15, 214-218.

Krishnamurthy, P., Wadhwani, A. (2012). Antioxidant Enzyme Chapter 1: Antioxidant Enzymes and Human Health; edited by El-Missiry M.A, Rijeka, Croatia, 3-18.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G.(2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differentiation*, 16, 3–11.

Kusano, C., Ferrari, B. (2008).Total Antioxidant Capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Journal of cell and Molecular Biology*, 7(1),1-15.

Lafaye, G., Karila, L., Blecha, L., Benyamina, A., (2017). Cannabis, cannabinoids, and health. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 19, 309-316.

Louis, K.S., Siegel, A.C. Cell Viability analysis using trypan blue: manual and automated methods, chapter 7, Mammalian Cell Viability: Methods and protocols, *Method in Molecular Biology*, 740.

Mate´s, J.M., Perez- Gomez, C., De Castro, I.N. (1999). Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry*, 8, 595–603.

Morry, J., Ngamcheratrakul, W., Yantasee, W. (2016). Oxidative Stress in cancer and fibrozis: opportunity for therapeutic intervention with antioxidant compounds, enzymes and nanoparticles. *Redox Biology*, 11, 240-253.

Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of lmmunological Methods*, 65, 55-63.

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, Application of Modern Toxicology Approaches for predicting acute toxicity of chemical defense, Chapter 4: Assays for predicting acute toxicity, 2015, The National Academies Press, Washington DC, 51-79.

Nema, R., Khare, S. (2012). An animal cell culture: Advance technology for modern research. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, 219-226.

Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 3448–3459.

Orsini, J., Blaak, C., Tam, E., Rajayer, S., Morante, J., Yeh, A., Orsin A.B. (2015). The Wide and Unpredictable Scope of Synthetic Cannabinoids Toxicity. *Case Reports in Critical Care*, 1-5.

Öztürk, Y.E., Yeter, O., Öztürk, S., Karakus, G., Ates, I., Buyuk, Y., Yurdun, T. (2018). Detection of metabolites of the new synthetic cannabinoid CUMYL-4CN-BINACA in authentic urine samples and human liver microsomes using high-resolution mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, 10:449-459.

Rahman, N., Dhadi, S.R., Desponde, A., Ramakrishna, W. (2016). Rice Callus suspension culture inhibits growth of cell lines of multipl cancer type sand induces apoptozis in lung cancer cell line. *BMC Complementary Alternative Medicine*, 16, 427.

Rampersad, S.N. (2012). Multiple Applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function anda cellular health in cell viability bioassays. *Sensors*, 12, 12347-12360.

Rajesh, M., Mukhopadhyay, P., Haskó, G., Liaudet, L., Mackie K., Pacher, P.(2010). Cannabinoid-1 receptor activation induces reactive oxygen species-dependent and –independent mitogen-activated protein kinase activation and cell death in human coronary artery endothelial cells. *British Journal of Pharmacology*, 160, 688–700.

Ray, P.D., Hwang, B.W., Tsuji, W. (2012). Reactive oxygen species homeostazis and redox regulation. *Cellular Signaling*, 24, 981-990.

Repetto, G., Peso, A., Zurita, J.L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 7, 1125-1131.

Resmi Gazete (2016). http://www.resmigazete.gov.tr/main.aspx?home= http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2015/02/20150206.htm&main=http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2015/02/201050206.htm. Erişim 23 Ekim 2016.

Riss T.L, Moravec R.A, Niles A.L, Duelman S, Benink H.A, Worzella T.J., Minor M, (2016). *Cell Viability Assays- Assay Guidance Manual*, NCBI Bookshelf, Erişim 15/12/2016, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065

Ryan J.A. (2008) *Introduction to animal cell culture*. Teknik Bülten. Corning Incorporated Life Sciences. Erişim 12/12/2016, http://intro_animal_cell_culture.pdf

Robbins, S.L., Cotran, R.S, Kumar, V.(2003). *Robbins Temel Patoloji, 7. Edisyon*, Philadelphia, W.B.S.C.

Rubio, C.P., Hernández-Ruiz, J., Martinez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Ceron, J.J.(2016). Spectrophotometric assays for total antioxidant capacity (TAC) in dog serum: an update. *BMC Veterinary Research*, 12:166.

Sezer, K., Keskin, M. (2014). Serbest oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezindeki rolü. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi*, 28, 49-56.

Sezgin, N., Sezgin, A.T., Karabulut, A., Topal, E., Barutçu, İ., Gözükara, E.M. (2004). Myokardial Disfonksiyonu olan hastalarda disfonksiyonun derecesi ile antioksidan enzim düzeylerinin karşılaştırılması. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*, 4, 130-134.

Singh, R., Parihar, P., Singh, S., Mishra, R.K., Singh, V.P., Prasad, S.M. (2016). Reactive oxygen species signaling and stomatal movement: current updates and future perspectives. *Redox Biology*, 213-218.

Singh, T.P., Nigam, A.K., Gupta, A.K., Singh, B., (2011). Cardiac Biomarkers: When to Test? – Physician Perspective. *Journal Indian Academy of Clinical Medicine*. 12, 117-21.

Somerville, R. (2012). Synthetic Cannabinoids. *Chemistry in New Zealand*, 21-23

Strober, W. (2001) Trypan blue exclusion test of viability, *Current Protocol Immunology*, appendix 3B.

Taneli, F. (2007). 'Flow' Sitometri Tekniği ve Klinik Laboratuvarlarda Kullanımı. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 5, 75-82.

Thomé, M.P., Filippi-Chiela, E.C., Villodre, E.S., Migliavaca, C.B., Onzi, G.R., Felipe, K.B., Lenz, G.(2016). Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. *Journal of Cell Science*, 129, 4622-4632.

Tomatır, A.G. (2003). Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*, 23, 499-508.

Tomiyama, K., Funada, M.(2011). Cytotoxicity of synthetic cannabinoids found in "Spice" products: The role of cannabinoid receptors and the caspase cascade in the NG 108-15 cell line. *Toxicology Letters*, 207, 12–17.

Tomiyama, K., Funada, M.(2014). Cytotoxicity of synthetic cannabinoids on primary neuronal cells of the forebrain: the involvement of cannabinoid CB1 receptors and apoptotic cell death. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 274,17–23.

Türkiye Uyuşturucu Raporu (2016 verileri). (2017). Ankara. T.C. İç İşleri Bakanlığı Emniyet Genel Müdürlüğü Narkotik Suçlarla Mücadale Daire Başkanlığı.

Erişim 30.1.2018. http://www.narkotik.pol.tr/TUBIM/Documents/TURKIYE%20UYUSTURUCU%20RAPORU%202017.pdf

Valko, M. et al., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84.

Vian, L., Vincent, J., Maurin, J., Fabre, I., Giroux, J., Cano, J.P. (1995). Comparison of three in vitro cytotoxicity assays for estimating surfactant ocular irritation. *Toxicology in vitro*, 9, 185-190.

Vichai, V., Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 3, 1112- 1116.

Voigt W, 2005, Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity, Methods in Molecular Medicine, vol. 110: Chemosensitivity: Vol. 1: In Vitro Assays, 39-48, Edited by: R. D. Blumenthal Humana Press Inc., Totowa, NJ

Wang, S., Yu, H., Wickliffe. J.K. (2011). Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO2. *Toxicology in Vitro*, 25, 2147–2151.

Weaver, M. F., Hopper, J.A., Gunderson, E. W. (2015). Designer drugs 2015: assessment and management, *Addiction Science & Clinical Practice*, 10, 8.

Weinstein, A.M., Rosca, P., Fattore, L., London, E.D. (2017). Synthetic Cathinone and Cannabinoid Designer Drugs Pose a Major Risk for Public Health.

WHO. 2014. AM-2201Critical Review Report Agenda item 4.7 Expert Committee on Drug Dependence, Thirty-sixth Meeting. Geneva. Erişim: 04/02/2018. http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/36thecddmeet/en/index2.html

Young, S.I., Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease, *Journal of Clinical Pathology*, 54, 176–186,

Zou, Y., Kım, D., Yagı, M., Yamasakı, Y., Kurita, J., Lida, T., Matsuyama, Y., Yamaguchi, K., Oda, T. (2013). Application of LDH- release assay to cellular level evaluatin of the toxic potential of harmful algal species. *Biosciences, Biotechnology, Biochemistry*, 77, 345-352.

Zhang, P. Y., Xu, X., Li, X.C. (2014) Cardiovascular Diseases: Oxidative Damage and Antioxidant Protection. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18, 3091-3096.

İNTİHAL RAPOR FORMU

YENİ NESİL SENTETİK KANNABİNOİDLERDEN AM 2201 İN KARDİYOTOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%5	%4	%3	%2
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	ejfm.trakya.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
3	www.science.gov İnternet Kaynağı	<%1
4	Parlakpinar, Hakan, Osman Celbis, Onural Ozhan, Semih Petekkaya, Emine Samdanci, Necip Ermis, Pelin Koparir, Ozcan Soylu, and Ahmet Acet. "Cardiovascular effects of JWH-018 from synthetic cannabinoids [Sentetik kannabinoidlerden JWH-018'in kardiyovaskuler etkileri]", Medicine Science | International Medical Journal, 2016. Yayın	<%1
5	SEZER, Kenan and KESKİN, Mahmut. "Serbest oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezisindeki rolü", Fırat Üniversitesi	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Esra	Soyadı	Nişikli
Doğ.Yeri	Adana	Doğ.Tar.	31/03/1984
Uyruğu	TC	TC Kim No	10207804608
Email	esranis@gmail.com	Tel	05416586017

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi	2008
Lise	Adana Ticaret Odası Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Uzman Doktor	Adli Tıp Kurumu Başkanlığı	2017-
2. Uzman Doktor	Nevşehir Adli Tıp Şube Müdürlüğü	2014-2017
3. Asistan Doktor	Adli Tıp Kurumu Başkanlığı	2010-2014
4. Asistan Doktor	KSÜ Tıp Fakültesi Hastanesi	2009-2010
5. Pratisyen Hekim	Dönüklü Sağlık Ocağı	2008-2009

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	orta	iyi	-	-

*****Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak.

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	75,25204	74,10186	62,94668

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office	iyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

Yayınlar:

- Çelik N, Yapar B, Nişikli E, Bir olgu ile neonatisid, 9.Adli Bilimler Kongresi, İzmir, 2010 (poster)
- Yapar B, Çelik N, Nişikli E, Orellanus sendromu: Bir otopsi olgusu, 15. Ulusal Adli Tıp Günleri, 2010 (poster)

- Cavlak M, Nisikli E, Avsar A, Akcan R. Drowning in water bucket: a report of two infants.J For Med 2014;28(3):317-22 (makale)
- Çelik S, Seyhan B, Nişikli E, Seyhan Ö. Vakaların Aydınlatılmasında Olay Yeri İncelemesinin rolü: Bir olgu Sunumu, 10. Anadolu Adli Bilimler Kongresi, Malatya, 2013, (poster)
- Tavaslı A, Nişikli E, Üzün İ, Sezer Y, Accidental fatal digoxin intox in infants, 1st regional TIAFT meeting, İzmir, 2014 (poster)
- Çocukluk Çağı Zehirlenmelerinin Adli Tıp açısından değerlendirilmesi, Adli Tıp Kurumu, 2014, Adli Tıp Uzmanlık tezi

Bilimsel toplantılarda sunulan bildiriler :

Drowning in bucket of water, The Balkan Academy of Forensic Medicine, İstanbul, 2013 (sözel bildiri- ingilizce)

Seminer ve Kurslar:

- Semmelweis University, Budapest, Histopatology Research Exchange Project, July 2006, Değişim öğrencisi.
- Nükleer Biyolojik Kimyasal Savaş (NBC) Eğitimi, Celal Bayar Üniversitesi Mezuniyet Sonrası Eğitim Toplantısı, Manisa, 2007.
- 9.Adli Bilimler Kongresi, İzmir, 2010.
- İstanbul Protokolü, Çalıştay, 9.Adli Bilimler Kongresi, İzmir, 2010.
- 15. Ulusal Adli Tıp Günleri, Antalya, 2010.
- Deney Hayvanları ile Çalışma Uygulamaları, Atölye Çalışması , 15. Ulusal Adli Tıp Günleri, Antalya, 2010.
- Trafikte Alkol ve Uyuşturucu ile Etkin Mücadele Sempozyumu, Manisa, 2012.
- EU Twinng Project, Morgue Departmants meeting, İstanbul, 2012.
- IALM (International Academy of Legal Medicine), 22nd Congress, İstanbul, 2012.
- The Balkan Academy of Forensic Medicine, İstanbul, 2013.
- Adli Tıp Asistan Kongresi, İstanbul, 2013.
- ‘Temel Adli Osteoloji ve Kimliklendirme’ Çalıştayı, Adli Tıp Asistan Kongresi, İstanbul, 2013.
- Bilirkişilik Temel Eğitimi, Adli Tıp Kurumu, İstanbul, 2018.
- 15. Adli Bilimler Kongresi, Antalya, 2018.
- Ateşli Silah Yaralanmalarında Atipik Durumlar, Çalıştay, 15. Adli Bilimler Kongresi, Antalya, 2018.

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Okuma ve yaratıcı yazma, yüzme.