

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Zeynep TÜRKMEN

YAPAY BEYİN OMURİLİK SIVISINDA Δ^9 -THC'NİN SIVI
KROMATOĞRAFİSİ-ARDIŞIK KÜTLE SPEKTROMETRESİ (LC-MS/MS)
YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYAGER NESLİHAN ZENGİN

İSTANBUL, 2020

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
ADLİ TIP VE ADLİ BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Zeynep TÜRKMEN

YAPAY BEYİN OMURİLİK SIVISINDA Δ^9 -THC'NİN SIVI
KROMATOĞRAFİSİ-ARDIŞIK KÜTLE SPEKTROMETRESİ (LC-MS/MS)
YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYAGER NESLİHAN ZENGİN

İSTANBUL, 2020



Bu tez projesi İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 32542

TEŞEKKÜR

Tez Çalışması boyunca yol gösteren değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Zeynep TÜRKMEN'e,

Destekleri için değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Selda MERCAN'a,

Her zaman sabır ve anlayış gösteren, hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Arş.Gör. Merve KULOĞLU'na, Kimyager Tuğba TEKİN'e,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bu yolda birlikte yürüdüğüm değerli arkadaşlarım Merve OKA'ya, Duygu Nur MERT'e, Emine ŞENTÜRK'e,

Dünyamın merkezi sevgili anneme ve babama,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Neslihan Zengin

Temmuz 2020

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLolar LİSTESİ.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vi
KISALTMALAR	vii
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Toksikolojinin tanımı ve tarihçesi.....	7
2.1.1. Klinik toksikoloji.....	7
2.1.2. Analitik Toksikoloji.....	9
2.1.3. Adli Toksikoloji.....	10
2.1.3.1. Postmortem Toksikoloji.....	11
2.1.3.1.1. Postmortem örneklerde sıklıkla kullanılan biyolojik örnekler.....	12
2.1.3.1.2. Postmortem örneklerde kullanılan alternatif matrisler.....	12
2.2. Beyin Omurilik Sıvısı (BOS).....	13
2.2.1. BOS örneğinin yapısı ve fizyolojik özellikleri.....	15
2.2.2. BOS örneğinin klinik önemi.....	17
2.2.3. BOS örneğinin madde geçiş mekanizması.....	18

2.2.4. BOS örneğinin klinik araştırmaları ve analizlerinin tarihçesi.....	20
2.2.5. BOS örnek alma yöntemleri.....	21
2.2.6. BOS biyolojik örneğinin Adli toksikolojide önemi.....	21
2.3. Psikoaktif Maddeler	23
2.3.1. Δ^9 -THC.....	23
2.3.1.1. Δ^9 -THC Genel Özellikleri	24
2.3.1.2. Δ^9 -THC Absorbsiyonu, Dağılımı ve Eliminasyonu....	27
2.3.1.3. Δ^9 -THC Metabolizması	30
2.3.1.4. Δ^9 -THC Toksisitesi.....	32
2.3.1.5. Kronik Δ^9 -THC Zehirlenmesi.....	34
2.4. Kromatografi.....	35
2.4.1. Sıvı kromatografisi (Liquid Chromatography–LC).....	35
2.4.1.1. Ardışık (Tandem) Kütle Spektrometresi - (MS) ⁿ	37
2.4.2. Adli toksikolojide LC-MS/MS uygulama alanları.....	40
2.4.3. BOS analizlerinde LC/MS-MS kullanımı ve önemi.....	43
2.5. Analitik Yöntemlerin Geçerliliği (Validasyonu).....	45
2.5.1. yBOS örneği ile gerçekleşen validasyon çalışmaları.....	49
2.5.2. Validasyon hazırlık çalışmaları.....	51
2.5.2.1. Kullanılacak materyaller.....	51
2.5.2.2. Konsantrasyon seviyelerinin belirlenmesi.....	52
2.5.2.3. Parametrelerin uygulanması.....	53
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	56
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar.....	56
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Gereçler.....	56

3.3	Çalışma Planı.....	57
3.4.	Yapay BOS örneği hazırlanması.....	58
3.5.	Δ^9 -THC Analizi.....	59
3.5.1.	Δ^9 -THC Analizinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması.....	59
3.5.1.1.	Δ^9 -THC standart çözeltilerinin hazırlanması.....	59
3.5.1.2.	İç Standart (IS) çözeltisinin hazırlanması.....	60
3.5.1.3.	NaOH çözeltisinin hazırlanması.....	60
3.5.2.	Δ^9 -THC tayini için yapay BOS örneklerinin analize hazırlanması.....	60
3.5.2.1.	Spike yapay BOS örneklerinin hazırlanması.....	60
3.5.2.2.	Katı faz ekstraksiyon yöntemi.....	62
3.5.3.	LC-MS/MS ile Δ^9 -THC analizi.....	63
3.6.	yBOS örneğinde Δ^9 -THC Analizinin Validasyonu.....	64
3.6.1	Seçicilik çalışmaları	64
3.6.2.	LOD ve LOQ hesaplamaları	65
3.6.3.	Doğrusallık Çalışmaları.....	65
3.6.4.	Kesinlik çalışmaları.....	66
3.6.5.	Geri kazanım ve tekrar edilebilirlik çalışmaları.....	67
3.6.6.	Stabilite çalışmaları	68
4.	BULGULAR.....	69
5.	TARTIŞMA.....	79
6.	SONUÇ.....	91
7.	KAYNAKLAR.....	92
8.	ÖZGEÇMİŞ.....	101

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo I. BOS iyon bileşimi	15
Tablo II. BOS molekül içeriği	15
Tablo III. BOS hücre bileşimi	16
Tablo IV. Çalışmada kullanılan referans standart maddelerin ve kimyasal maddelerin isimleri ve markaları	56
Tablo V. Çalışmada kullanılan cihaz ve gereçlerin isimleri ve markaları	57
Tablo VI. yBOS hazırlamada kullanılan maddelerin miktarları	59
Tablo VII. Kalibrasyon çözeltilerini hazırlamada kullanılan maddelerin miktarları	66
Tablo VIII. Maddelerin alıkonma zamanları (dk) ve kütle spektrumundaki (MS) başlıca iyonları (m/z) (5 ng/mL)	69
Tablo IX. 0.5-50 ng/mL aralığında çizilmiş olan kalibrasyon eğrisinin denklemi ve korelasyon katsayısı	75
Tablo X. 10 adet boş yBOS örneğinin bulunan miktarı ($\mu\text{g/mL}$), standart sapma ve %RSD değerleri	76
Tablo XI. Gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik sonuçlarının karşılaştırılması	76
Tablo XII. 0,5 ng/mL Δ^9 -THC içeren yBOS numunesinin sonra spike geri kazanım tablosu	77
Tablo XIII. 5 ng/mL Δ^9 -THC içeren yBOS numunesinin sonra spike geri kazanım tablosu	77
Tablo XIV. 50 ng/mL Δ^9 -THC içeren yBOS numunesinin sonra spike geri kazanım tablosu	77
Tablo XV. 1.0 ng/mL konsantrasyonla spike edilen yBOS örneğinin önce spike ve sonra spike verilerinin kıyaslanması	78
Tablo XVI. 5 ng/mL Δ^9 -THC içeren yBOS numunesinin stabilite tablosu	78

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Beyinde BOS dolaşımı	14
Şekil 2: THC'nin KBB'den geçişi	19
Şekil 3: KBB ve Kan-BOS bariyeri	19
Şekil 4: Cisterna magna ponksiyonu ve lomber ponksiyon	21
Şekil 5: Δ^9 -Tetrahidrokannabinol	23
Şekil 6: Kenevir bitkisinin yaprakları, kurutulmuş bitki ve sigara halinde esrar	24
Şekil 7: Bitkide THC ve türevlerinin sentez gösterimi	26
Şekil 8: Haşış, haşış yağı ve infüzyontereyağ	27
Şekil 9: Δ^9 -THC'nin metabolizasyonu	31
Şekil 10: Bir kütle spektrometrenin diyagram görünümü	38
Şekil 11: Kuadrupol analizör	39
Şekil 12: Ardışık Kütle Spektrometresi	39
Şekil 13: Ekstraksiyon sırasında kullanılan şırınga ucu filtreler	62
Şekil 14: Ekstraksiyon düzeneği	63
Şekil 15: Δ^9 -THC analizinin yapıldığı LC-MS/MS cihazı	64
Şekil 16: 0,5 ng/mL Δ^9 -THC çözeltisine ait LC kromatogramı	70
Şekil 17: 1 ng/mL Δ^9 -THC çözeltisine ait LC kromatogramı	70
Şekil 18: 25 ng/mL Δ^9 -THC çözeltisine ait LC kromatogramı	71
Şekil 19: 5 ng/mL THC-COOH-D3 (IS) çözeltisine ait LC kromatogramı	71
Şekil 20: 25 ng/mL THC-COOH-D3 (IS) çözeltisine ait LC kromatogramı	72
Şekil 21: Sadece MeOH çözeltisine ait LC kromatogramı	73
Şekil 22: Sadece Mobil faz çözeltisine ait LC kromatogramı	73
Şekil 23: 1 ppb spike edilen Δ^9 -THC çözeltisine ait LC kromatogramı(sonra spike)	74
Şekil 24: 1 ppb spike edilen Δ^9 -THC çözeltisine ait LC kromatogramı(önce spike)	74
Şekil 25: 0.5-50 ng/mL aralığında Δ^9 -THC için elde edilmiş kalibrasyon eğrisi	75

KISALTMALAR

- BOS:** Beyin omurilik sıvısı
CaCl₂•2H₂O: Kalsiyum klorür dihidrat
CB1: Kannabinoid reseptör 1
CB2: Kannabinoid reseptör 2
CE: Parçalanma enerjisi
dk: Dakika
IS: İç Standart
KBB: Kan-beyin bariyeri
KCI: Potasyum klorür
kPa: Kilo paskal
L: Litre
LC: Sıvı Kromatografisi
LC-MS/MS: Sıvı Kromatografi-Ardışık Kütle Spektrometresi
LOD: Tespit Limiti
LOQ: Tayin Limiti
m/z: Kütle/yük
mg: Miligram
MgCl₂•6H₂O: Magnezyum klorür heksahidrat
mL: Mililitre
MRM: Çoklu reaksiyon izleme
MS: Kütle Spektrometresi
MSS: Merkezi sinir sistemi
n: Ölçüm Sayısı
NaCl: Sodyum klorür
ng: Nanogram
NaH₂PO₄•2H₂O: Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
Na₂HPO₄•7H₂O: Disodyum hidrojen fosfat heptahidrat
r²: Korelasyon katsayısı
rpm: Dakikadaki dönme sayısı
RSD: Bağlı standart sapma
SD: Standart Sapma
SPE: Katı Faz Ekstraksiyonu
THC: Δ⁹-Tetrahidrokannabinol
THCCOOH-D3: 11-nor-9-karboksi-Δ⁹-THC-D3
%: Yüzde
°C: Santigrat Derece
µg: Mikrogram
µL: Mikrolitre
11-OH-THC: 11-Hidroksi-Δ⁹- Tetrahidrokannabinol

ÖZET

Esrar, dünyadaki en eski ve en çok istismar edilen ilaçlardan biridir ve kullanımını patolojik ve davranışsal toksisite ile ilişkilidir. Bu nedenle, kannabinoid toksikokinetiğini ve kannabinoidlerin biyolojik sıvılara ve dokulara dağılımını anlamak önemlidir. Kannabinoid toksikokinetiğini etkileyen pek çok etken vardır, bunların başlıcaları; kullanım türü ve yöntemi, karaciğer ve ekstra hepatik dokulardan metabolizasyonu ve dışkı, idrar, ter, oral sıvı ve saçta eliminasyonu olarak sayılabilir.

Klinik çalışmalarda LC-MS/MS ile beyin omurilik sıvısında (BOS) biyoterapötik ajanların kantitatif analizi yaygın bir durumdur. Diğer taraftan, postmortem toksikolojide önemli bir biyolojik örnek olan BOS, alternatif bir matris olarak ölüm nedeninin belirlenmesinde diğer biyolojik sıvılardaki ölçümleri tamamlayıcı rol üstlenmektedir. Böylece yüksek hassasiyete sahip GC-MS ve LC-MS yöntemleri ile analizi sayesinde adalet hizmete sağlanmaktadır.

Standart bir yapay BOS (yBOS), kör (blank) örnek olarak birkaç hayvandan fedakarlık etmeden ve gerçek BOS sıvısı kullanmadan söz konusu matriste belli başlı bileşiklerin tayini için hassas LC-MS yöntemleri geliştirmede bir vekil matris olarak gereklidir.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, kötüye kullanımı en yaygın yasa dışı maddelerden biri olan esrarın ana etken maddesi Δ^9 -THC için, modifikasyon yapılarak hazırlanan yapay BOS örneğinde SPE yöntemi kullanılarak ekstraksiyonu ve LC-MS/MS analizini konu alan bir validasyon çalışması gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya ait doğrusallık sonuçları Tablo IX'de verildiği gibidir. 7 noktalı kalibrasyon çözümleri sonuçlarına göre Δ^9 -THC in doğrusal aralığı 0,5-50 ng/mL olarak belirlenmiştir. Bu aralıktaki korelasyon katsayısı $R^2 = 0.9996$ olarak bulunmuştur. Elde edilen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.41 ng/mL ve 0.48 ng/mL'dir. yBOS örneği üzerinde yapılan sonra spike verilerine göre geri kazanım yüzdesi 0.5 ng/mL'lik konsantrasyonda 80.73 ± 1.87 ; 5 ng/mL'lik konsantrasyonda 81.50 ± 1.81 ; 50 ng/mL'lik konsantrasyonda 81.96 ± 0.56

bulunmuştur. Önce spike ve sonra spike verileri ile matris etkisinin anlaşılması için yapılan 9 tekrarlı deneyler sonucunda, önce spike geri kazanım sonuçlarının (%83.30) sonra spike geri kazanım sonuçlarına (%95.0) göre kısmen azaldığı görülmektedir. Gün içi tekrar edilebilirlik için 3 ayrı konsantrasyonda çalışılan geri kazanım numunelerinden; 0.5 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 0.408 ± 0.032 ng/mL, bağıl standart sapma değeri 5.42, 5 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 4.14 ± 0.11 ng/mL, bağıl standart sapma değeri 3.05, 50 ng/mL konsantrasyondaki 6 adet örneğin ortalaması 40.83 ± 0.76 , bağıl standart sapma değeri %1.61 olarak tespit edildi. Günler arası tekrar edilebilirlik için 3 ayrı konsantrasyonda çalışılan geri kazanım numunelerinden; 0.5 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 0.289 ± 0.089 ng/mL, bağıl standart sapma değeri %7.13, 5 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 2.95 ± 0.24 ng/mL, bağıl standart sapma değeri %5.38, 50 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 37.55 ± 1.56 ng/mL, bağıl standart sapma değeri %3.87 olarak tespit edilmiştir. Hem gün içi hem de günler arası tekrar edilebilirlik çalışması sonuçlarında bağıl standart sapma değerlerinin <20 olduğu gözlemlendi. Bu da yöntemin tekrar edilebilir olduğunu göstermektedir. Stabilite çalışması için 7 gün ara ile analiz edilen örneklerdeki değişim %0.0167 bulunmuştur (Tablo XVI). Bu değer %1'in altında kaldığından geliştirilen yöntemin stabilitesi böylelikle kanıtlanmıştır.

Validasyon çalışması kapsamında doğrusallık ve kalibrasyon eğrisi, LOD ve LOQ, geri kazanım, ve stabilite çalışmaları yapılmıştır. İleriki çalışmalar ile Δ^9 -THC'nin diğer metabolitlerini de kapsayan daha düşük tayin limitlerine ulaşabilecek, daha hassas yöntemlerin geliştirilmesi ve geliştirilen bu yöntemin gerçek örneklerle doğrulanması hedeflenmektedir.

Anahtar Kelimeler: yBOS, Δ^9 -THC, LC-MS/MS, THCCOOH-D3, Validasyon.

SUMMARY

Cannabis is one of the oldest and most abused drugs in the world, and its use is associated with pathological and behavioral toxicity. Therefore, it is important to understand cannabinoid toxicokinetics and the distribution of cannabinoids through biological fluids and tissues. There are many factors that affect cannabinoid toxicokinetics, the main ones can be expressed as the type and method of abuse, the metabolization from liver and extrahepatic tissues and elimination in feces, urine, sweat, oral fluid and hair.

Quantitative analysis of biotherapeutic agents in cerebrospinal fluid (CSF) by LC-MS/MS is common situation in clinical trials. On the other hand, CSF, as an important biological sample in postmortem toxicology, plays a complementary role in determining the cause of death as an alternative matrix. Thus, it provides service to justice by analysing with highly sensitive GC-MS and LC-MS methods.

A standard aCSF, is necessary as a surrogate matrix in developing sensitive LC-MS methods for the determination of certain compounds in relevant matrices as a blank sample without sacrificing a few animals and using real BOS fluid.

This Master of Science (MSc) study was composed of a validation, conducted on the main active ingredient of cannabis Δ^9 -THC, which is one of the most common illegal substances, by an efficient extraction from a modified aCSF matrix using the SPE method and LC-MS/MS analysis.

The linearity results of the study are given as in Table 5. According to the 7-point calibration results, the linear range of Δ^9 -THC was determined in the range of 0.5-50 ng/mL. The correlation coefficient in this range was found $R^2 = 0.9996$. The obtained LOD and LOQ values of the method were found 0.41 ng/mL and 0.48 ng/mL, respectively. According to spiked data analysis established on artificial CSF (aCSF) samples at three different

concentration levels, the percentage of recovery was $80.73\pm 1.87\%$ at 0.5 ng/mL; $81.50\pm 1.81\%$ at 5 ng/mL and $81.96\pm 0.56\%$ at 50 ng/mL.

As a result of 9 repetitive experiments performed to understand the matrix effect with data performed for spiking before and after extraction, it is seen that the recovery results of spiking before extraction (83.30%) are partially decreased compared to the spiking after extraction recovery results (95.0%).

For repeatability studies within intra-day among the recovery studies in three different concentrations, the mean and %RSD value of 6 replicates of 0.5, 5 and 50 ng/mL concentration point were found 0.408 ± 0.032 ng/mL and 5.42%; 4.14 ± 0.11 ng/mL and 3.05%; 40.83 ± 0.76 ng/mL and 1.61%, respectively.

For repeatability studies within inter day among the recovery studies in three different concentrations, the mean and %RSD value of 6 replicates of 0.5, 5 and 50 ng/mL concentration point were found 0.289 ± 0.089 ng/mL and %7.13; 2.95 ± 0.24 ng/mL and %5.38; 37.55 ± 1.56 ng/mL and %3.87, respectively. Relative Standard deviation values were found under 20 from the results of both the intra-day and inter-day repeatability studies and this confirms that the developed method is repeatable. For stability study, the change criteria in samples analyzed with 7 days interval was found as 0.0167% (Table 12). As this value remained below 1%, the stability of the developed method was proved.

Within the scope of the validation study, the parameters such as linearity, calibration curve, LOD, LOQ, recovery and stability were performed. It would be helpful to develop more sensitive methods that can reach lower determination limits including other metabolites of Δ^9 -THC such as 11-OH-THC and THC-COOH for future projects and to verify this developed method with real examples.

Key Words: aCSF, Δ^9 -THC , THCCOOH-D3, LC-MS/MS, Validation.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kan/plazma ve serum en yaygın olarak kullanılan matrislerdir. Antemortem örneklerde yaklaşık 24-48 saat belirleme süresine sahip oldukları için, maruziyetin mevcut duruma adli boyut kazandırmadaki olası kabiliyetinin yorumlanmasında etkilidirler. Kanda ve idrarda vücuda alınan zehrin farklı belirlenme süreleri olduğundan, genellikle birlikte değerlendirilmekte ve sorgulamaya bağlı olarak maruziyet için iyi fikir vermektedir (1).

Ancak bazı postmortem olgularda, ne kan ne de idrar mevcuttur. Plazma ve serum, postmortem olgunun doğası ve çürümenin boyutu nedeniyle her zaman iyi bir seçenek olmayabilir. Diğer taraftan, ölümlerin yaklaşık % 50'sinde mesane kendini boşalttığı için, idrarı vücutta her zaman bulmak da mümkün değildir (11). Bir etken madde maruziyetinin belirlenebilmesinde kullanılan analitik teknikler geliştikçe ve çok düşük madde konsantrasyonlarını tespit edebilen yöntemler ortaya çıktıkça, beyin omurilik sıvısı (BOS), saç, tırnak, tükürük gibi alternatif matrislere olan ilgi de artmıştır. Bu nedenle, söz konusu zehrin tespiti için alternatif matrislerin veya alışılmamış matrislerin kullanılması çok yararlı olduğu görülmüştür (2).

BOS, koroidpleksuslardan salgılanan, subaraknoidal aralık ve ventriküllerde bulunan, araknoidvillus yapılardan ve lomber bölgedeki damarlardan kana geri dönen plazma ultrafiltratıdır. Beyin ve omuriliği dış travmalardan koruyan, beyin ile kafatası arasındaki bir sıvıdır. BOS, yeterli kan örneğinin mevcut olmadığı çoklu travma vakalarında alternatif bir materyal olarak yararlı olabilir. Yapılan çalışmalar, BOS'un adli toksikolojide kanın alternatifi olduğu kadar farmakolojik/toksikokinetik ve postmortem yeniden dağılımların araştırılmasında da yararlı olduğunu göstermektedir (3).

BOS'da bir etken madde maruziyetinin belirlenmesi adına yapılacak yöntemin analitik geçerlilik işlemleri için oldukça fazla biyolojik örneğe ihtiyaç duyulduğu ve BOS gibi bir

örnekte özdeş örnek toplamak mümkün olmadığı için klinik çalışmalarda zaten kullanılmakta olan yapay BOS (yBOS) sıvısına başvurulmaktadır (4). Son dönemde ilgi uyandıran bu alternatif matrislerle yeni yöntemlerin geliştirilmesine katkıda bulunmak gerekmektedir (2). Böylelikle postmortem toksikolojik örneklemede BOS'un daha fazla tercih edilebilir olması sağlanabilmektedir. Zira analiz yöntemlerinin sayısının artması, BOS matrisinin daha yakından incelenmesi ve tayin limitlerinin azaltılmasına yönelik ileri analitik yöntemler geliştirilerek postmortem toksikolojik araştırmaların kalitesi artacaktır.

Lipofilik olan Δ^9 -THC yüksek dağılım hacmine sahiptir ve başlıca lipoprotein olmak üzere %97-99'u plazmada proteine bağlı olarak bulunur. Δ^9 -THC'nin endokannabinoid sistem reseptörleri olan CB1 (beyin ve omurilikte) ve CB2'ye (periferik sinir sisteminde) bağlandığı ve bunları bir endokannabinoid gibi aktive ettiği belirlenmiştir (5).

Bu çalışmanın amacı, revize edilmiş bir yBOS örneği hazırlanması ve gerçeğe yakın şekilde hazırlanan bu matris içinde Δ^9 -THC'nin sıvı kromatografi-ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemi ile belirlenmesi için yöntem geliştirilmesidir.

2.GENEL BİLGİ

Toksikoloji, toksik maddelerin özelliklerini, organizmadan atılımlarını, etki şekillerini, değişik matrislerdeki varlığını inceleyen bir disiplindir. Toksikoloji, kimyasal maddelerin canlı organizmalardaki sistemler üzerinde istenmeyen, zararlı, olumsuz sonuçlar oluşturan etkileşmelerini inceleyen bir bilimdir. Toksikolojinin amacı; kimyasal maddelerin canlı sistemler üzerindeki zıt etkilerinin doğasını incelemek, bu zıt etkilerin meydana gelme, ortaya çıkma olasılıklarını öngörmek, yarar/zarar oranını ortaya koymak ve risk değerlendirmesini yapmaktır.

2.1 Toksikolojinin tanımı ve tarihçesi

Canlı organizmaya alınan her türlü yabancı maddeye ksenobiyotik denir. Bu ksenobiyotiklerle organizmanın etkileşiminin araştırıldığı, zehir etkisinin maddenin türüne, maruziyet yoluna ve süresine göre incelendiği bilimdalına toksikoloji denir. Kelime anlamına bakıldığında (toksikon=zehir; logos= bilim, bilgi) kısaca zehir bilimi olarak tanımlanmaktadır. Bu anlamda multidisipliner bir alandır ve farmasötik toksikoloji, adli toksikoloji, acil ve klinik toksikoloji, çevre toksikolojisi, mesleki toksikoloji, insan performans toksikolojisi, analitik toksikoloji, gıda toksikolojisi ve genetik toksikoloji gibi pek çok alt gruba ayrılmaktadır. Bir kişinin zehirlenmesine ve/veya ölümüne neden olan ve zehir etkisi gösteren maddelerin kanun adına ele alınması adli toksikolojiyi ilgilendirir.

2.1.1. Klinik toksikoloji

Tedavi sırasındaki bir kişide ilaçların ve/veya diğer bileşiklerin olumsuz etkilerini, yani toksik bir maddeye maruz kalması durumunda nasıl tedavi yöntemlerinin izlenmesi gerektiği konularını içeren toksikolojinin bir alt disiplin dalıdır. Çoğu klinik toksikolog hastanede çalışır ve üniversite klinik farmakoloji bölümleriyle yakın bağlantı içerisinde yer alırlar. Bir ilaç veya herhangi bir bileşik ile kasıtlı veya kazara zehirlenen hastaların nasıl tedavi

edileceğine dair tavsiyelerde bulunmaktan sorumludurlar. Dünyada olduğu gibi ülkemizde de, Ulusal Zehir Bilgisi Servislerinin bir parçası olarak yer alırlar. Zehirlenmiş hastaya yaklaşımda ve elde edilen ilk örnekler üzerinde yapılan analiz sonuçlarının yorumlanmasında uzmandırlar.

Ana amaçları; toksik maddelerin (ilaçlar veya toksinler gibi) veya diğer zehirlenme göstergelerinin varlığı açısından hastalardan alınan örnekleri analiz ederek klinikte meslektaşına destek sağlamaktır. Söz konusu zehir merkezi ağının veritabanlarını yönetmek ve zehir bilgi hizmetlerine yönelik telefon başvurularını değerlendirmek de önemli uğraşlarıdır.

Bu nedenle;

- Bilinmeyen ilaç taramaları – örneğin; birinin yığılmış halde bulunması durumunda psikoaktif etki gösteren bir madde kullanımını belirlemek veya dışlamak için.
- Terapötik ilaç takibi - eğer bir birey tedavi edilebilir bir hastalık için uzun süreli ilaç tedavisi alıyorsa, hastanın belirli bir dozdan gerekli etkiyi elde edip etmediğini değerlendirmek için ilaç seviyelerini ölçmek de yine aynı şekilde klinik toksikolojinin görevlerindedir.
- Protez tedavisi alan hastalar için uygunluk testi - eğer bir kişi yasadışı uyuşturuculara bağımlı hale gelmişse, benzer ancak daha az zararlı etkileri olan daha az zararlı ilaçlar verilebilir. Bununla birlikte, ikame ilaçlarının alındığını test etmek de önemlidir.
- Organ transplantasyonu ve/veya kan transfüzyonugibi olgularda vericinin herhangi bir psikoaktif madde kullanım öyküsü olmaması gerekmektedir.

2.1.2. Analitik toksikoloji

Analitik toksikoloji, canlı organizmalar üzerinde olumsuz etkiler gösterecek kimyasalların analitik kimyanın etkili ve sofistike enstrümanlarını kullanmak suretiyle araştırma yapılan bir alt disiplindir. Bu enstrümanlar, numune hazırlama, ekstraksiyon, kalibrasyon çalışmaları, maddenin veya maddelerin varlığının belirlenmesi, tanımlanması ve miktarının belirlenmesinde kullanılan tüm kalitatif ve kantitatif yöntemler/teknikler olarak sayılabilir.

Bu disiplin altındaki analizlere örnek olarak, insanda hava, su veya gıda yoluyla potansiyel toksik maddelere maruz kalma seviyelerinin belirlenmesi; deneysel çalışmalarla hayvanların bir maddeye maruz kalma seviyelerinin belirlenmesi ve doğrulanması; yine hayvan çalışmaları ile ksenobiyotik ve metabolit seviyelerinin belirlenmesi; kan ve idrar örneklerinin yasadışı ilaçların veya metabolitlerinin varlığı açısından taranması vb. örnekler verilebilir. Kimyasal maddelerden kaynaklanan sağlık sorunlarının tanı ve tedavisi ile birlikte tedavi amaçlı ilaç takibi gibi konuların ilgili alanı analitik toksikolojiye dayanır. Analitik toksikolojideki güncel teknolojik ilerlemeler, hassasiyet ve özgüllük anlamında söz konusu çalışmalara güç kazandırırken, tekniklerin aşırı hassasiyetinden kaynaklı bazı problemleri de beraberinde getirmiştir. Analizler iki aşamalı yürütülür. Önce tarama, ardından doğrulama ve ölçme ya da dışlama yöntemleri gibi birbirini tamamlayıcı sistemler mutlaka kullanılmaktadır.

Analitik toksikoloji, biyolojik ve ilişkili örneklerde ilaçların ve diğer yabancı bileşiklerin (ksenobiyotikler) ve metabolitlerinin tespiti, tanımlanması ve ölçümü ile ilgilenir. Analitik toksikoloji uygulanırken klinik ve adli toksikolojiyi bir araya getirir. Analizler üç aşamalı yürütülür. Sistemik toksikolojik analizde üç temel adım bulunmaktadır;

Örnek hazırlama: Homojenizasyon, hidroliz, mikrodifüzyon, Headspace örnekleme, sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı faz ekstraksiyonu, türevlendirme.

Ayırma/tespit etme: Renk testleri, immünoanalizler, UV / renk reaksiyonları ile TLC; GC, HPLC, LC ile MS.

Doğrulama: Sonuçları doğrudan veya referans veritabanından bileşiğin parmak izi ile karşılaştırma.

Kan, tükürük, idrar ve BOS gibi sıvıların örneklenmesi ve analizi analizden önce homojenleştirme gerektiren katı ve yarı katılara göre daha kolaydır.

2.1.3. Adli toksikoloji

Toksikolojinin alt dallarından biri olan Adli Toksikoloji, hukuka intikal etmişer türlü vakada zehir etkisi gösterebilecek maddelerin araştırılması esasına dayanmaktadır. Adli toksikoloji, adaletin oluşması amacıyla zehirlerin, kasıtlı-kasıtsız zehirlenme olgularının incelendiği bilim dalıdır. Adli toksikoloji, canlıda ve ölüde, ceza hukuku, medeni hukuk ve sigorta hukuku ile ilgili olarak ortaya çıkan pürüzlerin araştırılması ve giderilmesi konusu ile ilgilidir.

Ölümlle sonuçlanan bir vakanın orijininin belirlenmesinde, olay yerinde ele geçen bir maddenin söz konusu zehirlenmeye sebep olup olmayacağını araştırılmasında, olay ile şüpheli toksik maddenin ilişkisinin incelenmesinde, ters ilaç etkisi veya aşırı doz madde etkisinin belirlenmesinde, akut zehirlenme vakalarında toksik ajanın belirlenmesinde, kimyasal savaş ajanları ve narkotik maddeler ile meydana gelen zehirlenmelerde, madde etkisi altında işlenen suçların (cinsel istismar, trafik kazası, iş kazası, hırsızlık, gasp, cinayet vb.) aydınlatılmasında, reçeteli/reçetesiz ilaç istismarında, işyeri maruziyetinin belirlenmesinde, ticari ürün içeriklerinin araştırılarak insan sağlığını tehdit edici unsurların hukuki çerçevesinin ortaya konmasında vb. pek çok konuda adaletin tecellisine ışık tutan bu bilim alanı eczacılık, kimya, biyoloji, farmakoloji, tıp, patoloji, biyokimya, matematik, fizik gibi temel bilim alanları ile disiplinler arası işbirliği içerisinde hizmet etmektedir.

Olay yerinden ve otopside elde edilen deliller laboratuvarlarda incelenerek ölüm nedeni bulunmaya çalışılır. Delillere öncelikle aranması istenilen maddeye göre veya rutin olarak gerçekleştirilen ön tarama testleri, test sonucunun pozitif çıktığı durumlarda da doğrulama testleri uygulanır. Zehirlenmeye sebep olan madde türü ve miktarının belirlenmesi önemlidir.

Zehirlenmeye yol açan maddenin ne olduğu bilinmiyorsa kan ve idrar örnekleri alınarak incelenmek üzere gönderilir. Ağır metallerle zehirlenme kuşkusu varsa dışkı, safra, tırnak ve saç gibi biyolojik örnekler de incelenmeye gönderilir.

Adli toksikoloji zehirlenmenin hukuksal yönünü değerlendirir, maruz kalınan kimyasal maddenin doz-etki ilişkisinin yorumunu yapar. Zehirlenme sonucu oluşan ölüm olaylarını inceleyerek adli tıbbaya yardımcı olur.

2.1.3.1. Postmortem toksikoloji

Postmortem toksikolojinin amacı genellikle ölümden veya ölümden hemen önce yaşanan olaylarda uyuşturucu veya diğer zehirlerin oynadığı rolü belirlemektir. Ek olarak, reçeteli ilaç kullanımının veya mesleki maruziyetin yol açtığı bağımlılığı değerlendirmek için faydalı olabilir.

Ölüm sonrası yapılan analizlerde, ölümün meydana geldiği koşullar, ölen kişinin yaşı ve diğer ilaçların veya alkolün olası varlığı dikkate alınmalıdır. Diğer potansiyel değişkenler şunlardır: (i) kullanılan analitik araştırmaların uygunluğu, (ii) analitin / analitlerin stabilitesi, (iii) analiz için gönderilen numunenin / numunelerin yapısı ve (iv) vücut sıvılarının, özellikle kanın bileşiminde ölüm sonrası değişikliklerin olabileceği gerçeği.

Bir ölüm olgusunda postmortem örnek olarak alınan kan örneği çok değişkendir. Kan hücrelerinden biri olan eritrositlerin büyük boyutlarda yıkıma uğraması (hemoliz) olduğandır, dolayısıyla örneğin alınmasından önce hücrelerin tortulaşması ve / veya pıhtı oluşumu meydana gelmiş olabilir. Yine de, tam kan örnekleri postmortem toksikolojide yaygın olarak

kullanılmaktadır. Bunun em önemli sebebi (i) postmortem olguda örnek alımı nispeten kolaydır, (ii) genellikle plazma veya serum içeriği olgunun hikayesi hakkında önemli veriler sunmaktadır. Akut zehirlenmeye bağlı ölüm olgularında, (tedavi sırasında ve akut maruziyete bağlı) olası analitlerin konsantrasyonlarının belirlenmesi, sonuçların yorumlanması için en azından bir temel sağlamaktadır. Hasta hastanede kaybedilmişse, hastaneye başvuru anındaki kan örneği ile postmortem örneklem arasındaki kan konsantrasyon verileri olguyu aydınlatmada oldukça önemli veriler sağlayacaktır.

Bir ilacın akut toksisitesine tolerans geliştirildiği ve kan analit konsantrasyonlarında ölüm sonrası değişiklik olasılığı, sonuçların yorumlanmasını zorlaştırabilir, alternatif matris analizlerinin sonuçları gibi ek bilgilerin bulunabilirliğini maruziyetin doğası ve büyüklüğü hakkında daha fazla kanıt sağlayabilir (43).

2.1.3.1.1.Postmortem toksikolojide sıklıkla kullanılan biyolojik örnekler

Otopsi kaynaklı örnekler olup, kan, idrar (veya mesane yıkama sıvısı), iç organlar (akciğer, karaciğer, beyin, böbrek, kalp, mide), mide içeriği (tamamı), barsak içeriği, kıl, iç yağ, kusmuk, safra, göz içi sıvısı, saç, tırnak, dişler, ağız içi sıvısı, BOS, cilt, svaplar, kemik, kas, mekonyum (anne karnındaki bebek dışkısı), entomolojik örnekler (larva, pupa ve erişkin böcekler) sayılabilir.

2.1.3.1.2.Postmortem toksikolojide kullanılan alternatif matrisler

İlaçların varlığını değerlendirmek için bir dizi biyolojik örnek analiz edilebilir, ancak pratikte bunların uygunluğu, numunelerin elde edilebilme kolaylığı ve bunları analiz etmek için teknolojinin kullanılabilirliği ile sınırlıdır.

Bazı durumlarda, ilaçların tespiti için alternatif matrislerin ya da geleneksel olmayan matrislerin kullanımı çok faydalı olabilir. Matrislerin türü değişkenlik gösterir, ancak büyük ölçüde mevcudiyet, toplama kolaylığı ve sonuçların yorumlanmasına bağlıdır.

Farklı ilaç matrislerinden elde edilen sonuçlar yorumlanırken, terapötik aralık veya bir ilacın alımdan sonra tespit edilebileceği sürenin uzunluğu dikkatlice düşünülmelidir.

Bilimsel teknikler geliştikçe ve ilaçları çok düşük konsantrasyonlarda saptama mümkün oldukça, alternatif matrislere ilgi artmıştır. Toplanması cerrahi işlem gerektirmeyen, gerektiğinde gözetim altında gerçekleştirilebildiği için nispeten kolay olan tükürük, ter ve saç örnek olarak verilebilir.

Her ne kadar genellikle nispeten az miktarlarda mevcut olsalar da, LC-MS ve GC-MS-MS gibi daha hassas tekniklerin geliştirilmesinden dolayı, ilaçların doğru şekilde tespit edilmesi ve ölçülmesi mümkündür.

Postmortem toksikolojide bazı durumlarda hem kan hem de idrar mevcut değildir, bu nedenle beyin omurilik sıvısı, mide içerikleri, göz içi sıvısı, safra, karaciğer ve diğer dokular, kas veya kemik iliği gibi alternatif matrisler analiz için gönderilir. Bu gibi durumlarda, sonuçları analiz etmek ve yorumlamak zor olabilir, çünkü bu matrisler rutin olarak kullanılmadığından, referans için yayınlanmış veri sınırlıdır.

2.2. Beyin Omurilik Sıvısı (BOS)

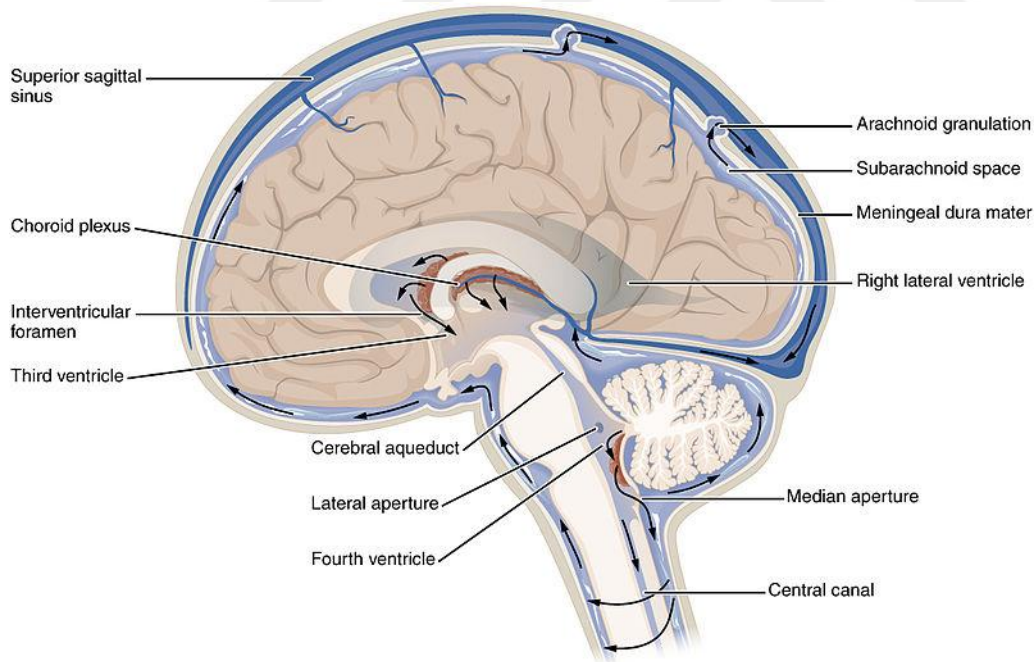
Beyin omurilik sıvısı (BOS), merkezi sinir sisteminin (MSS) öğelerini çevreleyen bir plazma ultrafiltratıdır (bileşimi, yüksek moleküler kütleli proteinlerin bulunmadığı plazmadır). BOS, MSS'de beynin ventriküler sisteminde (toplam BOS hacminin% 20'sini oluşturur) veya subaraknoid boşlukta (toplam hacmin kalan% 80'i) bulunan berrak, renksiz bir sıvıdır. BOS örneğinin vücuttaki toplam hacmi yaklaşık 150 ml'dir ve günde 450 ml oranında üretilmektedir. Günde 3 kez kendini yenilemektedir. Oluşum oranı 20 ml / saat veya yaklaşık

500 ml gündür. BOS'daki basınç daha yüksek olduğu için fazla sıvı, araknoid granülasyonlar yoluyla venöz sinüslere kolayca emilmektedir. Yetişkinlerde 90 ile 150 ve yenidoğanlarda 10 ile 60 ml'lik bir hacmi sürekli korumak için, bu sıvı dolaşım sıvısı üretimine eşit oranda araknoid granülasyonlarındaki kılcal damarlarda geri emilmektedir (102).

Lenf damarları, kraniyal ve spinal sinir kılıfları ve ependimaya da geri emildiği görülmüştür (45). Araknoid granülasyonlarının hücreleri, merkezi sinir sistemi (MSS) içindeki basınca yanıt veren ve sıvının geri akışını önleyen tek yönlü valfler olarak işlev görür.

BOS iki şekilde sentezlenir. Hacmin yaklaşık % 50 ile 70'i koroidpleksus ve ventriküler ependim hücrelerinde salgılanarak meydana gelir. Sıvının geri kalanı, koroid kılcal damarları yoluyla kan plazmasının ultrafiltrasyonu ile sentezlenir.

Beynin ve omurganın içindeki korunmuş ortamı nedeniyle kontaminasyona ve bakteri istilasına daha az maruz kalır. BOS çok az enzim ve protein içerir.



Şekil 1: Beyinde BOS dolaşımı

2.2.1. BOS yapısı ve fizyolojik özellikleri

BOS bileşimi, kan plazmasının bileşiminden niteliksel olarak çok farklı değildir, ancak kantitatif olarak farklılık gösterir. BOS bileşenlerinin konsantrasyonlarını ölçmek için genellikle lomber, nadiren subosipital ponksiyon gerçekleştirilir. Dört numune (her biri yaklaşık 2 ml) toplanır. Biyokimyasal, sitolojik, mikrobiyolojik inceleme için ve yedek numune alınır, 4°C'de saklanır. Fizyolojik bulgular aşağıdaki tablolarda özetlenmiştir:

1. BOS İyon içeriği tablosu

Tablo I. BOS iyon bileşimi

Madde	Değer	Plazmatik değer yüzdesi
pH	7,28-7,32	
Osmolarite	285 mosm/l	
Özgül ağırlık	1003-1008	
Na+	135-150 mmol/l	
K+	2,0-3,0 mmol/l	
Ca ²⁺	1,1-1,25 mmol/l	~ %50
Cl ⁻	115-130 mmol/l	>% 100

2. Besin maddeleri ve proteinler

Tablo II. BOS molekül içeriği

Madde	Değer	Plazmatik değer yüzdesi
Glikoz	2,2-4,2 mmol / l	~%60
Proteinler	0,1-0,40 g/l	~% 1 (çoğunlukla küçük proteinler, immünoglobulinler- IgG, IgM)
Laktat	1,1-2,0 mmol/l	
Üre	3-6,5 mmol/l	
Lipidler	10-30 mg/l	

3. Hücreler

Tablo III. BOS hücre bileşimi

Tür	Değer
Eritrositler	0 / mm ³
Lenfositler	0-5 / mm ³
Bakteriler	0 / mm ³

BOS aşağıdaki işlevleri yerine getirir:

1) *Mekanik ve destekleyici*

Beyin, BOS örneğine bütünüyle dalmış durumdadır, bu da gerçek ağırlığın (yaklaşık 1500g) yaklaşık 25 g'ye düşmesini sağlar. Bu mekanizma beyni kendi ağırlığının yol açabileceği hasara karşı korur. Beyni, omuriliği, beyinden çıkan ve omurilik içerisinde kaslara taşınan sinirleri dış travmalardan korumaktadır.

2) *Koruyucu*

BOS bir tampon görevi görür, beyni ani basınç ve sıcaklık değişikliklerinden korur, BOS'ta bulunan bağışıklık sistemi bileşenleri (lökositler, immünoglobulinler vb.) çeşitli patojenlere karşı koruma sağlar.

3) *Metabolik*

Sinir dokusu hücrelerini çevreleyen ortamın kompozisyonunu korumaya yardımcı olur. Aynı zamanda kısmen besinlerin tedarikini ve metabolik atıkların eliminasyonunu sağlar ve içinde çeşitli sinyal moleküllerinin (nörotransmitterler gibi) difüzyonunun gerçekleştiği bir ortam oluşturur.

2.2.2 BOS örneğinin klinik önemi

BOS, anatomik olarak beynin fonksiyonel özelliği ve kan beyin bariyeri sayesinde güçlü bir izolasyonla korunur, kontaminasyona ve bakteriyel invazyona eğilimi azdır. Bu sayede, gerek Menenjit gibi bulaşıcı, gerekse Alzheimer, İskemi gibi dejeneratif hastalıkların tanısında BOS analizinden yararlanılmaktadır (7-9).

C_{BOS} (BOS konsantrasyonu), beynin dokuları arası sıvı konsantrasyonunu C_{up} (bağlanmamış plazma konsantrasyonu)'dan daha doğru bir şekilde öngörür. C_{ub} (bağlanmamış beyin konsantrasyonu) ve C_{BOS} , ilaç keşfi ve geliştirmede dokular arası sıvı konsantrasyonu için temsilci olarak kullanılabilir (12). İlaç keşfinde, BOS ilaç konsantrasyonu (C_{BOS}), dokular arası sıvı konsantrasyonu (C_{ISF}) temsili olarak kullanılmıştır. Düşük protein konsantrasyonları nedeniyle C_{BOS} 'un, BOS'taki bağlanmamış ilaç konsantrasyonuyla özdeşlik gösterdiği bildirilmektedir (13).

MSS'ye etki eden ilaçlara maruziyetini değerlendirilmede yine BOS'tan faydalanılmıştır. BOS normalde nispeten korunan bir ortam içindedir ve bu nedenle diğer biyolojik örneklerin mevcut olmaması durumunda, değerli bir örnek sağlayabilir. BOS alınması, nispeten korunan bir ortamda olduğu için travmatik ölüm veya ileri çürüme durumunda da yardımcı olabilir.

BOS çok az protein olduğu için örnekteki ilaç konsantrasyonları genellikle bağlanmamış plazma konsantrasyonuna çok yakın olduğu bildirilmektedir.

Plazma "serbest fraksiyonu" genellikle tükürük ile dengededir, ancak BOS konsantrasyonu ile denge, ilacın kan-beyin bariyerini geçebilmesini gerektirir.

Güçlü (>% 90) plazma proteinine bağlı analitler için, 'serbest' plazma, tükürük ve BOS konsantrasyonları genellikle çok düşüktür ve bu nedenle 'serbest' plazma ve BOS ilaç ölçümleri zordur ve numune hacmi genellikle sınırlı olduğu için, yüksek hassasiyetli analitik yöntemler gerektirir.

MSS'nin birçok hastalığı, BOS bileşenlerinin içeriğinde ve konsantrasyonlarında değişikliklere neden olabilir. Böylelikle BOS'un test edilmesi, ayırıcı tanı ve belirli bir tanının doğrulanmasında önemli bir rol oynar.

Lomber ponksiyon ve BOS muayenesi yapmak için endikasyonlar, diğer bozuklukların yanı sıra Ensefalit, Menenjit, Multipl Skleroz, Nörosifiliz ve subaraknoid kanama şüphelerini içermektedir (119).

Menenjit, MS, paraneoplastik sendromlar, sistemik lupuseritematozus, nörosarkoidoz, serebralanjiit gibi hastalıklarda, BOS protein içeriği incelenerek teşhise yardımcı olmaktadır (49). Birçok nörolojik hastalığın teşhisinde çok önemli bir rol oynayabilir.

Beynin ventriküllerinde anormal BOS birikimi hidrosefalidir. İdiyopatik intrakraniyal hipertansiyon, BOS basıncında bir artış ile karakterize nedeni bilinmeyen bir durumdur (46).

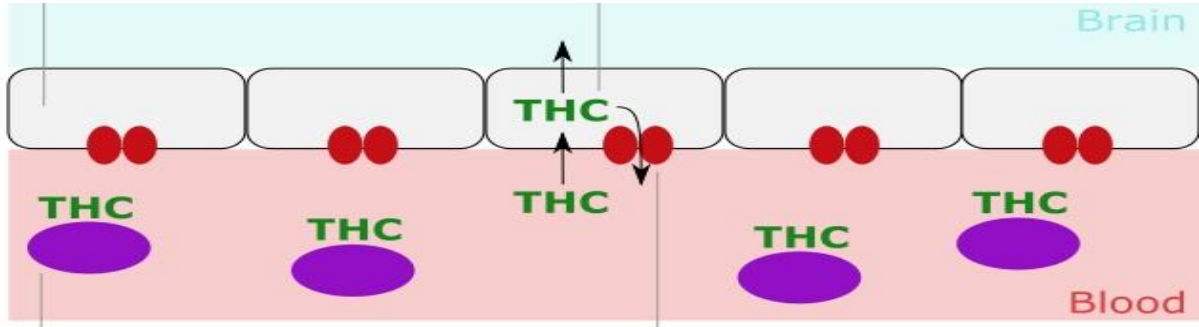
Bazı anestezipler ve kemoterapi ilaçları lomber ponksiyonla BOS'aintratekal olarak enjekte edilir, kan-beyin bariyerini geçemeyen maddeler merkezi sinir sistemi boyunca aktif olabilir. (47). Barisite, bir maddenin insan BOS örneği yoğunluğuna kıyasla yoğunluğunu ifade eder ve belirli bir ilacın intratekal boşlukta yayılma şeklini belirlemek için bölgesel anestezide kullanılmaktadır.

2.2.3. BOS madde geçiş mekanizması

KBB'nin ana işlevi, MSS dokusunu (özellikle nöronları), zararlı maddelere karşı korunmaktır. KBB'nin seçiciliği, birçok zararlı maddenin MSS'ye geçmesini engeller, beyin fonksiyonu için gerekli maddelerin girmesine izin verir. Genel olarak, hidrofilik maddeler KBB'yi geçemezler. KBB'nin hidrofobik doğası ise lipofilik maddelerin steroid hormonlarla geçişine izin verir. KBB ayrıca vücudun bir enfeksiyonla mücadele yeteneğini ciddi şekilde engelleyebilecek antikor ve antibiyotiklerin geçişini önler.

- **Kan-beyin bariyeri (KBB, hematoensefalik bariyer)**

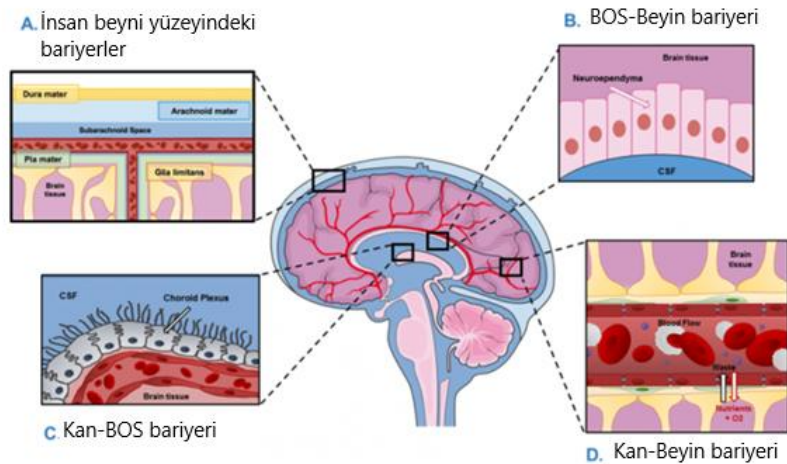
Kan-beyin bariyeri terimi, beyin dokusunu kan dolaşımından ayıran bariyeri belirtir. Kan-beyin bariyeri esas olarak kılcal damarların endotel hücreleri tarafından oluşturulan sıkı bağlantılardan oluşur. Kan beyin bariyeri boyunca taşıyıcılar, glikoz gibi gerekli maddelerin beyne difüzyonuna izin verir.



Şekil 2: THC'nin KBB'den geçişi. Albümin ve diğer proteinler plazmadaki THC'nin %97'sine bağlanır. İlaç taşıyıcıları THC'yi plazmaya geri pompalar.

- **Kan-BOS bariyeri**

Kan-BOS bariyeri beyin omurilik sıvısını ve kanı ayırır. Kan-BOS bariyeri, maddelerin kandan BOS'a geçişini kısıtlar. KBB'den daha geçirgendir ve birçok plazma proteini beyin omurilik sıvısına geçer (pinositoz veya aktif taşıma yoluyla). Taşıma ters yönde de gerçekleşir ve BOS'daki maddeler dolaşıma girebilir.



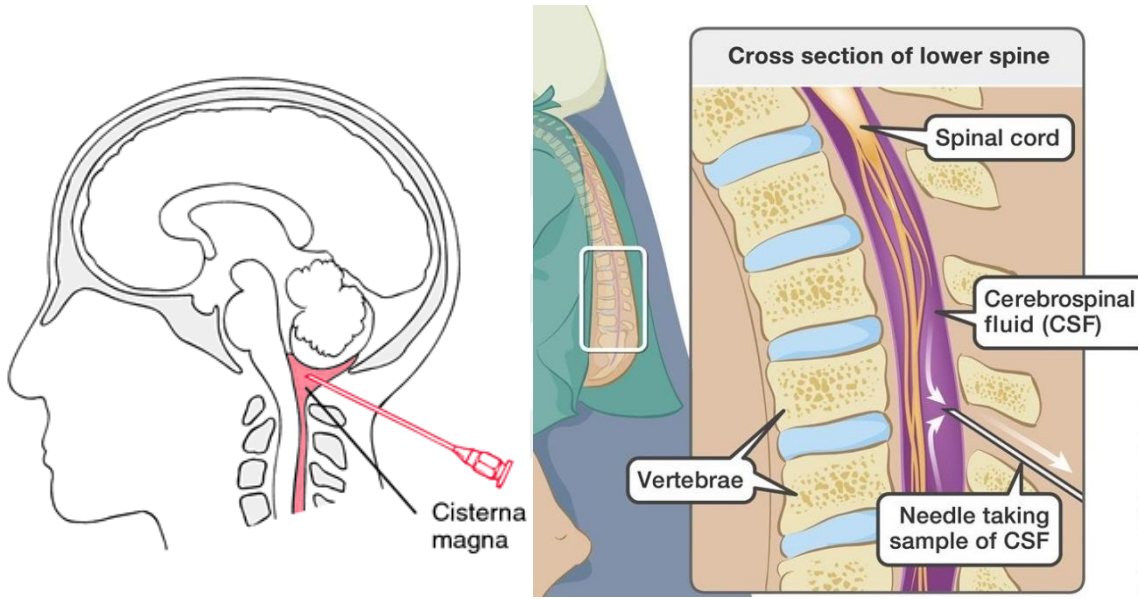
Şekil 3: KBB ve Kan-BOS bariyeri

2.2.4. BOS örneğinin klinik araştırmalarının ve analizlerinin tarihçesi

BOS'un ilk bilinen gözlemleri Hipokrat (M.Ö. 460–375) ve daha sonra Galen'e (MS 130–200) kadar uzanır. Hipokrat, konjenital hidrosefaliyi tarif ederken beyni çevreleyen "su" hakkında tartışmış ve Galen, beynin ventriküllerinden buruna boşaldığına inandığı sıvıya atıfta bulunmuştur (50). Ancak, aradan geçen yaklaşık 16 yüzyıl boyunca devam eden çalışmalarda literatürde BOS'tan bahsedilmemiştir. Bu, başın vücuttan ayrılarak, beyin incelenmeden önce BOS kanıtlarını ortadan kaldıran zamanın yaygın otopsi tekniğinden kaynaklanmış olabilir. BOS'un keşfi Emanuel Swedenborg'a atfedilir. 1741 ve 1744 yılları arasında yazılan ve yaşamı boyunca yayınlanmayan bir makalede Swedenborg, BOS'dan dördüncü ventrikülün çatısından medulla oblongata ve omuriliğe salgılanan "damıtılmış lenf" olarak bahsetti. İsviçreli bir hekim ve fizyolog olan Albrecht von Haller, 1747'de fizyoloji kitabında beyindeki "suyun" ventriküllere salgılanıp damarlara emildiğini ve fazla salgılanırsa hidrosefaliye yol açabileceğini not etti. Domenico Contugno balıklarda ve kaplumbağalarda BOS'tan bahsetti. Francois Magendie, viviseksiyon yoluyla BOS'un özelliklerini inceledi. Dördüncü ventrikülün çatısında açılan foramen magendie'yi keşfetti, ancak yanlışlıkla BOS'un piamater tarafından salgılandığı sonucuna vardı. Thomas Willis, BOS kıvamının Menenjitte değiştiğini not etti. 1869'da Gustav Schwalbe, lenfatik damarlar yoluyla BOS drenajının olabileceğini önerdi. 1891'de W. Essex Wynter, tüberküloz menenjitini subaraknoid alandan BOS'u uzaklaştırarak tedavi etmeye başladı ve Heinrich Quincke, hem teşhis hem de terapötik amaçlar için savunduğu lomber ponksiyonu popülerleştirmeye başladı. 1912'de bir nörolog William Mestrezat, BOS'un kimyasal bileşiminin ilk doğru tanımını verdi. 1914'te Harvey W. Cushing, BOS'un koroidpleksus tarafından salgılanmasına dair kesin kanıtlar yayınladı.

2.2.5. BOS örnek alma yöntemleri

Lomber ponksiyonla (omurilikten iğne aspirasyonu) elde edilir ve steril tüplere toplanır. Omurga kanalına bir iğnenin sokulduğu tıbbi bir prosedürdür, lokal anestezi altında gerçekleştirilir. Subaraknoid boşluğa ve toplanan sıvıya erişmek için bir hipodermik iğne kullanılır. Cisterna magna ponksiyonu da tercih edilir. Alternatif olarak, kafatası çıkarıldıktan sonra ventriküllerden aspire edilebilir, mevcut BOS'un tümü alınır.



Şekil 4: Cisterna magna ponksiyonu ve lomber ponksiyon

2.2.6. BOS örneğinin Adli toksikolojide önemi

Kapalı ortamda bulunan vücut sıvıları ölümden sonra kandan daha uzun süre korunurlar ve bu nedenle ölüm sonrası sınırlı kimyasal değişikliklere maruz kalırlar. Kontaminasyon ve çürümeden daha az etkilenmesi nedeni ile BOS, büyük miktarlarda bulunduğu ve örnek alımı kolay olduğundan, bu değişiklikleri araştırmak için uygun bir sıvı olarak kabul edilmiştir. Ayrıca, BOS'ta bulunan ana moleküllerin, diğer vücut sıvılarının çoğunun aksine,

canlılarda bilinen referans değerleri vardır. BOS'taki biyobelirteçler incelenerek, ölüm zamanı hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır (59).

Pragst ve ark. tarafından 1999 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada eroin kullanımına bağlı 29 ölümlü olguda, göz içi sıvılarında ve BOS örneklerinde 6-asetilmorfinin GC/MS ile belirlenmesi ve bulunan değerlerin söz konusu olguların idrarlarında belirlenen 6-asetilmorfin (6-AM) verileri ile karşılaştırılmasının yapıldığı görülmektedir. 6-AM için BOS ve göz içi sıvısı analizinin, idrar testinin negatif olduğu durumlarda bile pozitif sonuçlar verebildiği bu çalışma ile bildirilmektedir (10).

Olguların kan ve perikardiyal sıvı örneklerinde belirlenen konsantrasyonların, BOS'ta belirlenen konsantrasyonlarla kıyaslandığı bir postmortem çalışmada, GC/MS ile analizler gerçekleştirilerek ilaç konsantrasyonlarının arasında bir bağlantı araştırılmıştır. Bu sebeple toplamda 103 olguda toksikolojik verilerini gözden geçirmiştir. Kimyasal ve farmakokinetik özelliklerine bağlı olarak çeşitli narkotiklerin BOS, kan ve perikard sıvısı konsantrasyonları arasında oldukça anlamlı bir korelasyon bulunduğu bildirilmiştir. Bu bulgular, BOS'un adli toksikolojide kanın alternatifi olduğu kadar farmakolojik / toksikokinetik ve postmortem yeniden dağılımların araştırılmasında da yararlı olduğunu göstermektedir. Rutin araştırmalarla bireysel vakalarda değerlendirmeye katkıda bulunulabileceğini bildirmektedir (3).

Sonraki çalışmalarla BOS örneğinde MSS'ye etkiyen maddeler/ilaçların farklı konsantrasyonlarda bulunabileceğini gösteren bir dizi çalışma görülmektedir (1,3,10,13).

BOS örneği de kullanılarak aydınlatılan bir çocuk ölüm olgusunda, fethi kabir yapılarak ölümünden 8 ay sonra otopsi yapılan (çinko tabutla gömülü olan) bir aylık kız bebeğinin, BOS ($\mu\text{g/ml}$) ve karaciğer($\mu\text{g/g}$) örneklerinde Amitriptilin ve Nortriptilin miktarları sırasıyla 4,4; 0,6 ($\mu\text{g/ml}$), 29,8; 3,6 ($\mu\text{g/g}$) bulunduğu bildirilmektedir (55).

BOS örneğinde belirlenen konsantrasyonlarının ilaç-kan düzeyine oranı, oral asetaminofen ve fenobarbital için yaklaşık 0.3-1.2 katı, oral prometazin ve klorpromazin içeren fenotiyazin

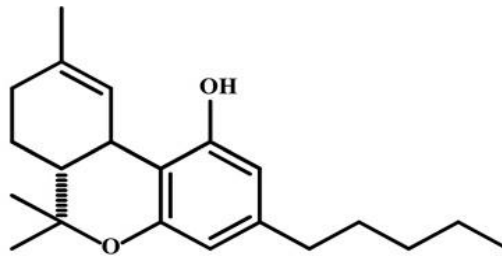
türevleri ve intravenöz anestezi midazolam için yaklaşık 0.1 katı ve terapötik konsantrasyonlarda klorfeniramin, dihidrokodein ve kafein gibi soğuk ilaçlar için yaklaşık 0.2-0.9 katı olarak belirlenmiştir.

2.3. Psikoaktif maddeler

Psikoaktif maddeler, insan üzerinde kasıtlı veya kazara maruziyet sonrası bilişsel veya duygusal zihinsel süreçleri etkileyen maddelerdir. Psikotrop maddeler de denilen bu tür bileşikler ilaç, yasa dışı madde olarak karşımıza çıkmakta ve uyuşturucu ile mücadele politikası dahilindeki tüm madde sınıflarını tanımlayan bir terim olduğu görülmektedir. Bu maddelerin hepsi bağımlılık potansiyelleri olmasa da genel anlamda, "uyuşturucu kullanımı" veya "madde kötüye kullanımı" altında incelenir ve mücadeleler geliştirilir.

2.3.1. Δ^9 -THC

Esrar, Hint keneviri bitkisinden elde edilen sıklıkla karşılaşılan bir yasa dışı maddedir. Hint keneviri dünya çapında yetişen bir bitkidir. Kendirgiller (Cannabaceae) ailesindedir. Esrar, değişen oranlarda kenevir bitkisinin çiçek veren tomurcuklu tepelerinden, sap ve yapraklarından, toz, plaka ve sıvı şeklinde hazırlanır. Delta-9-tetrahidrokannabinol (THC), esrarın etken maddesidir. Kimyasal formülü $C_{21}H_{30}O_2$, kaynama noktası 200°C , molekül kütlesi $314,47 \text{ g/mol}$ 'dür (58).



Şekil 5: Δ^9 -Tetrahidrokannabinol

2.3.1.1.Δ⁹-THC Genel Özellikleri

Δ⁹-THC, Hint keneviri (*Cannabis sativa* ve *Cannabis indica*) bitkisinde doğal olarak sentezlenen, bitkiye halüsinojenik özelliklerini veren ana psikoaktif maddedir. Esrar aktif maddeleri dişi ve erkek bitkinin en çok reçine, çiçek ve yapraklarında bulunur. Tohumda bulunmaz. Bitkinin dışısında erkeğine kıyasla 4-5 kat daha fazla THC bulunur. Bu sebepten esrar, dişi hint kenevirinden elde edilir.



Şekil 6: Kenevir bitkisinin yaprakları, kurutulmuş bitki ve sigara halinde esrar

Günümüzde kenevir bitkisi ekim ve üretim alanlarını belirleyebilmek zordur. Hemen her ülkede, en azından ülkedeki ihtiyacın bir kısmını karşılayabilmek için esrar üretimi yapılmaktadır. Ancak, uluslararası ticari boyutları olan esrar üretimi göz önüne alındığında, ilk etapta yasadışı haşhaş ekim alanları olan Güneydoğu ve Güneybatı Asya bölgeleri akla gelmektedir.

Kenevir bitkisinin yapraklarının üzerindeki reçinenin çıkarılması ile reçine esrar, kurutulmuş elekten geçirilmesiyle toz esrar, çeşitli şekillerde preslenmesi ile pres esrar, aktif maddenin fazlaca bulunduğu üst yapraklardan gonca esrar, esrarın alkol, kloroform, heksan veya petrol eteri ile damıtılmasıyla likit esrar ismi verilen esrar çeşitleri elde edilir.

Esrar, en az 6000 yıldır tarım, ilaç, kâğıt, tekstil vb. birçok sektördeki ürünleriyle insanlığa hizmet etmiş olsa da (24), 20. yüzyıl ortalarında kullanımı ve satışı birçok ülkede yasaklanmıştır. Esrarın kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir. Keyif verici ve sarhoş edici etkisinden başka, onlarca sektörde hammadde olarak kullanılmaktadır. İnsanlık tarihinde

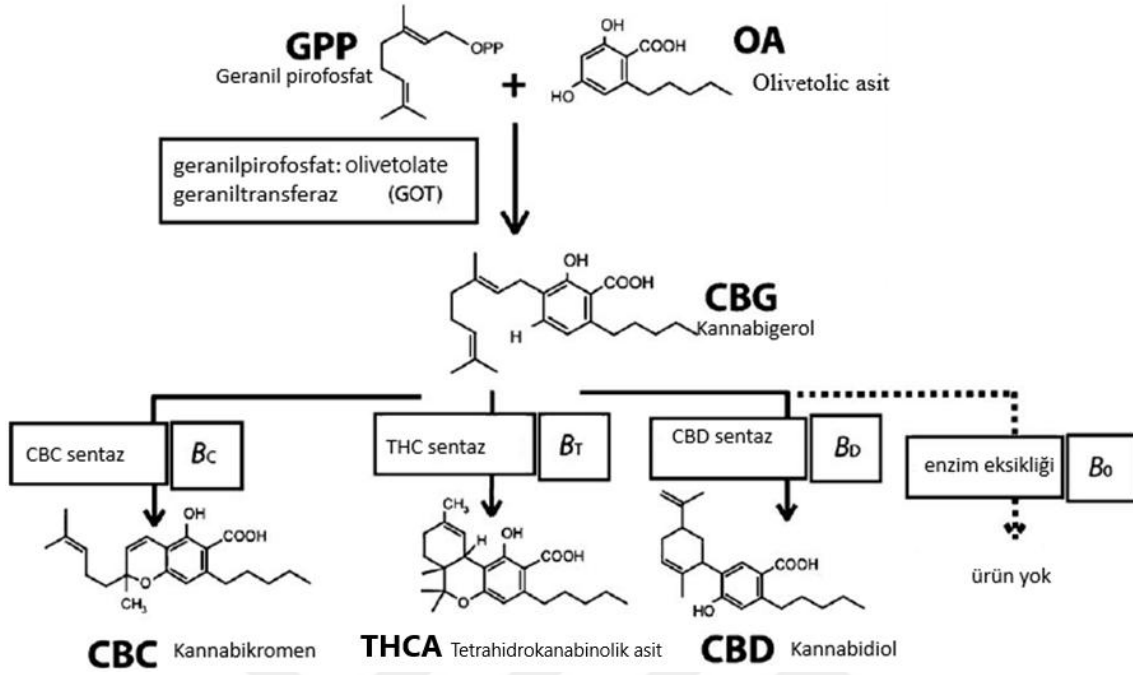
genellikle psikiyatrik hastalıkların tedavisinde kullanılan bitkisel bileşenlerden biri olarak yer almıştır.

Farmakolojik özellikleri hakkındaki mevcut bilgimiz, ancak 19. yüzyılın sonundan bu yana yapılan çalışmalara dayanmaktadır.1964'te *Cannabis sativa*'nın başlıca psikoaktif bileşeni olan Δ^9 -tetrahidrokannabinol (Δ^9 -THC ya da THC) keşfedilmiştir(22). Bunu Δ^9 -THC'nin beyindeki spesifik bağlanma bölgelerinin tanımlanması (15), kannabinoid 1 (C1) reseptörünün klonlaması (17) ve ikinci bir reseptör olan kannabinoid 2'nin (C2) keşfi izlemiştir (18). Kenevir bitkisinde 483 farklı tanımlanmış kimyasal bileşen bulunduğu bilinmektedir (25). Bunların 66'sı kannabinoid türevidir (26).

Bitkinin THC içeriği bölgesel olarak değişiklik gösterdiği gibi, bazı türlerinde THC bileşimi %1'den az bulunmaktadır. Sakinleştirici, halüsinojenik, afrodizyak, uyutucu ve analjezik etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Keyif verici etkisi nedeniyle kullanımı çok yaygındır. Esrar, kek, kurabiye veya şeker gibi yiyeceklere karıştırılabildiği veya çay olarak demlenebildiği bildirilmektedir (121). Son dönemde elektronik sigara kullanımına bağlı acil polikliniklerde rastlanmış ileri akciğer rahatsızlığı ve ölüm olgularında yapılan incelemelerde hastanın biyolojik örneklerinde THC içeriğine rastlandığı bildirilmektedir (120).

Dünyada, çok eski tarihlerden bu yana yaygın olarak kullanılan bir uyuşturucu madde olan esrarın, her toplumda değişik adlarla anılan değişik fiziksel özellikte birçok çeşitlerinin bulunduğu görülmektedir. Dünyada en sık karşılaşılan yasadışı madde olan esrarın farklı bulunma şekilleri ve kullanım yöntemlerinin özellikle gençlerde çeşitli akıl sağlığı sorunları ile ilişkilendirildiği görülmektedir (31,32).

Kannabinoid türü bileşikler, bitkide kannabinoid asitleri olarak sentezlenir ve depolanır, ancak bitkisel ürün kurutulduğunda ve ısıtıldığında asitler Δ^9 -THC gibi türevlere dekarboksilasyon yolu ile yavaş yavaş dönüşmektedirler (122).



Şekil 7: Bitkide THC ve türevlerinin sentez gösterimi

Yine son dönemde güncel olan konulardan biri de “Skunk” bitkisidir. Skunk, genetiği değiştirilmiş bir Hint kenevir bitkisi olup farklı türlerin birbirleriyle çiftleştirilmesi sonucu elde edilmiştir ve etki derecesinin esrardan 20 kat daha fazla olduğu bildirilmektedir (TUBİM). İngiltere’de yıllardır iklim sebebiyle Hint keneviri üretilmemesinin, Skunk bitkisinin laboratuvarında geliştirilmesine sebep olduğu bildirilmektedir. İngiltere’de kokusundan dolayı kokarca olarak anılan "Skunk" yasa dışı madde türü, İngiltere’de uyuşturucu pazarının yüzde 80’ini oluşturmaktadır. Ülkemizde ise 2019 yılı verilerine göre 11 ton Skunk bitkisi ele geçirildiği bunun bir önceki yıla göre %530 artış olduğu kaydedilmiştir. Yeşil kokain diye adlandırılan bu türün, ülkemizde ilk defa 2014 yılında Çorlu’da yapılan bir baskında ele geçirildiği görülmektedir (40). Skunk esrar söz konusu olduğunda, kişide doz aşımı etkisinin görülme olasılığı çok yüksektir.

Esrar tütüne ya da tömbekiye karıştırılarak sigara veya nargile şeklinde içilebilir. Sıvı hali damara ya da deri altına enjekte edilebilir. Bitki materyali metil alkolde kaynatılır, süzülür ve

sonra haşış (kubar) yağı olarak bilinen kalın, yapışkan bir sıvı elde edilene kadar buharlaştırılır. Yüksek kaliteli haşış %50'den fazla THC içerebilir.



Şekil 8: Haşış, haşış yağı ve infüzyon tereyağ

Esrar, kanser hastalarının kullandığı terapötik ajanların advers etki olarak gösterdiği bulantı ve kusma gibi etkileri bertaraf etmede, glokomlu kişilerde göz içi basıncını düşürmede ve AIDS ve/veya kanser hastalarında iştah artırmak gibitedavi amaçlıda kullanılmaktadır.

2.3.1.2. Δ^9 -THC Absorbsiyonu, Dağılımı ve Eliminasyonu

Δ^9 -THC yüksek dağılım hacmine sahiptir ve başlıca lipoprotein olmak üzere %97-99'u plazmada proteine bağlı olarak bulunmaktadır. Kandaki THC konsantrasyonu, doku dağılımı, hepatik metabolizma, idrar ve fekal atılımın bir sonucu olarak sigara içildikten sonra hızla azalmaktadır. Δ^9 -THC kan-beyin bariyerini kolayca geçerek reseptörlerine (CB1 ve CB2) bağlanır, böylelikle merkezi sinir sistemi üzerinde etki oluşmasını sağlar. Δ^9 -THC vücuttan hızlı bir şekilde emilerek akciğer ve karaciğerde aktif metaboliti olan 11-hidroksi- Δ^9 -THC'ye dönüşmektedir. THC yüksek oranda lipofilik olduğundan, kalp, akciğerler, beyin ve karaciğer de dahil olmak üzere yüksek kan akışına sahip dokular tarafından hızla emilmektedir. Lipofilik (yağda çözünen) karakterinden dolayı emilimini takiben yağ dokuda birikir ve yavaş salınımla tekrar dolaşıma geçebilme özelliği bulunmaktadır. Bu nedenle vücuttan atılması oldukça yavaş olan kannabinoidlerin kandan temizlenmesi günler alabilir. Bu durum özellikle yağlı dokuya sahip kişilerin idrar taramasında, alımı takiben bir hafta sonraya kadar esrar kullanım öyküsünün ortaya çıkarılmasını sağlamaktadır.

Kannabinoid sistemi oluşturan kannabinoid reseptörler, endokannabinoidler ve endokannabinoid sentez ve inaktivasyonunda rol oynayan enzimler özellikle enterik sinir sisteminde başta olmak üzere tüm gastrointestinal kanalda yaygın olarak saptanmıştır. Yapılan çalışmalarla kannabinoid sistemin gastrointestinal kanalda birçok farmakolojik etkisi olduğu gösterilmiştir. Vücudun her yerinde bulunan kannabinoid reseptörleri, iştah, ağrı hissi, ruh hali ve hafıza gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde rol almaktadır. Esrarın psikoaktif bileşeni olan Δ^9 -tetrahidrokannabinol (THC), kimyasal olarak üretilen sentetik kannabinoidler ve insan ve hayvanlarda doğal olarak üretilen endokannabinoidler, kannabinoid reseptörlerine bağlanarak etki gösterirler. Kannabinoidler, beyinde aynı anda birden fazla kanal ve reseptör sistemi üzerinde etkili maddelerdir.

1988 yılında esrarın ana etken maddelerinden olan tetrahidrokannabinolün (THC) (14) sıçan beyinde bir bağlanma bölgesinin olduğunun keşfedilmesi ile başlayan araştırmalar (15), beyindeki muhtemel bir reseptör proteininin varlığını işaret etmiştir ve bunu takiben 1990'larda fare beyinde ilk kanabinoid reseptörü olan CB1 klonlanmıştır (16,17). Üç yıl sonra da bağışıklık sisteminde CB2 reseptörleri klonlanmıştır (18). Böylece tüm kannabinoid agonistlerin CB1 ve CB2 reseptörler üzerinden etki gösterdiği bulunmuştur. CB1 en fazla santral sinir sisteminde, CB2 daha çok bağışıklık sistem dokularında, bir diğer reseptör olan GPR55 ise merkezi sinir sisteminde ve ince barsakta bulunmaktadır (57).

İnsan vücudunda bu reseptörler üzerinden etki ederek memeli dokusunda endojenkannabinoid reseptörleri aktive eden anandamid ve 2-araşidonil gliserol gibi endokannabinoidler olduğu saptanmıştır. Lipid yapıdaki bu maddeler üretildikten hemen sonra hücrelerden salındıkları; CB1 ve CB2 reseptörleri aktive ederek biyolojik yanıt oluşturdıkları bilinmektedir. Kanabinoid reseptörler G-proteiniyle kenetlenmiş reseptör (GPCR) ailesi grubundandır (21). THC ve türevlerinin (kanabinoidler) birçok fizyolojik ve patofizyolojik süreçte önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (19,62).

İnsanda THC'nin farmakolojik etki üretmek için gereken minimum dozu 2 ile 22 mg arasında belirlenmiştir (53). Daha az kan akışı olan dokular THC'yi daha yavaş biriktirir ve daha uzun bir süre boyunca salınım ile vücutta serbest bırakırlar; kronik esrar kullanıcısının yağ dokuda depolanan esrarı günlerce kana yeniden bırakabildiği görülmüştür (52). THC'nin enterohepatik dolaşıma (karaciğer-barsak döngüsü) katılması, plazmadaki terminal yarılanma süresini uzattığı bilinmektedir.

Esrarın iştah açıcı bir etkiye sahip olduğu, kullanıcılarda esrar içtikten sonra çok miktarda yemek yeme isteği uyandırdığı bildirilmektedir. Bir kişi esrar sigarası içtiğinde, THC hızla akciğerlerden kan dolaşımına geçer. Kan kimyasal maddeyi beyne ve vücuttaki diğer organlara taşır. Kişi oral yolla aldığı zaman vücut THC'yi daha yavaş emer. Bu durumda, etkileri genellikle 30 dakika ile 1 saat sonra hissedilir.

- Biyoyararlanım

Biyoyararlanım terimi, verilen ilacın sistemik dolaşıma kimyasal değişikliğe uğramadan geçen kısmı olarak ifade edilmektedir. Her ne kadar kişiden kişiye farklılıklar olsa da, bir ilacın damar içine uygulanabiliyor olması, biyoyararlanımının yüzde 100 olduğunu ifade etmektedir. Bir etken maddenin sigara formunda içilmesi (~%25) veya oral yoldan (~%6) alınması, biyoyararlanımı azaltmaktadır (eksik emilim veya karaciğerdeki enzimler tarafından ilk geçiş metabolizması nedeniyle). Her maddenin olduğu gibi esrarın farmakokinetiği de uygulama yoluna göre değişiklik göstermektedir (70).

Ortalama 60 kilogram ağırlığına sahip bir birey için bir dozesrar alımı sonrası, maddenin yaklaşık %90'ı başlıca metabolitleri olarak, %65 civarı dışkı yolu ile ve %25'den fazlası idrar yolu ile atılmaktadır. Sigara olarak esrar alımına bağlı olarak ara sıra esrar içenlerde idrardaki saptama süreleri, iki ile beş gün arasında değişirken, kronik kullanıcılarda (her gün) bu süre bir haftaya kadar uzayabilmektedir (52).

- *Tolerans*

Tolerans, tekrarlayan ve sabit dozlarda bir etken maddeye/ilaca maruz kalındığında, o doza bağlı etkisinin zamanla azalmasına neden olan değişikliklere karşı vücudun geliştirdiği bir adaptasyon durumudur. Tolerans ve yoksunluk yasa dışı madde kullanımının açık belirtileridir. Eğer tolerans belirtileri ortaya çıkmaya başlarsa, tüketim olmadığı zaman yoksunlukla ilişkili semptomlar görülecektir. CB1 reseptörünün kronik aktivasyonu, reseptör duyarsızlaştırması ürettiğinde toleransla sonuçlanır (51).

Bazı kişilerde ise “ters tolerans” gözlenebilmektedir; yani kullanıldıkça zamanla daha güçlü etkiler de görülebilmektedir (123). Bu durum sadece esrara özgüdür ve son kez alımını takiben aylar sonra bile bazı dokularda tespit edilen THC'nin uzun bir yarı ömrü olması nedeniyle gelişebilir.

2.3.1.3. Δ^9 -THC'nin Metabolizması

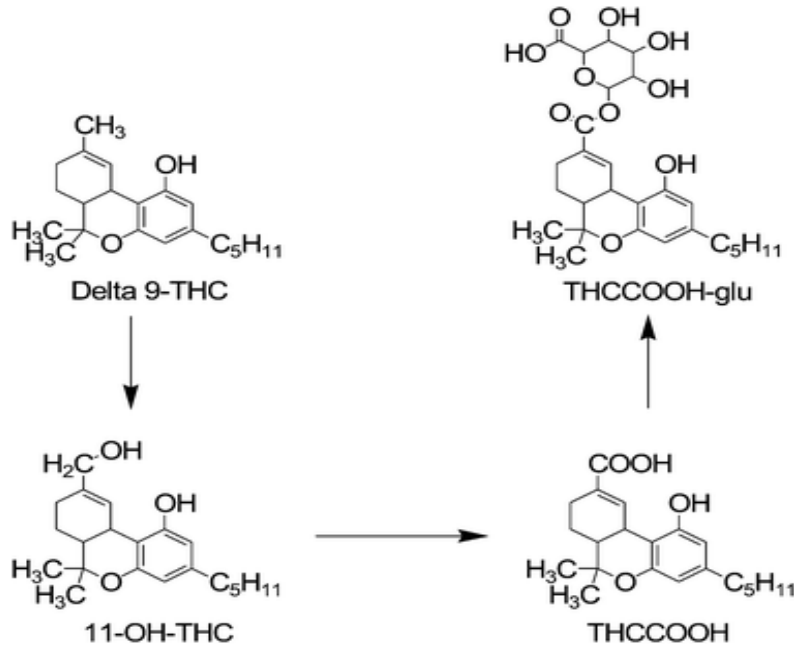
Esrar, dünyadaki en eski ve en çok istismar edilen yasa dışı maddelerden biridir ve kullanımı patolojik ve davranışsal toksisite ile ilişkilidir. Farmakokinetik süreçler dinamiktir, zamanla değişebilir, bu nedenle, kannabinoidfarmakokinetiğini ve kannabinoidlerin biyolojik sıvılara ve dokulara geçişini anlamak adli toksikolojide oldukça önemlidir. Tedavi edici bir ilacın farmakokinetiğini anlamak, farmakodinamik etkilerinin başlangıcını, büyüklüğünü ve süresini anlamak, terapötik etkisini en üst düzeye çıkarmak ve olumsuz advers etkileri en aza indirmek için gereklidir.

Kannabinoid farmakokinetiği sırasıyla şu basamakları kapsamaktadır; farklı formülasyonlarda ve farklı alım yolu sonrası emilimini, vücuttaki dağılımını ve karaciğer ve ekstra hepatic dokulardan metabolizasyonu sonrası dışkı, idrar, ter, oral sıvı ve saç yolu ile eliminasyonu.

THC metabolizması çoğunlukla karaciğerde gerçekleşir ve uygulama yoluna bağlı olarak farklı metabolitler baskınlık gösterebilir. En önemli metabolitleri kendisi gibi psikoaktif

özelliğ gösteren kannabinol (CBN) ve psikoaktif özelliği olmayan kannabidiol (CBD)'dür. THC karaciğerde hepatiksitokrom P450, oksidazlar 2C9, 2C19 ve 3A4 enzimleri tarafından başlıca metabolitleri 11-OH-THC, THC-COOH ve glukuronid konjugatlarına metabolize olmaktadır. Esrar türevleri içinde metabolizasyon sırasında halka açılması ile sonuçlanmış bir bileşik varsa, bunların psikoaktif özelliği kaybolmaktadır. Dolayısıyla CBD metabolitinin psikoaktif özelliği yoktur. Aksine, bileşiğin gün geçtikçe tıbbi anlamda tedavi edici özellikleri keşfedilmektedir (130).

Yapılan araştırmalar, kısmi bir agonist olarak Δ^9 -THC'nin, CB1 afinitesinde anandamide benzediğini, CB2 reseptörlerinde in vitro olarak CB1 reseptörlerine göre daha düşük etkinlik sergilediğini göstermiştir (33). CB1 reseptörleri esas olarak beyinde bulunur, ancak periferik sinir sistemi, karaciğer, tiroid, uterus, kemikler ve testis dokusuna da yayılmışlardır (34-36). CB2 reseptörleri ise çoğunlukla bağışıklık sistemi hücrelerinde, dalakta, mide bağırsak sisteminde ve kısmen beyin ve periferik sinir sisteminde bulunurlar (38,36). CB1 ve CB2 reseptörlerinin her ikisine birden sadece insan plasentasında rastlanmaktadır(37).



Şekil 9: Δ^9 -THC'nin metabolizasyonu

2.3.1.4. Δ^9 -THCToksisitesi

Esrar kullanımına bağlı zehirlenmelerde, diğer yasa dışı madde zehirlenmelerinde olduğu gibi kişinin metabolizması ve aldığı doz gibi bireysel farklılıkların önemli olduğu bilinmektedir (132). Esrara bağlı zehirlenmelerde en yaygın gözlenen belirtiler arasında aşırı ağız kuruluğu, renkleri canlı ve hareketli görme gibi yanılsamalar, gülme krizleri, zaman-mekan algısının yitirilmesi ve bellek kaybı gibi sanrılara bağlı çeşitli olumsuzluklar görülebilmektedir.

İlk dozun ardından oluşan etkileri arasında ise; göz bebeklerinde büyüme ve kızarma, ağızda kuruluk, kalp atışlarında hızlanma ve tansiyonda değişiklikler, yer ve zaman algısında bozulma, sersemlik, panik hali, aşırı gülme, sürekli konuşma isteği, kuşkuculuk, hayal görme, var olmayan sesler duyma, korku ve kaygı hissi gibi duygu durum bozuklukları görülmektedir (52).

Esrar alındıktan sonra görülen fizyolojik belirtiler, alınan maddenin dozuna, maddenin saflık durumuna, maruziyet süresine ve bireysel varyasyona bağlı değiştiğinden esrara bağlı olarak ortaya çıkan fizyolojik belirtilerin de farklılık göstermesi beklenecektir. Kullanıma bağlı ölüm görülmeyen ve illegal madde grubunda en sık ortaya çıkan esrar maddesinin, fiziksel bağımlılık yapmadığı ancak uzun süre kullanımda solunum ve malignite riskleri ortaya çıkardığı bildirilmektedir.

Psikoaktif etkiler elde etmek için rekreasyonel esrar alımı genellikle olumsuz etkilere neden olabilir, çünkü esrar kullanıcısı tarafından istenen etkiye ulaşan dozlar ve zararlı etkileri arasında gerekalm yöntemini gerekse yüzde içeriği farklı olduğundan net bir sınır yoktur.

Ergenlerde ve yetişkinlerde, solunum yolu ile alınan 2 ile 3 mg delta-9 tetrahidrokannabinol (THC) veya oral olarak 5 ile 20 mg aralığında alınan dozda, dikkat, konsantrasyon, kısa süreli hafıza ve yürütücü işlev bozukluğu bildirilmektedir (63, 70, 73, 103-116). Bulantı, postural hipotansiyon, deliryum, panik atak, anksiyete ve miyoklonik sarsıntı da dahil olmak üzere 7.5

mg/m² THC'den yüksek dozlarda daha ciddi advers etkiler görülmektedir (111, 112). Çok daha yüksek konsantre esrar ürünlerinin kullanımı, psikoz ile de ilişkilendirilmiştir (117, 118).

Çocuklarda THC'ye bağlı toksisitenin çoğunlukla yüksek konsantrasyonlu bir gıda ürünü (8,9,50-55) veya haşhaş reçinesinin (56) oral alımından sonra bildirildiği görülmektedir.

Pediatride 5 ile 300 mg arasında tahmin edilen oral dozlar, hafif uyku hali, ataksi, duyu durum değişiklikleri, ekstremitelerin aşırı ve amaçsız motor aktivitesi (hiperkinezi), koma ve solunum depresyonu gibi daha şiddetli zehirlenmeyle ilişkilendirilmiş çok çeşitli semptomlar rapor edilmiştir. Örneğin, oral alım sonrası THC zehirlenmesi için acil servise başvuran 38 çocuktan oluşan bir olgu sunumunda, derecesine göre semptomların hangi doza karşılık geldiği bildirilmiştir. Buna göre kilogram başına 3.2 mg gibi bir THC alımına bağlı sadece gözlem ve minimum tıbbi müdahale ile tedavi altına alındığını, diğerlerinde kilogram başına 7.2 mg dozda THC alımında hastaların yatarak tedavi altına alındığı ve orta dereceli tıbbi müdahale ile kontrol altına alındığı, son olarak da kilogram başına 13 mg THC dozuna karşılık ise hastaların yoğun bakım ünitesinde ciddi tıbbi müdahalelerle iyileştirildiği bildirilmiştir (57). Hastalar arasında ilk defa THC maruziyeti olanlarda daha sık uyuşukluk veya uyku hali gözlemlendiği ve klinik semptomların uzun süre gözlemlendiği bildirilmiştir. Benzer şekilde, konsantre haşhaş reçinesi Fransa'da daha yaygın hale geldiğinden, bebekler ve küçük çocuklar arasında yıllık hastane başvurularında ciddi artış meydana geldiği bildirilmiştir (56).

Kronik kullanımda azalma veya ani kesilme, orta dereceli yoksunluk sendromuna yol açtığı bildirilmekle birlikte, endişe hali, huzursuzluk, titreme, aşırı sinirlilik, iştahta azalma, kilo kaybı, uykusuzluk, terleme, migren tarzı baş ağrısı gibi belirtiler görüldüğü rapor edilmiştir.

Ortalama bir insanda yaklaşık 20 mg THC dozunun inhalasyon yolu ile alımına bağlı pik plazma seviyesi 10 ng/mL olarak tespit edilmiştir (53).

THC'nin toksikdoz aralığı, 5 mg/m² oral THC alımı hafif derecede merkezi sinir sistemi semptomları ile tolere edilebilir iken 15 mg/m³ oral THC alımı ile daha ciddi merkezi sinir sistemi semptomları görülebilmektedir. İnsanda tahmini THC letal dozunun kilogramda 30 mg olarak belirtilse de, belirgin şekilde THC'nin toksik veya lethal dozunu belirlemek, maddenin saflık derecesi ve alım yoluna bağlı olduğundan oldukça zordur.

Yine de Merck İndekse göre, THC'nin bireylerin % 50'sinin ölümüne neden olan doz (LD₅₀) susam yağının içinde hazırlanarak oral yolla erkek ratlarda kilogramda 1270 mg , dişi ratlar için 730 mg olduğu belirlenmiştir. İnhalasyonla alımda ise kilogram başına 42 mg ölümcül doz olarak belirlenmektedir (58).

2.3.1.5. Kronik Δ^9 -THC Zehirlenmesi

Bilindiği gibi bir kimyasal maddeye maruz kalma şekli toksisiteyi etkiler. Maruz kalma şekli, maruz kalma sıklığı, zamanı ve süresi, maruziyette maddenin organizmaya giriş yolu, veriliş şekli ile toksisite yakından ilgilidir. Dolayısıyla, uzun süreli ve yoğun esrar kullanımı, kişide çok ciddi fiziksel ve ruhsal hastalıklara yol açabilmektedir. Öğrenmede güçlük ve hafızada ciddi hasarlara yol açtığı görüldüğü gibi, çeşitli odaklanma problemleri ve reflekslerde ciddi deformasyonlar, uyku ve iştah bozukluklarının da kalıcı ruhsal hastalıkları tetiklediği (özellikle şizofreni görülme riskinin 7 kat arttığı belirlenmiştir) öksürük, göğüs ağrısı gibi ciddi akciğer enfeksiyonları, ayrıca doğurganlığın azalması, hamilelik dönemi anomalileri ve düşük yapma riskinde artış; fetüste gelişim geriliği, erkek kullanıcılarda ise testosteron hormonu salınımında azalma, göğüslerde büyüme ve buna bağlı sperm sayısında azalma görüldüğü bildirilmektedir (131).

Yapılan araştırmalar, 10'lu yaşlarda esrar kullanmaya başlayan ve devam eden esrar kullanım bozukluğu olan kişilerin 13-38 yaşları arasında ortalama 8 puan kadar IQ'da azalma olduğunu göstermiştir (27). Düzenli, uzun süreli esrar kullanımı bazı kişilerde "Kannabinoid

Hiperemezis Sendromu” gelişmesine yol açabilir. Kullanıcıların düzenli olarak şiddetli bulantı, kusma ve dehidrasyon döngüleri yaşamasına neden olduğu da bildirilmektedir(28).

2.4. Kromatografi

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Çeşitli maddelerin hareketli faz yardımıyla, sabit faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri esasına dayanır. Mikhail Tsvet, 1900 yılında bitki pigmentleri üzerine yaptığı araştırmalar sırasında kromatografiyi icat etmiş, ‘kromatografi’ terimini ise ilk kez 1906’da yayınlanan bir makalesinde kullanmıştır.

Ayrılma mekanizmalarına (adsorbsiyon, jel filtrasyon...vb.), uygulama biçimine (düzlemsel, kolon), faza (sıvı, gaz) göre kromatografi tipleri gruplandırılmaktadır.

2.4.1. Sıvı kromatografisi (Liquid Chromatography - LC)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) bir sıvıda çözülmüş bileşenlerin, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile değişik etkileşimlere girmesi, kolon içinde değişik hızlarla hareket etmeleri sonucu, farklı zamanlarda bileşenlerin kolonu terk ederek birbirlerinden ayrılması temeline dayanır.

İyi bir ayırım sağlanarak kolondan çıkan maddelerin tek tek tanımlanması amacıyla kalitatif ve kantitatif analizlerin yapılabilmesi için farklı dedektörler kullanılmaktadır. Kütle spektrometresi atom veya molekülleri iyonlaştırarak, oluşan iyonları kütle-yük (m/z) oranına göre sıralayan analitik bir tekniktir. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS), oldukça karmaşık karışımlarda bile analit veya analitlerin ayrılmasını ve ölçülmesini sağlayan iki seçici tekniğin birleşimidir. LC; bileşikleri fiziko-kimyasal özelliklerine ve farklı tutunma kapasitelerine göre birbirinden ayırırken, MS; bileşikleri ayrı ayrı kütle / yük oranlarına göre parçalar ve elde edilen parmak izi niteliğindeki kütle spektrumu bileşiği tanımlamayı

sağlamaktadır. Bu iki seçiciliğin bir araya gelmesi LC-MS 'i güçlü bir analitik yöntem haline getirmiştir (76).

Sıvı kromatografisi, bir kütle spektrometreye az uçucu bileşikler için örnek verme işleminde uygulanan tekniklerden biridir. Kompleks karışımlar önce sıvı kromatografisi ile ayrılır, her bir bileşenin tanımlanması ve miktarlarının saptanması için kütle spektrometresine verilir. Kütle spektrometresi ile çalışmalarda sistemin vakum altına tutulması gerekir; bunun temel nedeni ortalama serbest yolu yükseltmektir. LC-MS sistemlerini birbirine bağlamak için, çeşitli arayüzler kullanılmaktadır. LC-MS için en yaygın kullanılan arayüzlerden biri elektrosprey iyonizasyondur (ESI). Elektrosprey iyonizasyon, polar ve uçucu olmayan bileşikler için ideal bir iyonizasyon yöntemidir. Örnek kromatografi kolonundan çıktıktan sonra, kütle spektrometrenin girişinde bulunan bir transfer hattından geçer ve ESI ile iyonlaştırılır, fragmanlara (parçacıklar) ayrılır. Bu yöntemin avantajı büyük ve ısı ile kolayca parçalanmış maddelerin mol kütlelerinin belirlenebilmesidir.

Çeşitli kütle spektrometreleri arasındaki temel farklılık, iyonları ayırma sistemleridir.

Yaygın kullanılma sebepleri duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozulabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. Teknik oldukça yüksek ayırım sağladığı gibi, oluşturulan kütüphanesi ile de yüksek tanımlama sağlamaktadır. Mobil fazın yüksek basınçla ilerlemesi sağlandığı için de Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi olarak da adlandırılır. HPLC ünitesi; degazör, pompa, oto örnekleyici, kolon ve dedektör kısımlarından oluşmaktadır.

Mobil Faz: Analiti taşıyan hareketli fazdır, genellikle su ve sulu tampon çözeltiler, bunların metanol ve/veya asetonitril ile oluşturulan çözeltileri veya organik çözücülerden oluşur. Bileşimi ve pH değeri ayırımı direkt etkiler, kullanılan tekniğe, numune tipi ve kolona göre mobil faz seçilmelidir.

Degazör: Mobil fazdaki hava kabarcıklarının ve çözünmüş havanın giderilmesini sağlar, kullanılan mobil faz adedi ve pompa tiplerine göre uygun degazörler bulunmaktadır.

Pompa: Degazörden mobil fazı çekip, örnekleme ve kolon ünitesine gönderir, bu işlemi akış hızını ve basınç değerini ayarlayarak gerçekleştirir.

Oto örnekleiyici: Analitlerin kolon ve detektöre gönderilmesini sağlar. Bazı ünitelerde soğutma, ısıtma, seyreltme ve karıştırma özellikleri vardır. 10 vialden 1000 vial kadar değişik kapasitede olanları bulunabilir. Oto örnekleiyiciye numune verirken en önemli konu numunenin temiz olmasıdır, aksi halde sistme çabuk kirlenir veya tıkanır.

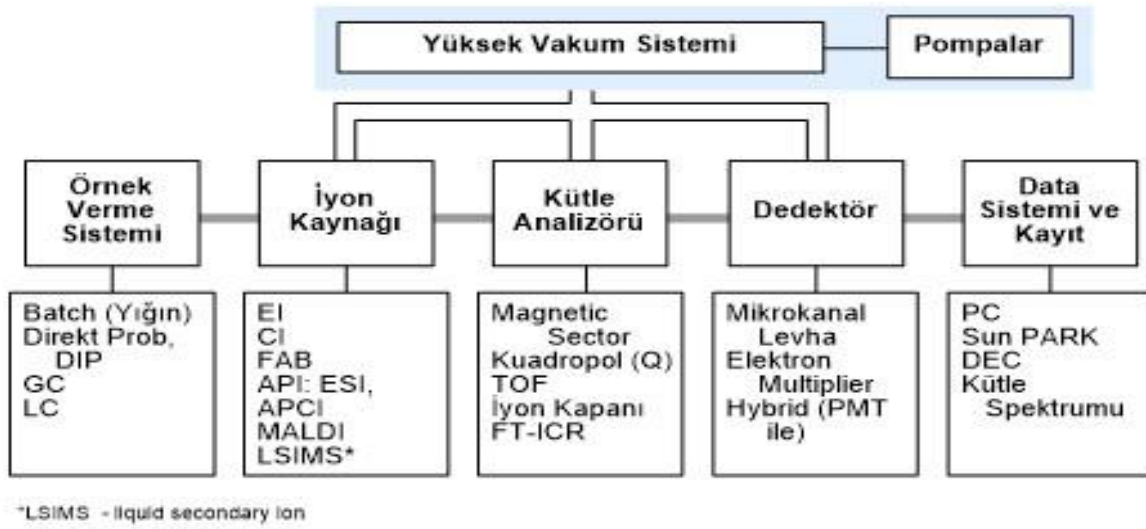
Kolon- Kolon Fırını: Kolon (sabit faz) maddelerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden yararlanarak birbirlerinden ayırt edilmesini sağlar. Genellikle çelik, PEEK (polietereterketon plastiği) ve camdan imal edilir, içi belli ölçülerde sabit fazla doldurulur (silika veya polimer gibi). Kolon Fırını kolonu saklamak ve sabit sıcaklıkta tutmak için kullanılır. Blok ısıtıcılı, kaçak sensörlü, multi kolon teknoloji, fanlı ve Peltier kolon fırınları mevcuttur.

LC-MS'in (HPLC-MS) diğer yöntemlere tercih edilmesinin en önemli sebeplerinden biri, geniş bir aralıktaki bileşikler analiz edebilmesidir. Polar ve termal olarak kararsız / yüksek moleküler kütleli analitleri, özellikle türevlendirilmeden analiz edilebilme imkanı sağlamaktadır. Kütle analizörlerini seri bağlayarak MS'nin gücü önemli ölçüde artırılabilmiştir (137).

2.4.1.1. Ardışık (Tandem) Kütle Spektrometresi - (MS)ⁿ

Kütle spektrometresi, analiz örneğinin buharlaştırılması, iyonlaştırılması ve oluşan iyonların kütle/yük (m/z) değerlerine göre ayrılarak kaydedilmesi işlemleri için geliştirilmiş bir cihazdır. Gaz haline dönüştürülmüş bir kimyasal madde, moleküller arasındaki çarpışmaların minimum olacağı bir basınçta, sıcak bir tungsten veya renyum flamandan yayılan elektron (e^-) demeti ile bombardıman edilir. Elektronların enerjisi bileşiğin iyonizasyon potansiyeline kadar

yükseltirirse, molekülden $1 e^-$ ayrılması sonucunda pozitif tanecikler serisi meydana gelir. Madde moleküllerini bombardıman eden elektronların enerjisi artırılırsa, moleküler iyon daha ileri parçalanmalara uğrar, oluşan üniteler fragman olarak nitelenir. Değişik kütlelerdeki iyon akımlarının konsantrasyonla olan ilişkisinden yararlanılarak kütle spektrumu elde edilir. İyonların bağıl miktarlarının (kütle/yük) oranlarına göre çizilmiş grafiğine kütle spektrumu denir.



Şekil 10: Bir kütle spektrometrenin diyagram görünümü

- Manyetik alanlı spektrometreler:

Tek odaklı spektrometre: Yalnızca manyetik alan içerirler.

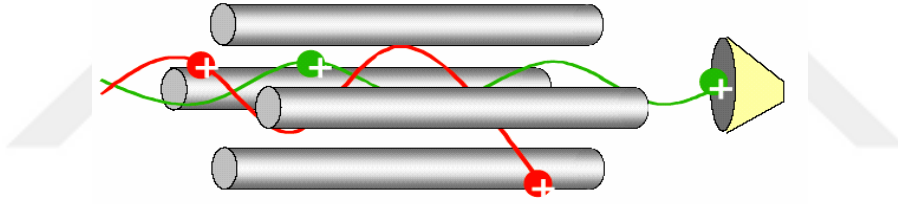
Çift odaklı spektrometre: Manyetik alan ve elektriksel alan içerirler.

- Kuadropol kütle spektrometresi
- Uçuş zamanlı spektrometre: İyonların ayrılması için değişik kütleli iyonların aynı gerilimle hızlandırıldıkları zaman aynı sürede değişik hızlar kazanmaları özelliğinden yararlanır.

- İyon-Siklotron Rezonansı spektrometreleri: iyonlar bir iyon-siklotron hücresine alınarak, düzgün bir manyetik alanda, dairesel yol izleyen iyon demetine sabit bir rf gerilimi (77-770 kHz) uygulanır.

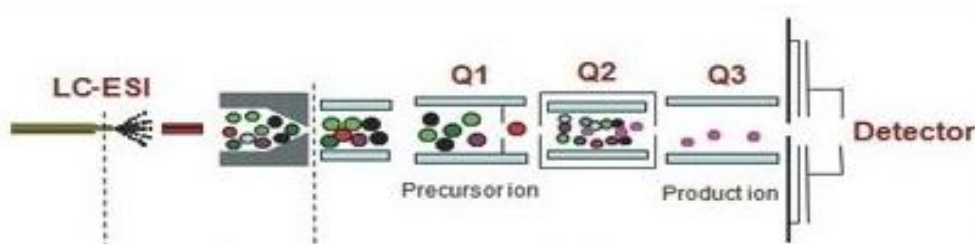
Kuadrupol kütle spektrometresi

Yüksek ayırma sahiptir. Dört kutuplu (kuadrupol) analizörler İyon demeti yoluna paralel yerleştirilmiş dört silindirik çubuktan oluşur; karşılıklı çubuklar aynı polaritede, komşu çubuklar zıt polaritededir. Her bir çubuğa doğru akım ve radyo frekansı (rf) gerilimi uygulanır. Ayırma borusuna küçük bir yarıktan giren iyonlar arasında ancak belli bir m/e değerinde olanlar, sabit bir doğru akımda veya rf (radyo frekansı) geriliminde çubuklar arasından geçerek dedektöre ulaşırlar. Spektrum doğru akım gerilimini veya rf gerilimini değiştirerek kaydedilir.



Şekil 11:Kuadrupol analizör

LC-MS/MS sistemleri iki tarama kuadrupolü (Q1 ve Q3) ve bir adet parçalanma hücresinden (Q2) oluşmaktadır. Hedef iyon ilk kuadrupol tarafından seçilerek parçalanmasını indüklemek için inert gaz dolu ikinci hücreye gönderilir. Q1'den geçen iyon, prekürsör iyon olarak adlandırılır. Parçalanmış iyonlar ayırmak ve dedekte edilmek üzere üçüncü kuadrupole yollanırlar.



Şekil 12: Ardışık Kütle Spektrometresi

Ardışık kütle spektrometrik teknikler, bileşiğin yapısının tanımlanması ve seçici bileşik veya bileşik sınıfı analizlerinde, ayrıca iyon-molekül reaksiyonlarının analitik kullanımı ve çalışmasında kütle spektrometresinin (MS) gücünü yüksek oranda arttırmıştır (85).

Aynı zamanda, ardışık kütle spektrometresinin sıvı kromatografi ile kombine edilmesi, LC'nin zayıf kromatografik kapasitesini telafi etmiştir (84).

2.4.2. Adli toksikolojide LC-MS/MSuygulama alanları

Gerek klinik gerekse adli toksikolojide; kan, plazma, serum veya saç gibi insan biyolojik örneklerinde bir kimyasal maddenin kalitatif ve kantitatif şekilde analiz edilebilmesi için doğruluğu ispat edilmiş analitik prosedürlere ihtiyaç vardır. Çünkü tek bir ekstrenin cihaza enjeksiyonu ile adli toksikolojiyi ilgilendiren tüm bileşiklerin bir kerede analizi sağlanamaz.

Modern LC-MS/MS (Tandem Kütle Spektrumu) kullanılarak gerçekleşen ölçüm yöntemleri, özellikle klinik ve adli toksikolojide sistematik toksikolojik analizin (STA) bir parçası olarak genel bilinmeyen bileşikleri tarama (screening) uygulamaları için yeni olanaklar yaratmıştır.

Bu yöntem özellikle gün geçtikçe sayısı artan yeni nesil psikoaktif maddelerin analizinde de sıklıkla kullanılmakta olduğu görülmektedir. Hassasiyetisayesinde son güncel çalışmalarda olay yerinde ele geçirilen kurumuş kan lekesi matrisinden yasa dışı madde belirlemede kullanıldığı görülmektedir (88).

Her ne kadar diğer bir tamamlayıcı kromatografi yöntemi olan Gaz kromatografisi (GC) yüksek ayırma gücü sunmasıve buna bağlı elektron iyonizasyonlu kütle spektrometrisinin (MS) yüksek seçiciliği ve kütüphane oluşturmadaki kabiliyeti GC-MS'i adli toksikolojide farklı bir yere taşısa da, bazı sınırlamaları bulunmaktadır. Bunlardan biri, hidrofilik yapıdaki veya ısı ile kolayca bozunan veya uçucu olmayan analitlerin, bu teknikle zor analiz edilmesidir. Mecbur kalındığında farklı derivatizasyon teknikleri uygulanma yolu ile bu tür maddeler yine de GC-MS ile analiz edilebilmektedir. Sıvı kromatografinin (LC), MS veya

ardışık MS (MS-MS) ile birleştirilmesi, bu boşluğun doldurulmasına yardımcı olmuştur. LC-MS/MS, daha yaygın olarak benimsenen GC-MS/MS tabanlı teknikler kullanılarak analiz edilmesi zor konsantrasyonlarda ilaçların ve metabolitlerin saptanmasına izin verdiği için klinik ve adli toksikolojideki çalışmalara farklı bir ivme kazandırmıştır. Bu tekniğin avantajları arasında yüksek özgüllük, hassasiyet ve verim bulunmaktadır.

Kromatografik çalışma süresinin kısa olması ve zaman alıcı türevlendirme adımlarına gerek olmaması, LC-MS/MS'i biyolojik numunelerde çok sayıda maddenin yüksek verimli doğrulaması için tercih edilen bir teknik haline getirmiştir (91).

İşyerinde çalışanlar arasında ilaç/uyuşturucu tarama testlerinin yapılması, adli toksikolojinin köklü bir uygulamasıdır ve madde etkisi altındaki kişilerin neden olduğu işyeri kazalarını azaltmayı amaçlamaktadır. Çeşitli matrislerde çeşitli madde gruplarının belirlenmesiyle, kötüye kullanılan bileşiklerin belirlenmesi, işyeri analizleri için LC-MS kullanımını önemli hale getirmiştir (87). LC/MS'e dayanan tekniklerin, işyerinde uygulanabilirliği ile kronik alkol tüketiminin biyobelirteçlerinin belirlenmesinde de yararlı olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalarda, türevlendirme prosedürlerine ihtiyaç duyulmadan özellikle saç ve idrar örneklerinde etil sülfat ve etil glukuronid belirlenebilmiştir (89, 90).

Kütle spektrometresi (MS) tekniğinin seçiciliği yüksek olmasına karşın LC/MS ile tek başına analiz edilecek maddeyi aynı matris içinde bulunan diğer moleküllerden ayırması oldukça güçtür. MS tekniği maddeleri m/z (kütle/yük) oranlarına göre ayırmak üzere dizayn edilmiş bir sistemdir, ayırmaya yardımcı olan sıvı kromatografisi (LC) sistemi ile kombine edildiğinde (LC-MS), her iki sistemin ayırt edici özellikleri birleştirilerek Sıvı kromatografi/Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) sistemi dizayn edilmiş ve kullanılmaya başlanmıştır. Sistem hassasiyet, hız ve seçicilik gibi özellikleri nedeniyle son dönemlerde sıklıkla tercih edilmektedir.

Maddelerin ve metabolitlerinin belirlenmesi ve biyolojik sıvılarda tespiti için yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda GC-MS/MS ve LC-MS/MS sistemler kullanılmaktadır. Bu çalışmaların tamamına yakınında uygun belirlenebilme limitleri, kolaylığı, türevlendirme gerektirmemesi, analiz maliyetinin düşüklüğü ve analiz süresinin kısalığı gibi avantajları nedeniyle LC-MS/MS tercih edilmiştir.

Saenz ve ark. yaptığı 2017 yılındaki bir çalışmada kan, idrar, göz içi sıvısı, karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, kas, beyin, kalp ve safra gibi postmortem örneklerde kannabinoidlerin yeniden dağılımının yorumlanması için kannabinoidlerin kalitatif ve kantitatif analizi bir LC-MS / MS yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Tüm matrislerde bu yöntemle elde edilen belirleme limiti (LOD) 1 ng/mL gibi düşük bir seviyede ölçülmüştür (84).

Shokry ve ark.'nın 2017 yılında gerçekleştirdiği kulak kirinde (serumen) çeşitli madde gruplarının araştırıldığı öncü bir çalışmada, klozapin, karbamazepin, lamotrijin, klonazepam, fenitoin ve fenobarbital vb. dahil olmak üzere 12 nöropsikotik ilacın metanol ile ekstraksiyondan sonra LC-MS / MS ile başarılı şekilde analiz edildiği bildirilmiştir (126).

Kan, idrar, saç, tırnak, mekonyum, kulak kiri ve oral sıvılar da dahil olmak üzere çeşitli biyolojik matrislerde ilaçların tespiti için sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) ile metod validasyonları da son dönemde öne çıkmaktadır (135,136).

İlaçla kolaylaştırılmış suçların konu edildiği bir çalışmada, akut zehirlenmesi olan 22 hastanın kan örnekleri toksikolojik tarama için LC-MS/MS ile analiz edilmiştir. Örneklerde belirlenen ilaç etken madde ve olgu sayısı şu şekilde belirlenmiştir; 22 olguda lorazepam, 12 olguda midazolam; 3 olguda diazepam ve 6 olguda nordiazepam bulunmuştur (92).

Doping kontrolünde, spordaki performansını arttırmak için kullanılacak bir grup peptid, Dünya Anti-Doping Ajansı (WADA) tarafından yasaklanmış listeye dahil edilmiştir. Büyüme hormonu salgılayan peptitler (GHRP'ler), gonadotropin salgılatıcı hormonlar (GnRH'ler), vazopressin analogları ve büyüme hormonu salgılatıcı reseptörlerin (GHSR'ler) agonistleri,

performans arttırmak için kullanılan bileşiklerin bilinen başlıcalarıdır. 2016 yılında gerçekleşen iki farklı çalışma ile idrarda GHRP'ler ve desmopressin gibi biyoaktif peptitlerin LC-MS/MS ile analizinin kolaylıkla gerçekleştirildiği bildirilmektedir. Özellikle insan plazmasında dört farklı GHRH ve ilgili metabolitleri LC-MS/MS ile belirleme limitleri ortalama 50pg/mL olarak saptanmıştır (93, 94).

Analitik toksikolojide yöntemin seçimi, çözülmesi gereken sorunlara bağlıdır. Adli toksikolojide belirlenmesi gereken bileşikler çoğunlukla bilinmemektedir. Bu nedenle, miktar tayininden önce ilk adım, olası şüpheli bileşiği (ilaç veya zehir) taramak ve tanımlamaktır.

2.4.3. BOS analizlerinde LC/MS-MS kullanımı ve önemi

LC-MS/MS ile beyin omurilik sıvısında (BOS) biyoterapötik ajanların kantitatif analizi yaygın bir durumdur. Özellikle daha yüksek hassasiyete yönelik yöntem geliştirme ihtiyacını da beraberinde getirmiştir.

Klinik çalışmalarda birçok proteomik tabanlı çalışma ile BOS'tasıvı kromatografi-kütle spektrometrisi (LC-MS) yönteminin uygulandığı görülmektedir. Örneğin bu yöntem, sağlıklı bireyler ile Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalık taşıyıcısı kişilerin proteomlarındaki farklılıkları ortaya çıkarmak ve böylece erken tanıya fayda sağlaması için nicel diferansiyel profillemeye karşımıza çıkmaktadır (96).

Irie ve ark. tarafından 2019 yılında gerçekleştirilen başka bir klinik çalışmada, insan plazma ve BOS örneklerinde "osimertinibin" belirlenmesi ve farmakokinetik davranışının değerlendirilmesi için kantitatif bir LC-MS/MS yöntemi kullanılmıştır (97).

Bazı çalışmalarda ticari olarak tedarik edilebilen BOS için Sertifikalı Referans Standartlar ile LC-MS/MS yöntemi ile analitik çalışmalar yapıldığı, özellikle erken dönem Alzheimer hastalığının belirlenmesinde farklı türde peptidlerin analiz edildiği görülmektedir(86).

Diğer taraftan, postmortem toksikolojide önemli bir biyolojik örnek olan BOS, alternatif bir matris olarak ölüm nedeninin belirlenmesinde diğer biyolojik sıvılardaki ölçümleri tamamlayıcı rol üstlenmekte, hatta birbirleri ile kıyaslama sunarak yüksek hassasiyete sahip GC-MS ve LC-MS yöntemler sayesinde adalet hizmete sağlanmaktadır. Antemortem olgularda, kan, idrar gibi biyolojik örnekler nazaran daha az miktarda elde edilmesi ve düşük konsantrasyonlarda ilaç etken maddesi içermesi sebebiyle, BOS analizlerinde tandem kütle spektrumları gibi gelişmiş sistemlerin kullanılması önemlidir.

Özellikle eroin kullanımına bağlı 29 ölümlü olguda 1999 yılında GC-MS ile yapılan bir çalışmada, idrarlarında, göz içi sıvılarında ve beyin omurilik sıvılarında 6-asetilmorfin belirlenmiş ve bulunan değerler birbiri ile karşılaştırılmıştır. 6-AM için BOS ve göz içi sıvısı analizinin, idrar testinin negatif olduğu durumlarda bile pozitif sonuçlar verebildiği rapor edilmektedir (10).

Başka bir GC/MS ile gerçekleşen postmortem çalışmada, olguların kan ve perikardiyal sıvı örneklerinde belirlenen konsantrasyonların, BOS'ta belirlenen konsantrasyonlarla kıyaslandığı görülmektedir. Çalışmada toplamda 103 olguda toksikolojik veriler gözden geçirilmiştir. Bu çalışma ile de çeşitli narkotiklerin BOS, kan ve perikard sıvısı konsantrasyonları arasında oldukça anlamlı bir korelasyon bulunduğu bildirilmektedir (3).

MSS'yi etkileyen maddeler/ilaçların farklı konsantrasyonlarda BOS örneğinde bulunabileceğini gösteren bir dizi çalışma yapıldığı görülmektedir (1,3,10,13).

BOS örneği de kullanılarak aydınlatılan bir çocuk ölüm olgusunda, fethi kabir yapılarak ölümünden 8 ay sonra otopsi yapılan (çinko tabutla gömülü olan) bir aylık kız bebeğinin, BOS ($\mu\text{g/ml}$) ve karaciğer ($\mu\text{g/g}$) örneklerinde Amitriptilin ve Nortriptilin miktarlarının sırasıyla 4,4; 0,6 ($\mu\text{g/ml}$), 29,8; 3,6 ($\mu\text{g/g}$) bulunduğu bildirilmektedir (55).

Standart bir yapay BOS (yBOS), kör (blank) örnek olarak gerçek BOS sıvısı almak adına birkaç hayvandan fedakarlık etmeden BOS matrisinde belli başlı bileşikler için hassas LC-MS

yöntemleri geliştirmek için bir vekil matris olarak gereklidir (98). Bir yBOS, metodoloji gereği uygulanan tüm prosedür adımlarına maruz kaldığında ekstraksiyon verimliliği açısından gerçek BOS örneği ile aynı şekilde davranmalıdır. Ek olarak, analitlerin yüzeylere spesifik olmayan bir şekilde bağlanmasının önlenmesini de taklit etmelidir (99,134).

Son olarak, kararlı bir izotop etiketli (SIL) iç standart (ISTD) kullanımı bunu bir dereceye kadar düzeltebilirse de, LC-MS/MS iyon supresyonu hesaba katılmalıdır. Kısacası, bir yBOS, numune hazırlama ve analizinin tüm aşamalarını gerçek BOS ile aynı derecede etkilemelidir.

Yukarıdaki çalışmalardan da anlaşılacağı üzere, BOS'un adli toksikolojide kanın alternatifi olduğu kadar farmako-/toksikokinetik ve postmortem yeniden dağılımların araştırılmasında da yararlı olacağı görülmektedir (3).

BOS'ta ilaçların analizinde ve analitik bulguların yorumlanmasında gerçek BOS örnekleri ile validasyon çalışmasının yapılmasındaki zorluklar kullanımını sınırlamışsa da, bu alanda yeni çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bir gerçektir. Yapay BOS örneğinin hızlı bir şekilde Adli Toksikoloji'ye kazandırılması ile zorlukların aşılacağı öngörülmektedir.

2.5. Analitik Yöntemlerin Geçerliliği (Validasyonu)

Validasyon, geçerli kılma, cihazın, metodun veya ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğunun objektif olarak test edilerek yazılı delillerle kanıtlanmasıdır. Analitik metod validasyonu, bir metodun performansını belirlemek için yapılan bir takım değişkenlere göre test ve ölçme işlemleridir. Doğru karar verebilmek için analitik ölçüm sonucunun doğru ve tekrarlanabilir olması gerekir. Performans karakteristikleri için öncelikle temel validasyon parametrelerinin belirlenmesi gerekir. Validasyon parametreleri şunlardır: doğruluk (accuracy), kesinlik (precision), özgünlük (specificity), doğrusallık (linearity), gözlenebilirlik sınırı (lod; limit of detection), tayin sınırı (loq; limit of quantification), çalışma aralığı (range), tutarlılık (ruggedness), sağlamlık ya da kararlılık (robustness), stabilite.

Doğruluk (Accuracy) :

Doğruluk, elde edilen değer ile gerçek değer arasındaki yakınlığın ifadesidir. Mutlak hata ya da bağıl hata ile verilir. Uluslararası bağımsız laboratuvarlar tarafından tayin edilmiş değerleri doğru değer olarak kabul edilen Standart Referans Maddelerin tayininden elde edilen sonuç ile aynı maddenin kullanılan yöntemle elde edilen sonuçları karşılaştırılır.

Bir yöntem için doğruluk, geri kazanım çalışmaları ile belirlenir:

- a) Referans standart bir yöntemle karşılaştırmak,
- b) Boş matris ortamına analizi yapılan maddeyi ilave etmek,
- c) Analizi yapılan maddeye bulunduğu ortamda standart ile saf madde ilavesi (zenginleştirme).

$$\% \text{ Geri kazanım} = (C1 / C0) \times 100$$

C1= Çalışma sonucunda bulunan konsantrasyon

C0= Bilinen ya da standart çalışma sonucunda elde edilen konsantrasyon

Keskinlik (Precision):

Keskinlik, ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ifadesidir. Bağımsız analiz sonuçları arasındaki tutarlılığı gösterir. Standart sapma, bağıl standart sapma, varyans veya varyasyon katsayısı ile verilir.

Keskinlik 3 gruba ayrılarak incelenmektedir:

Tekrarlanabilirlik:

Aynı gün, aynı laboratuvar, aynı araştırmacı, aynı cihaz ile 5-6 paralel tayin 2-3 farklı derişimle yapılır. Sonuçların RSD değerleri kıyaslanır.

$$\%RSD: (std/ort) \times 100$$

Tekrar Üretilirlik (Reproducibility):

Çok ortaklı çalışmalarda laboratuvarlar arası kesinliğin tayini için istenen bir parametredir.

Özgünlük (Specificity):

Özgünlük, bir metodun aranan analiti diğer analitlerin bulunduğu örnek içinde ayırt edebilme yeteneğine denir. Özgünlüğün belirlenebilmesi için, girişime neden olabilecek ve matriste bulunan maddeler standart üzerine eklenerek girişim oluşturup oluşturmadığı incelenir. LC-MS gibi duyarlı ve hassas tekniklerle, herhangi ilave bir pik olup olmadığı kontrol edilir.

Doğrusallık (Linearity):

Analit derişime karşı dedektör cevabın doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte noktaların doğru üzerinde veya yakın olarak yer almasıdır.

Eğim, kesişim ve korrelasyon katsayısı (R²) doğrusallığı veren parametrelerdir.

R² = 0.999 ve üzerinde olmalı ve değerler çizilen doğrunun üzerinde yer almalıdır.

Belirlenebilme Limiti (LOD; Limit of Detection):

Analizi yapılan örneğin belirlediği fakat kantitatif sınırlar içerisine girmeyen en düşük derişimdir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir. Sinyal/Gürültü oranı 3 olarak alınır.

LOD= 3.3 x SD/m eşitliği kullanılır.

SD= Boş çözeltinin; çok az derişimdeki madde çözeltisinin veya kesişim değerinin standart sapması,

m = Kullanılan kalibrasyon eşitliğinin eğim değeridir.

Tayin Limiti (LOQ; Limit of Quantification):

Analizi yapılan örneğin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği doğrusallık sınırları içerisinde girmeyen veya doğrusallığın en alt derişimini oluşturan düzeyidir. Doğrudan yapılan deneylerden veya hesapla bulunabilir.

LOQ= 10 x SD/ m eşitliği kullanılır.

Sinyal/Gürültü oranı 10 olarak alınır.

Çalışma Aralığı (Range):

Kalibrasyon eğrisinde tayin edilebilen en düşük derişimden, doğrusallıktan sapma gösterdiği derişime kadar olan derişim aralığını kapsar.

Tutarlılık (Ruggedness):

Yöntemin gerçek kullanım koşulları altında tekrar edilebilirliğinin saptanmasıdır. Bunun için çalışmanın:

- a) Aynı laboratuvarıda farklı analizciler tarafından,
- b) Aynı laboratuvarıda farklı cihazlar tarafından,
- c) Farklı laboratuvarlarda gerçekleştirilmesi,
- d) Reaktif ve çözücülerin markalarının değiştirilmesi,
- e) Aynı marka ve modele sahip yeni bir kolon kullanarak tekrarlanması gereklidir.

% RSD ile ifade edilir.

Sağlamlılığa da Kararlılık (Robustness):

Yöntemin, parametrelerdeki ufak değişimlerden etkilenmeden kalabilme kapasitesidir. Bu parametreler organik çözücü yüzdesi, pH, iyonik güç, sıcaklık gibi etkenlerdir. Kararlılık

yöntem geliştirilirken değerlendirilmesi gereken bir aşamadır. Örneğin pH 3 de ± 0.1 kadar bir değişim gösteren bir madde pH 4.5 da değişmeden aynı sonucu veriyorsa pH 4.5 ortam olarak seçilmelidir.

Stabilite :

Tekrar edilebilir ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için numunelerin, standart maddelerin ve kullanılan çözücülerin uygun bir süre stabilitesini koruması gereklidir.

Geri kazanım (Recovery):

Yöntem geçerliliğinde son adım, geri kazanımdır. Laboratuarda hazırlanan, içerdiği maddeler nedeniyle analizi etkilemeyecek bir örneğe katılan analizi yapılacak maddenin analiz sonunda tam olarak elde edilebilmesidir. Bir analitiksel yöntemin ekstraksiyon verimiyle yakından ilgilidir. Numune işlemlerindeki kayıpları vermektedir.

2.5.1.yBOS örneği ile gerçekleşen validasyon çalışmaları

Adli toksikolojide, vücut sıvıları sadece kana alternatif olarak değil aynı zamanda ölüm sonrası ilaç yeniden dağıtımlarının ve farmako-/toksikokinetik analizlerin araştırılması için de önemli materyallerdir; bununla birlikte, BOS örneğinde ölüm sonrası ilaç dağılımları hakkında önemli bulgular sunmaktadır (3).

Son dönemde analitik yöntemlerin geçerliliğini değerlendirmede en önemli parametrelerden biri doğa dostu profili olduğunu görüntülemektir. Kullanılan bu eko-ölçek aracında(95) kullanılan her çözücüye ve doğaya dost örneğe ilgili bir puan verilmiştir. Toplam puan hesaplanır ve daha sonra 100'den çıkarılır; bu sayede daha yüksek puanlar daha iyi doğa dostu özelliği gösterdiğini belirlenmiş olur. Elde edilen puanlar yöntemlerin çevreye olan güvenliğini teyit etmede kullanılmaktadır.

Ancak BOS gibi bir biyolojik örnekte herhangi bir bileşik için metot geliştirme aşamasında yapay BOS (yBOS) kullanımı ile bu doğa dostu, pahalı ve az bulunan BOS tüketimi sınırlandırılabilir. Bu amaçla test edilen yBOS kompozisyonları, BOS'da bulunan toplam protein konsantrasyonunu taklit etmek için çeşitli sığır serum albümini (BSA) veya sıçan plazması seyreltilerinden yapıldığı görülmektedir. Monoklonal antikorlara odaklanan yBOS, insan immünoglobulinine (hIgG) eklenmiştir ve LC-MS kullanılarak aşağıdan yukarıya analiz tekniği ile hazırlanmıştır.

Josefsson ve ark., yaptıkları bir çalışmada olanzapin ve ana metaboliti olan N-desmetilolanzapini BOS örneğinde tayin etmek için LC-MS/MS yöntemini geliştirmişlerdir (100). BOS örneğinden olanzapin, tersiyer bütil metil eter kullanarak ekstrakte edilmiş ve olanzapinin LOQ değeri 0.1 ng/mL, olanzapin geri kazanım değeri %75-%81 arasında olduğu belirlenmiştir. Yöntemin gerçek numunelere uygulama aşamasında ise 10 mg olanzapin alan şizofren hastasına ait BOS örneğinde olanzapin derişimini 3.6 ng/mL olarak belirlenmiştir.

Bir başka çalışmada, insan BOS örneğinde cenicriviroc (CVC) miktarının belirlenmesi için LC-MS/MS ile yöntem geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Yöntem asetonitril ile çöktürme ve süpernatantların kolona enjekte edilmesini içermektedir. Kolon türü olarak XBridge C18 ile oldukça başarılı bir ayırım sağlandığı görülmektedir (127).

Fare beyin omurilik sıvısında on iki nörotransmitter ve amino asitin (aspartik asit, serin, glisin, glutamat, γ -aminobütirik asit, norepinefrin, epinefrin, asetilkolin, dopamin, serotonin, histamin ve metaboliti 1-metilhistamin) LC – MS / MS analizi ve yBOS ile validasyonu yapılmıştır. yBOS içerisine deneklerden elde edilen BOS örnekleri eklenerek analiz edilmiştir. yBOS kullanılmasının sebebi, oldukça düşük miktarda (1–2 μ L) BOS toplanabilmesidir (101).

2.5.2. Validasyon hazırlık çalışmaları

2.5.2.1 Kullanılacak materyaller

Kör numune:

Validasyon işlemlerinde belirli konsantrasyonda standart ilave etmek (spike yapmak) için, saf matris (kör numune) gerekmektedir. Analit içermeyen kör numune örnekleri yonteme göre hazırlanır, analiz edilir ve seçilen matrisin analit LOD seviyesinin altında olduğu kanıtlanır.

Kör kimyasal:

Analizin işlem basamakları sırasında kullanılan kimyasal maddelerin ölçüm sinyaline katkısı olup olmadığının araştırılması için kullanılır. Numune olmadan kullanılan tüm kimyasalların uygulanıp analiz edildiği çözeltilerdir.

Sertifikalı Referans Standart Materyal (CRM - Certified Reference Material):

Referans Malzeme, metodun kalibrasyonu veya doğrulanması, ölçüm izlenebilirliğinin sağlanması, yeterlilik testi gibi kalite kontrol çalışmalarında kullanılan bir etken madde için saf veya bir matrise özgü oluşturulmuş materyallerdir. Bir Referans Malzemenin, Sertifikalı Referans Malzeme (CRM) olabilmesi için kullanım amacına uygun şekilde matrisin her yerinde özgün bir homojenliğe ve metodun kararlılığının kanıtlanması için geçerliliği kabul edilmiş yöntemler kullanılarak elde edilen değerlerin veya olası belirsizliklerin izlenebilirliğini sağlanması gerekmektedir. Bu sayede CRM'ler için elde edilen tüm bu bilgiler bir sertifika ile müşterilere sunulmaktadır.

Dolayısıyla uygulanan analiz yöntemi ile elde edilen sonuçların doğruluğunun kontrol edilmesi ve ölçüm izlenebilirliğinin sağlanması söz konusu ise CRM'ler kesinlikle kullanılmalıdır.

Söz konusu CRM'lere numune içinde analit de denilmekte olup saç, tırnak, kan, idrar, göz içi sıvısı, BOS gibi eser miktardaki kimyasal içeriğe sahip matrisler için karakterize edilmiş pek çok marka altında CRM'ler bulunmaktadır. Bu CRM'ler söz konusu içerik veya içeriklere

sahip matrisin kendisinden veya matrise bu içerik/içeriklerin ilavesi ile bazen de yapay/sentetik yoldan elde edilen matrise söz konusu içerik/içeriklerin ilavesi yoluyla hazırlanırlar. Metod geliştirme, validasyon ve kalite kontrol amaçlı kullanılırlar.

Uygun bir CRM seçiminde;

- CRM'nin tanımlanmış kullanım amacı net şekilde ifade edilmiş olmalıdır. Ölçüm büyüklüğüne ve doğrusal aralığına dikkat edilmelidir. Yöntemin belirleme limitlerinden daha düşük sertifika değerine sahip CRM'ler uygun olmayacaktır.
- Matris içindeki olası girişim kaynakları göz önünde bulundurulmalıdır.
- Referans malzeme üreticisinin yetkinliğine dikkat edilmelidir. Sertifikalandırma çalışmalarında görev alan laboratuvarların ISO/IEC 17025 akreditasyonları veya CIPM MRA CMC'leri (Kalibrasyon ve Ölçüm Kabiliyetleri) olup olmadığı irdelenmelidir.
- Referans malzemenin üretici tarafından tanımlanan şartlarda kullanıcıya en hızlı şekilde ulaştırılıp ulaştırılamayacağı sorgulanmalıdır.

Numuneler ve standartlar:

Yöntem basamaklarına göre farklı konsantrasyonlarda standart hazırlanıp analiz edilir. En düşük tayin edilebilir konsantrasyon belirlenir ve diğer parametre konsantrasyonları ayarlanarak numuneler ve standartlar hazırlanıp analiz edilir ve hesaplanır.

2.5.2.2. Konsantrasyon seviyelerinin belirlenmesi

Belirlenen çalışma aralığı göz önünde bulundurularak düşük, orta ve yüksek olacak şekilde validasyon için (aksi belirtilmediği sürece) 3, doğrulama için 2 farklı konsantrasyon seviyesi olması önerilir.

Çalışma aralığı belirlenirken, yöntem uygulanırken karşılaşılabilecek en olası konsantrasyon aralığı seçilmelidir. LOQ seviyesi en düşük konsantrasyon olarak alınabilir. Fakat rutin

analizlerde LOQ seviyesinde örnek gelme olasılığı düşük ise bu gereksiz olabilir. Böyle durumlarda uygun görülen en düşük konsantrasyon belirlenir.

2.5.2.3. Parametrelerin uygulanması

Tayin limiti (LOD) ve ölçüm limiti (LOQ):

Çok düşük konsantrasyonlarda yapılan çalışmalarda en düşük tayin limiti oldukça önemli bir parametredir. LOD çalışması için; numune içinde analit olmayan çalışmalarda kör numuneler kullanarak, kromotagrafik yöntemlerde LOD seviyesine yakın konsantrasyonda analit içeren numuneler, kör numune bulunmayan durumlarda analit içermeyen çözücü (blank) körü hazırlanabilir. LOQ, LOD çalışmanın ardından birkaç yöntemle tayin edilebilir. Bazı analizler için (örneğin pH, nem gibi) tayin limitini bulmak mümkün değildir. Bir örnek içinde var ya da yok diyebileceğimiz bir analit aranıyorsa buna tayin limiti uygulanabilir. Ancak, pH, kül, nem gibi mutlak bir değer veren parametrelerde tayin limiti bulunamamaktadır.

Tekrarlanabilirlik çalışması için hazırlanan en az 10 bağımsız analiz çalışması yapıp, sonuçların ortalaması alınır ve LOD, LOQ hesabı için kullanılmak üzere standart sapmaları hesaplanır. Yöntemin gerekliliği ve sonuçların getirisine göre çeşitli hesaplamalardan biri kullanılabilir.

Cihaz ve yöntem çalışma aralığı:

Yöntemin kabul edilebilir bir belirsizlikte verdiği tüm sonuçların aralığı çalışma aralığı olarak adlandırılır. Alt sınır LOQ değeri olurken, üst sınır yöntemin güvenilir sonuç aldığı konsantrasyondur.

Kör ve seri konsantrasyonlarda hazırlanan standart çözeltilerin en az ikişer kez okutulması ve sonuçların hesaplanmasıyla cihaz çalışma aralığı belirlenir.

Numune körü ve bilinen konsantrasyonlardaki numuneler yöntem uygulanarak en az ikişer kez okutulur. Sonuçlar hesaplanarak yöntemin çalışma aralığı (lineer aralık) belirlenir.

Cihaz ve yöntem aralıkları belirlendikten sonra, sonuçlar ile kalibrasyon eğrisi çizilir. Daha sonra regrasyon analizi ile değerlendirilir. Korelasyon katsayısı (r), cihaz sinyali ile konsantrasyonlar arasındaki ilişki incelenerek hesaplanır. Yöntemlerin geçerli olması için korelasyon katsayısının yüksek olması beklenir. Korelasyon katsayısına rağmen doğrusallıktan şüphe duyulan durumlarda daha farklı istatistiksel değerlendirmelere başvurulabilir.

Seçicilik (Selectivity) / Spesifiklik (Specificity) :

Genel tanım olarak; yöntemin, numunede girişim oluşturabilme ihtimali olan diğer maddeler varlığında analiti ayırabilme ve tanımlayabilme gücüdür. Kör matriste ve kullanılan çözücülerde analite girişim oluşturacak bir pik olmamalıdır.

Doğruluk (Accuracy):

Genel tanım olarak bir ölçüm sonucunun gerçek değerine yakınlığını tanımlar.

a) Kesinlik:

Ölçüm sonuçlarının birbirlerine yakınlığının değeridir ve ölçüm sonuçlarının ortalama değer etrafındaki dağılımını gösterir. Kesinlik; Standart Sapma (SD), Bağıl Standart Sapma (RSD), Varyans veya Varyasyon Katsayısı (Coefficient of variation, CV) ile ifade edilir. Tamamen elimine edilmese de dikkatli ve titiz çalışma teknikleri ile küçültülebilir.

a-1) Tekrarlanabilirlik:

Yöntemin aynı laboratuvarında, aynı cihazla, aynı uygulama koşulları altında, aynı kişi tarafından aynı veya benzer matrislerde elde edilen ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının değeridir. Standart sapma, rölatif standart sapma (RSD) veya % bağıl standart sapma (%RSD) ile ifade edilir.

Her seviye için en az 6 tekrarlı çalışma yapılarak sonuçlar değerlendirilir. Standart sapma, RSD ya da %RSD için aşağıda verilen formüller kullanılabileceği gibi office ya da çeşitli istatistiksel programlar da kullanılabilir.

a-2) Tekrar üretilebilirlik:

Yöntemin farklı laboratuvarında, farklı cihazla, farklı kişi tarafından farklı kimyasallar kullanılarak geniş zaman aralığında, aynı veya benzer matrislerde elde edilen ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının değerlendirmesidir. Tekrarlanabilirlik ile aynı şekilde hesaplanır.

Yöntem Sağlamlığı (Ruggedness):

Analiz sonuçlarının, analiz koşullarındaki küçük değişiklikler karşısında etkilenmeden kalma gücüdür. Değişikliklere ne kadar az hassas olursa yöntem o kadar sağlamdır. Örnek miktarı, sıcaklık, basınç, pH, vorteks süresi, akış hızı, günler arası miktar değişimi gibi çeşitli parametreler değiştirilerek yöntemin sağlamlığı kontrol edilebilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada tüm dünyada en sık karşılaşılan bir yasa dışı madde olan esrarın etken maddesi, Δ^9 -THC için LC-MS/MS ile IS olarak 11-nor-9-Carboxy- Δ^9 -THC-D3 (THC-COOH-D3) kullanılarak kantitatif bir tayin yöntemi geliştirilmiştir. Yöntemin geçerli kılma çalışmaları tamamlandıktan sonra klinikte de oldukça önemli olan BOS sıvısını taklit eden yapay bir BOS sıvısı (yBOS) hazırlanarak, Δ^9 -THC'nin söz konusu matris içindeki davranışı ve geliştirilen yöntemle kalitatif ve kantitatif tayinine yönelik BOS matrisi ile uyumu araştırılmıştır. Çalışmada ilgili referansa atıf yapılarak hazırlanmış olan yBOS kullanılmış olup, gerçek biyolojik örnekler ile çalışılmadığı için etik kurul onayı gerekmemiştir.

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan analitik sistemler, laboratuvar aletleri ve gereçlerine ait bilgiler Tablo IV'de verilmiştir.

Tablo IV. Çalışmada kullanılan referans standart maddelerin ve kimyasal maddelerin isimleri ve markaları

Madde adı	Marka
Δ^9 -THC (%99.9)	LGC Standards (1 mg/mL)
11-nor-9-Carboxy- Δ^9 -THC-D3 (IS - %99.9)	LGC Standards (1 mg/mL)
Sodyum Hidroksit (NaOH) Pelet	Sigma
Metanol (Ultra saf)	MERCK
Etil Asetat (Ultra saf)	MERCK

3.2. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Gereçler

Çalışmada kullanılan enstrümantal analitik sistemler, küçük laboratuvar aletleri ve gereçlere ait bilgiler Tablo V'deki gibidir.

Tablo V.Çalışmada kullanılan cihaz ve gereçlerin isimleri ve markaları

Cihaz-Gereç ismi	Marka
LC/MS-MS	Shimadzu 8045
Kolon	RestekRaptorBiphenyl(2.7µm, 2.1x100mm)
Elektronik Hassas Terazi	MettlerToledo XPE205 (Delta Range)
Balon Joje	Isolab
Falkon tüp (15,50 mL)	Isolab
Otomatik Pipet	Eppendorf
Pipet Ucu	Isolab
Pastör Pipeti	Isolab
Vorteks	IKA yellowline
Santrifüj	Hettich Universal 320R
Vial	Isolab
Şırınga 10 cc	Beybi
Şırınga Ucu Filtre	PVDF
Azot Jeneratörü	PeakSceintificGenius 11051
Manyetik karıştırıcı	IKA RH basic KT/C safetycontrol
Distile Su Cihazı	Millipore Direct Q3
SPE Kartuşu	Welchrom® BRP
SPE Manifoldu	Cerex 48
SPE Vakum Motoru	Value VE 115N
Azot Altında Uçurma Düzeneği	HyperVap HV-300 Gyrozen

3.3. Çalışma Planı

Tez çalışması, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Adli Tıp ve Adli Bilimler Enstitüsü Adli Toksikoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Bu çalışmada Δ^9 -THC etken maddesi için metanol içinde ticari olarak sunulan ana stok çözeltisinden, ara stok ve çalışma çözeltileri hazırlanmış ve tüm kalibrasyon noktalarının LC-MS/MS ile analizi için bir yöntem geliştirilmiştir. Kromatografik koşulların ve geçerlilik çalışmaların belirlendiği koşullar altında, diğer taraftan

uygun şekilde literatüre bağlı kalarak (128,129) 200 mL yBOS örneği hazırlanmıştır. Çalışmada gerçek numune yerine yapay olarak hazırlanmış BOS örneği kullanılmış olup, gerçek BOS örneği ile çalışılmadığı için etik kurul onayı gerekmemiştir. Δ^9 -THC referans standart madde için oluşturulan kalibrasyon noktalarının ayrı ayrı katılması (spike) yoluyla oluşturulan yBOS örneklerinden, uygun şekilde ilgili maddeye özgü bir Katı Faz Ekstraksiyon yöntemi geliştirilmiş ve LC-MS/MS ile analiz edilmiştir.

Katım örneklerine geçmeden önce, Δ^9 -THC standart maddesi ile matris etkisi olmaksızın elde edilen seçicilik, doğrusalık, doğrusal aralık, tekrar edilebilirlik, doğruluk, LOD ve LOQ değerleri belirlenmiştir. Daha sonra matris etkisini görmek adına yBOS matrisine Δ^9 -THC spike edilerek hazırlanan örneklerde de yine geçerlilik çalışmaları aynı şekilde (geri kazanım, LOD, LOQ, kesinlik, doğruluk ve stabilite) uygulanarak söz konusu parametreler tek tek incelenmiş ve sonuçta tüm veriler birbirleri ile kıyaslanmıştır.

3.4. yBOS örneğinin hazırlanması

yBOS'un elektrolit bileşimi, endojen BOS'a benzeyecek şekilde ayarlanmıştır. BOS bilindiği gibi iyonik içeriğinin yanı sıra önemli miktarlarda protein ve glikoz içermektedir (39). Çalışmamızda endojen BOS'a mümkün olduğunca yakın bir kompozisyon elde etmek amacıyla, albumin ve glikoz eklenmiştir. Tablo VI'da belirtilen miktarlarda söz konusu maddeler tek tek tartılıp içinde 50'şer mL ultra saf su (USS) bulunan 100 mL'lik 2 adet balon jodede karıştırılmıştır. Eklenen maddelerin tamamen çözünmesini takiben balon jodeler USS ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Tablo VI'da belirtilen A ve B çözelti grupları 250 mL'lik bir erlen içinde 1:1 oranında karıştırılmıştır. Karışım içine daha sonra 100 mg albumin ve 198,23 mg dekstroz monohidrat tartılarak çözeltiliye eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı ile 15 dakika karıştırılarak homojen hale gelmesi sağlanmıştır.

Tablo VI:yBOS hazırlamada kullanılan maddelerin miktarları

A çözeltisi	Tartılan miktar(mg)
NaCl	1731
KCl	44,88
CaCl ₂ · 2H ₂ O	41,6
MgCl ₂ · 6H ₂ O	32,5
B çözeltisi	
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	43,22
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	6,19

3.5. Δ^9 -THC Analizi

3.5.1. Δ^9 -THC Analizinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

3.5.1.1. Δ^9 -THC standart çözeltilerinin hazırlanması:

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve markaları Bölüm 3.1.'de verilmiştir. Bu kimyasallar ile hazırlanan stok, ara stok ve çalışma çözeltileri aşağıdaki tabloda verilen miktarla, gerekli seyreltmeler hesaplanarak hazırlanmıştır. Bu şekilde 0.5 ng/mL ile 50 ng/mL arasında 7 noktalı bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Ana stok çözeltisi (100 mg/L): 1000 µg/mL konsantrasyonda sıvı olarak tedarik edilen Δ^9 -THC, oda sıcaklığına getirilip iyice vortekslendikten sonra 100 µL alınıp 900 µL metanol içerisinde çözüldü.

Ara stok çözeltisi 1 (10 mg/L):Ana stok çözeltisinden 1 mL alınıp, 9 mL metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

Ara stok çözeltisi 2 (1 mg/L): Ara stok çözeltisi 1'den 1 mL alınıp, 9 mL metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

500 µg/L standart çözeltisi: Ara stok çözeltisi 2'den 5 mL alınıp, 5 mL metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

100 µg/L standart çözeltisi: Ara stok çözeltisi 2'den 1 mL alınıp 9 mL metanol ile 10 mL'ye tamamlandı.

3.5.1.2. İç Standart (IS) çözeltisinin hazırlanması:

Ticari olarak tedarik edilebilen sıvı 1000 mg/L konsantrasyonda THC-COOH-D3 referans standart çözeltisinden 50 µL alındı 5 mL'lik balon jodede metanol ile seyreltildi. Böylelikle “ana stok çözeltisi (10 mg/L)” hazırlanmış oldu.

Bir başka balon jodede ise THC-COOH-D3 ana stok çözeltisinden (10 mg/L) 1 mL alınıp metanol ile 10 mL'ye tamamlandı ve “ara stok çözeltisi (1 mg/L)” hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler parafilm ile kaplanarak +4°C'de muhafaza edildi.

3.5.1.3. NaOH çözeltisinin hazırlanması

700 mL sodyum hidroksit çözeltisi hazırlamak için; 1 M'lık sodyum hidroksit stok çözeltisinden 35 mL tartılıp balon jodede ultra saf suda çözündürülerek 700 mL'ye tamamlandı.

3.5.2. Δ⁹-THC tayini için yBOS örneklerinin analize hazırlanması

3.5.2.1. Spike yBOS örneklerinin hazırlanması

Her biri 3'er mL olan 20 adet yBOS çözeltisi 50 mL'lik falkon tüplere konuldu. Örnekler iki gruba ayrıldı. İlk grup ekstraksiyon prosedürüne bağlı olarak olası kayıplar olmaksızın şekilde değerlendirilmek üzere; ikinci grup ise bu kayıpları da dikkate alarak söz konusu metodun geri kazanımını hesaplamak için kullanılmıştır.

Birinci grup örnekleriekstraksiyona tabi tutulmadan önce aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır (sonra spike yBOS numuneleri):

- 3 mL örnek üzerine 20 mL 0.05 M NaOH eklendi.
- 50 °C derecede 2 saat boyunca ultrasonik su banyosunda muamele edildi.
- İki saatin sonunda filtre kâğıdı ile süzüldü.

- Sıvıların pH'ları 9-10 arası ayarlandı.
- Bölüm 3.5.2.2'de açıklanan çekitleme işlemi uygulandı.
- Çekitleme işlemi sonrasında on örnekten dokuz tanesinin üzerine 1 µL 1000 ng/mL Δ^9 -THC ve 25 µL 1000 ng/mL THC-COOH-D3 eklendi (nihai konsantrasyon 1 ng/mL, nihai hacim 1000 µL). On örnekten bir tanesine ise sadece 25 µL 1000 ng/mL THC-COOH-D3 (IS) eklendi (nihai konsantrasyon 25 ppb, nihai hacim 1000 µL).
- Numuneler azot altında kurutuldu.
- Azot altında kurutma işlemi tamamlandıktan sonra kalıntılar nihai hacim 1000 µL olacak şekilde metanol ile tamamlandı.
- Şırınga uçlu filtrelerle (Şekil 13) süzdükten sonra numuneler LC-MS/MS ile analiz edildi.

İkinci grup çalışmada (önce spike numuneler) ise on örneğin bir tanesine sadece 25 µL 1000 µg/L THC-COOH-D3 (IS) eklendi (nihai konsantrasyon 25 ppb, nihai hacim 1000 µL). Diğer dokuz örneğe 1 µL 1000 µg/L Δ^9 -THC ve 25 µL 1000 µg/L THC-COOH-D3 eklendi (nihai konsantrasyon 1 ng/mL, nihai hacim 1000 µL).

- 3mL örnek üzerine 20 mL 0.05 M NaOH eklendi.
- 50°C derecede 2 saat boyunca ultrasonik su banyosunda muamele edildi.
- İki saatin sonunda filtre kağıdı ile süzüldü.
- Sıvıların pH'ları 9-10 arası ayarlandı.
- Bölüm 3.5.2.2'de açıklanan çekitleme işlemi uygulandı.
- Numuneler azot altında kurutuldu.
- Azot altında kurutma işlemi tamamlandıktan sonra kalıntılar nihai hacim 1000 µL olacak şekilde metanol ile tamamlandı.

- Şırınga uçlu filtrelerle (Şekil 13) süzdükten sonra numuneler LC-MS/MS ile analiz edildi.



Şekil 13:Ekstraksiyon sırasında kullanılan şırınga ucu filtreler

3.5.2.2. Katı faz ekstraksiyonu yöntemi

yBOS örneğinde Δ^9 -THC'nin LC-MS/MS sistemi ile tayinine yönelik geliştirilen bu yöntemde, numuneler cihazda analiz edilmeden önce katı faz ekstraksiyonu ön işleminden geçirildi.

SPE (Katı Faz Ekstraksiyonu) Prosedürüne ait aşamalar şu şekildedir:

- **Kartuş şartlama:** 2 mL Etil Asetat + 2 mL Metanol + 2 mL Distile Su ile kartuş şartlandı.
- **Numune Yükleme:** Bazik ortamda ultrasonik banyoda muamele edilen numuneler şartlanması tamamlanan kartuşlara ayrı ayrı yüklendi.
- **Kartuş Yıkama:** Kartuşlar 2x2 mL %5'lik Metanol ile yıkandı, yıkama işleminde hız yer çekimine bırakıldı.
- **Kartuş Kurutma:** Kartuşlar 5000 rpm 18°C'de 5 dk santrifüj edildi.

- **Elüsyon:** 2x1 mL Metanol + 2x1 mL Etil Asetat kartuşlara ilave edilerek numune tüplerde toplandı.

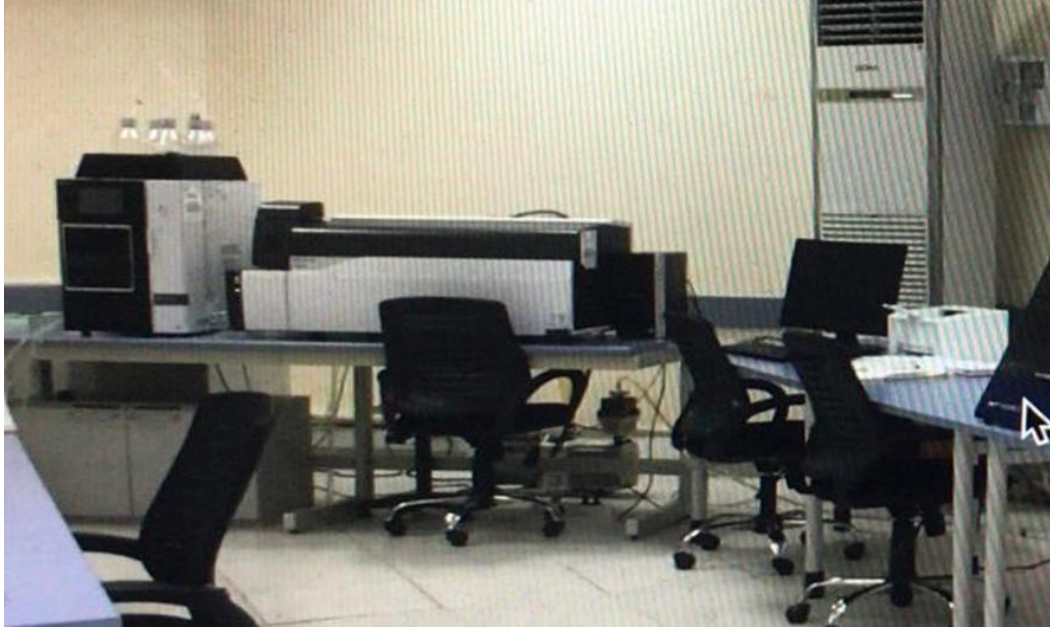


Şekil 14: Ekstraksiyon düzeneği

3.5.3. LC-MS/MS ile Δ^9 -THC analizi

Bu çalışma için Şekil 15’de gösterilen Shimadzu 8045 LC-MS / MS (Kyoto, Japonya) kullanılmıştır. Elektrosprey İyonizasyon (ESI) kısmında pozitif iyon modu seçilmiştir. Ekstraksiyon sonrası örnek çözücülerinin uçurulmasında azot altında uçurma düzeneği olarak PEAK Scientific Genius 1051'den (Glasgow, İskoçya) faydalanılmıştır. İyi bir ayırımın sağlanmasında mobil faz için, ultra saf su cihazı (Millipore Direct Q3) kullanılarak hazırlanmış %0.1 formik asit içinde 2 mM AmOAc çözeltisi (A) ve MeOH içinde % 0.1 formik asit içinde 2 mM AmOAc (B) kullanılmıştır. Kolon olarak Restek Raptor Bifenil (2.7 μ m, 100 x 2.1 mm) kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 2 μ L olarak belirlenmiştir. Toplam analiz

süresi 17 dakika, akış hızı dakikada 0.4 mL olacak şekilde düzenlenmiştir. Arayüz sıcaklığı 300° C ve kolon fırın sıcaklığı 50°C olarak ayarlanmıştır. Isıtma gazı akışı ve kurutma gazı akışı dakikada 10 L olarak ayarlanmıştır. Gradyan, mobil faz B'yi 8 dakika içinde %95'e yükselterek %5 ile başlatıldı ve 5 dakika boyunca analiz devam etti. Bundan sonra, çözücü B %5'e düşürüldü ve kolonun dengesi için 4 dakika tutuldu. Maksimum hassasiyet elde etmek için, kalma süresi 2.0 msn olarak seçilmiştir. MRM modunda izlenen iyonlar (m/z) Δ^9 -THC için 315, 193, 123'tür. LC-MS/MS sisteminde yapılan tüm analizler Lab Solutions yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 15: Δ^9 -THC analizinin yapıldığı LC-MS/MS cihazı

3.6. yBOS örneğinde Δ^9 -THC Analizinin Validasyonu

3.6.1. Seçicilik çalışmaları

Seçicilik çalışması için içerisinde analit olmayan çözücü (MeOH) kromatogramı ile blank Δ^9 -THC çözeltilisine ait kromatogram karşılaştırıldı. Bunlara ek olarak önce ve sonra spike Δ^9 -THC içeren yBOS örneklerine ait kromatogramlar ile önce ve sonra spike IS içeren yBOS örneğine ait kromatogramlar karşılaştırıldı. Çözücünden ve matristen kaynaklanan herhangi bir girişim olup olmadığı değerlendirildi.

3.6.2. LOD ve LOQ hesaplamaları

LOD ve LOQ çalışması için, içinde Δ^9 -THC olmayan, yalnızca 25 ng/mL IS (THC-COOH-D3) olan çalışma çözeltisi hazırlandı. Örnekler Bölüm 3.5.2.1’de açıklanan sonra spike yBOS numunesi hazırlama basamağına göre hazırlandı. Çekitleme sonrası numuneye 1000 ng/ml konsantrasyonda THC-COOH-D3 çözeltisinden 25 μ L eklendi. Azot altında kurutma işlemi yapıldıktan sonra kalıntılar nihai hacim 500 μ L olacak şekilde metanol ile tamamlandı. Şırınga uçlu filtre ile süzdükten sonra numuneler LC-MS/MS ile analiz edildi. On (10) tekrarlı analiz edilen örneklerden elde edilen Δ^9 -THC konsantrasyonunun ortalaması ve standart sapması hesaplandı. Ortalamaya standart sapmanın 3 katı eklenerek LOD, 10 katı eklenerek LOQ değerleri belirlendi.

LOD ve LOQ hesaplamaları aşağıda gösterilen şekilde yapıldı.

$$\text{LOD} = \text{Ortalama blank konsantrasyonu} + (3 * \sigma)$$

$$\text{LOQ} = \text{Ortalama blank konsantrasyonu} + (10 * \sigma)$$

σ = standart sapma

Elde edilen LOD ve LOQ değerleri belirlendikten sonra bu konsantrasyonlar ayrıca hazırlanarak 3’er defa analiz edilerek LOD ve LOQ değerlerinin doğrulaması yapıldı.

3.6.3. Doğrusallık çalışmaları

Δ^9 -THC içeren kalibrasyon çözeltileri (0,5-50 ng/mL) ve kör çözelti (Blank, sadece IS içeren MeOH) Tablo VII ’de gösterildiği şekilde hazırlanarak artan konsantrasyonlar şeklinde ve her bir kalibrasyon noktası 3’er tekrarlı olacak şekilde LC-MS/MS sisteminde analiz edildi. Elde edilen kalibrasyon eğrisine ait doğrunun denklemi ve korelasyon katsayısı (r^2) LC-MS/MS sisteminin yazılımı yardımı ile hesaplandı. Korelasyon katsayısı için kabul kriteri $\geq 0,99$ olarak belirlendi.

Tablo VII.Kalibrasyon çözeltilerini hazırlamada kullanılan maddelerin miktarları

Kalibrasyon Noktası	Δ^9 -THC(μ L)(100 μ g/L standart çözeltilisinden)	THCCOOH-D3 IS (μ L)(1 mg/L'lik ara stok çözeltilisinden)	MeOH(μ L)
0	0	25	975
0.5	5	25	970
1	10	25	965
2	20	25	955
5	50	25	925
10	100	25	875
25	250	25	725
50	500	25	475

3.6.4. Kesinlik çalışmaları

Kesinlik parametresi çalışmaları gün içi (tekrarlanabilirlik) ve günler arası (yeniden üretilebilirlik) olmak üzere düşük, ve yüksek iki farklı konsantrasyonda (5 ng/mL ve 25 ng/mL) katım (sonra spike) yapılmış örnekler ile ve her konsantrasyondan altı tekrar olacak şekilde yapılmıştır.

Gün içi tekrarlanabilirlik çalışması için; analitiçermeyen 3 mL yBOS örnekleri 3.5.2.1. bölümündeki sonra spike örnek hazırlama basamağına göre hazırlanıp çekitleme işlemi yapıldıktan sonra;

-1 ng/mL konsantrasyona sahip numuneleri hazırlamak için üzerine 5 μ L 100 ng/mL Δ^9 -THC ve 25 μ L 1000 ng/mL THC-COOH-D3 eklendi.

-2 ng/mL konsantrasyona sahip numuneleri hazırlamak için: üzerine üzerine 5 μ L 1000 ng/mL Δ^9 -THC ve 25 μ L 1000 ng/mL THC-COOH-D3 eklendi.

-5 ng/mL konsantrasyona sahip numuneleri hazırlamak için: üzerine 50 μ L 1000 ng/mL Δ^9 -THC ve 25 μ L 1000 ng/mL THC-COOH-D3 eklendi.

- 10 ng/mL konsantrasyona sahip numuneleri hazırlamak için: üzerine 50 μ L 1000 ng/mL Δ^9 -THC ve 25 μ L 1000 ng/mL THC-COOH-D3 eklendi.

-25 ng/mL konsantrasyona sahip numuneleri hazırlamak için: üzerine 50 μ L 1000 ng/mL Δ^9 -THC ve 25 μ L 1000 ng/mL THC-COOH-D3 eklendi.

Numuneler azot altında kurutuldu. Azot altında kurutma işlemi tamamlandıktan sonra kalıntılar nihai hacim 500 µL olacak şekilde metanol ile tamamlandı. Şırınga uçlu filtrelerle (Şekil 13) süzdükten sonra numuneler LC-MS/MS ile analiz edildi. Analizden 7 gün sonra aynı işlem tekrar edildi. Böylece günler arası tekrar edilebilirlik çalışması yapılmış oldu.

Elde edilen sonuçların standart sapması (σ) ve bağıl standart sapması (RSD) aşağıdaki formüller kullanılarak tekrarlanabilirlik çalışmasında kullanılmak üzere hesaplandı.

$$\text{Standart sapma } (\sigma) = \sqrt{\frac{\sum |x - \bar{x}|^2}{n - 1}}$$

Σ : toplam

x : veri kümesinde bir değer

\bar{x} : aritmetik ortalama

n : veri noktası sayısı

$$\text{RSD} = \sigma / \bar{x} \% \quad \text{RSD} = \sigma / \bar{x} * 100$$

σ : standart sapma

\bar{x} : aritmetik ortalama

3.6.5. Geri kazanım çalışmaları

Geri kazanım çalışmaları yapmak için kalibrasyon noktalarından düşük ve yüksek olmak üzere iki farklı konsantrasyon noktası seçildi (5 ve 25 ng/mL).

Analit içermeyen 3 mL yBOS örnekleri 3.5.2 bölümünde belirtilen şekilde ve miktarlarda (her bir geri kazanım numunesi 6 tekrarlı olacak şekilde) hazırlanıp çekitlenerek LC-MS/MS sisteminde analiz edildi. Elde edilen miktar tayinleri hesaplandı. % Geri kazanım hesabı aşağıda verilen formül kullanılarak yapıldı.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = (c1 / c0) * 100$$

c0: Eklenen Δ^9 -THC konsantrasyonu

c1: Miktar tayini sonucu bulunan Δ^9 -THC konsantrasyonu

Elde edilen sonuçların standart sapması (σ) ve bağıl standart sapması (RSD) 3.6.4. bölümündeki formüller kullanılarak hesaplandı. Kabul edilebilir değerler standart sapma için <15 , bağıl standart sapma yüzdesi için $<20\%$ olarak belirlendi. Geri kazanım için kabul kriteri $80-120$ arası olacak şekilde belirlendi.

3.5.6. Stabilite çalışmaları

Stabilite çalışması için bölüm 3.4.2.1'de belirtilen şekilde birinci grup (sonra spike) örnek hazırlama basamağına göre 6 adet 25 ng/mL 'lik geri kazanım numunesi hazırlandı, çekitlendi, analiz edildi ve oda sıcaklığında muhafaza edilen aynı numuneler 7 gün sonra LC-MS/MS sisteminde yeniden analiz edildi. % Değişim hesabı aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

$$\% \text{Değişim} = [c0 - c1] / 100$$

c0: ilk analizde tayin edilen Δ^9 -THC miktarlarının ortalaması

c1: ikinci analizde (7 gün sonra) tayin edilen Δ^9 -THC miktarlarının ortalaması

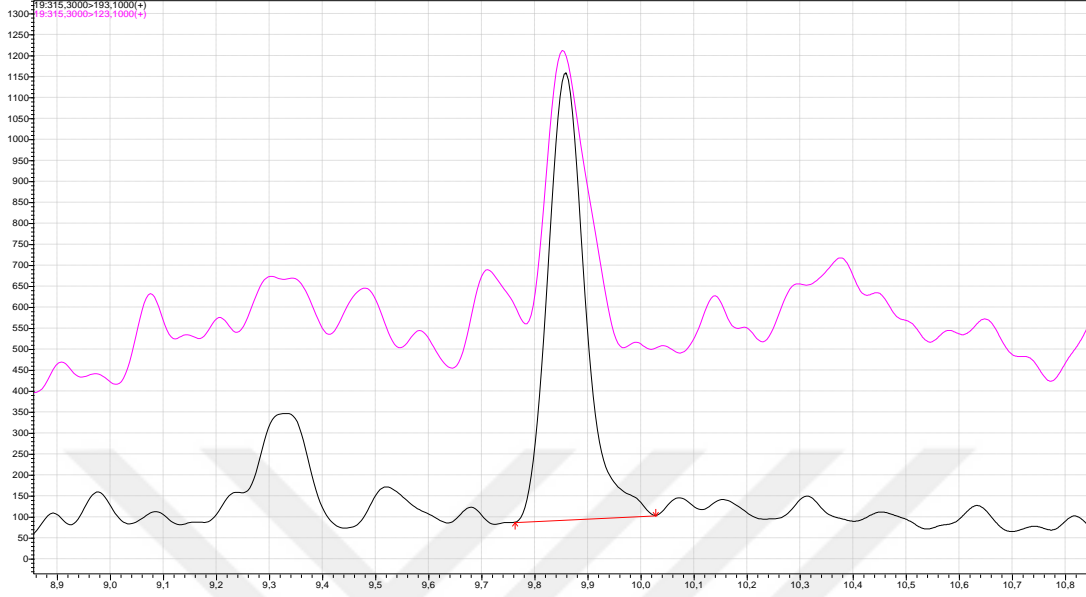
4. BULGULAR

Kullanılan yöntem parametrelerine göre 5 ng/mL standart çözelti ile yapılan çalışmada (n=9) Δ^9 -THC ve IS (THC-COOH-D3) için belirlenen alıkonma zamanları (rt) ile başlıca m/z oranları Tablo VIII'deki gibidir. Δ^9 -THC için ortalama alıkonma zamanı $9.878 \pm 0,009$ dk iken, THC-COOH-D3 için $9.334 \pm 0,008$ dk bulunmuştur.

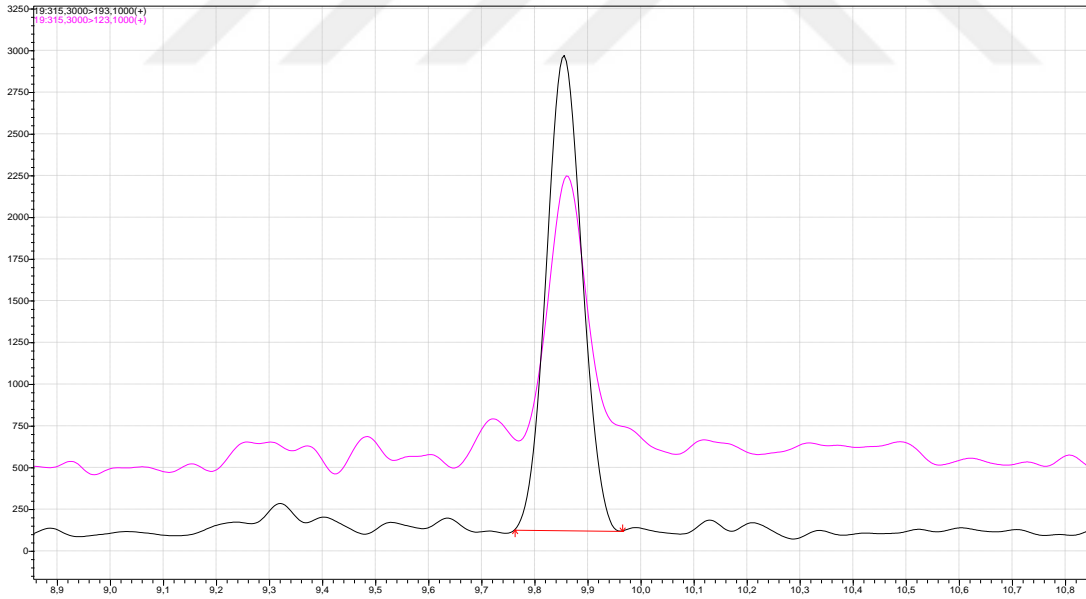
Tablo VIII. Maddelerin alıkonma zamanları (dk) ve kütle spektrumundaki (MS) başlıca iyonları (m/z) (5 ng/mL)

Analiz sayısı	Δ^9 -THC(dk)	THC-COOH-D3(dk)
1. tekrar	9.886	9.324
2. tekrar	9.891	9.327
3. tekrar	9.883	9.328
4. tekrar	9.883	9.334
5. tekrar	9.876	9.335
6. tekrar	9.882	9.339
7. tekrar	9.872	9.347
8. tekrar	9.863	9.344
9. tekrar	9.866	9.331
<i>Ortalama rt</i>	9.878	9.334
<i>Standart sapma</i>	0.009	0.008
<i>% RSD</i>	0.10	0,08
<i>İyonları (m/z)</i>	315, 193,123	348, 330, 302

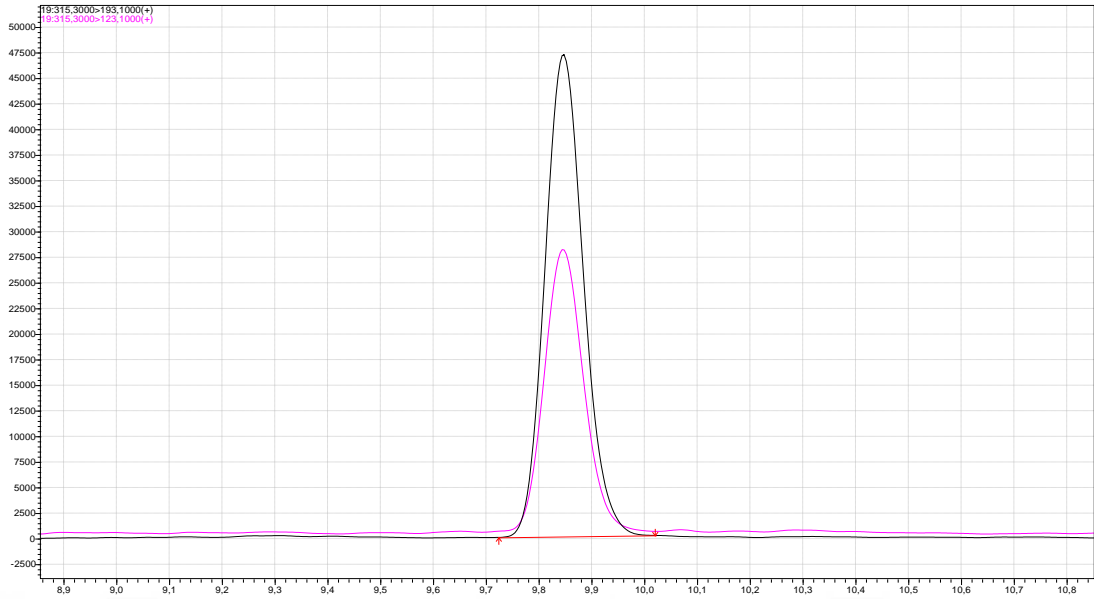
0,5, 1ve 25 ng/mL konsantrasyondaki Δ^9 -THC ve 25 ng/mL ile 100 ng/mL IS çözeltilerinin analizinden elde edilen kromatogramlarıve kütle spektrumları Şekil 16-20'de verilmiştir.



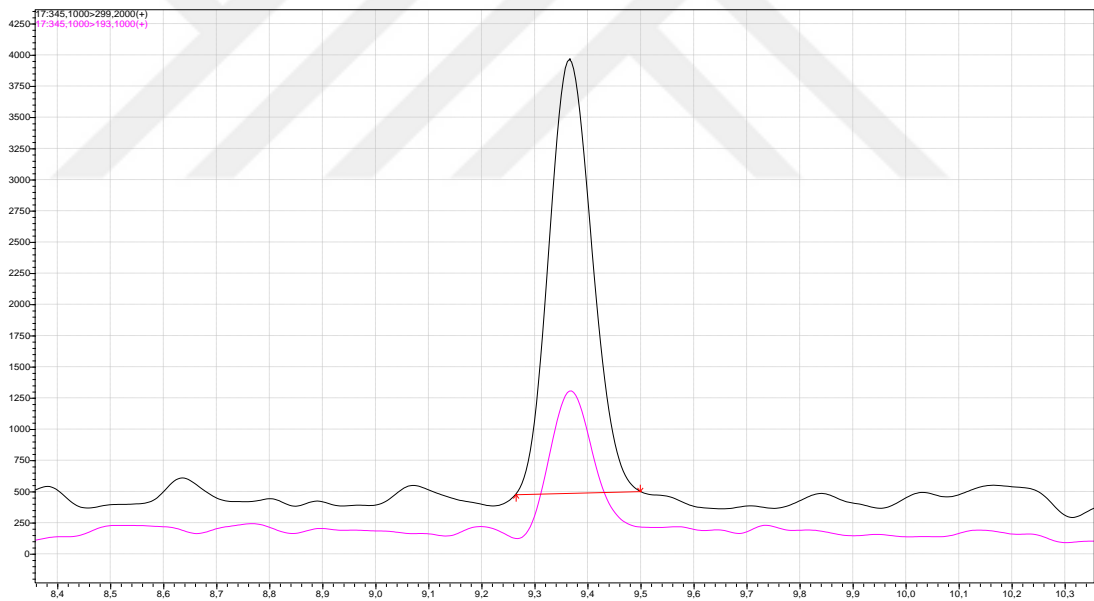
Şekil 16: 0,5 ng/mL Δ^9 -THC çözeltilisine ait LC kromatogramı



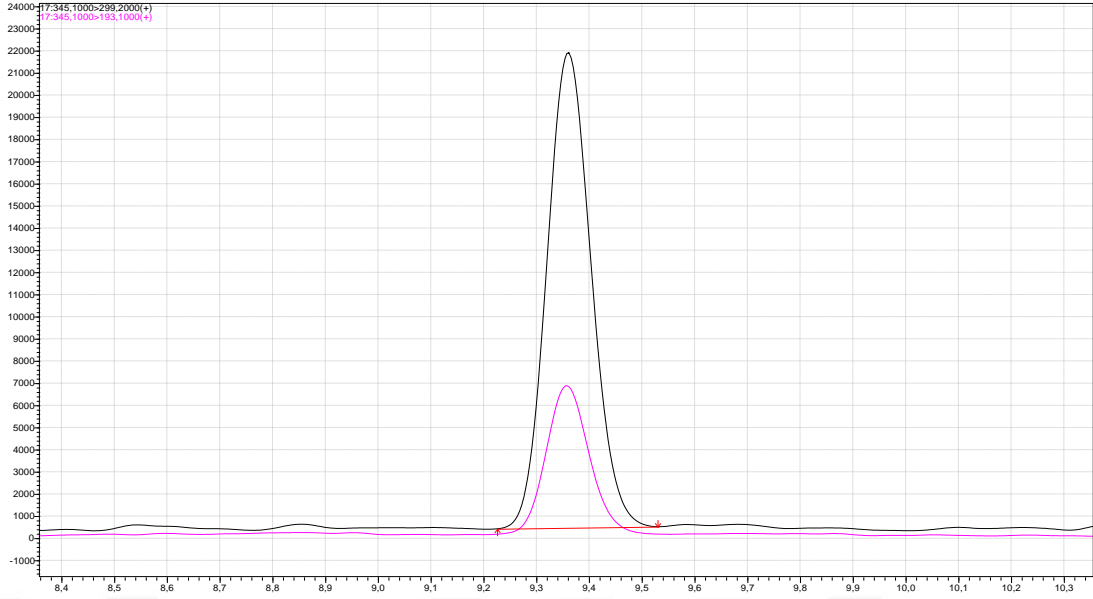
Şekil 17: 1 ng/mL Δ^9 -THC çözeltilisine ait LC kromatogramı



Şekil 18: 25 ng/mL Δ^9 -THC çözeltisine ait LC kromatogramı



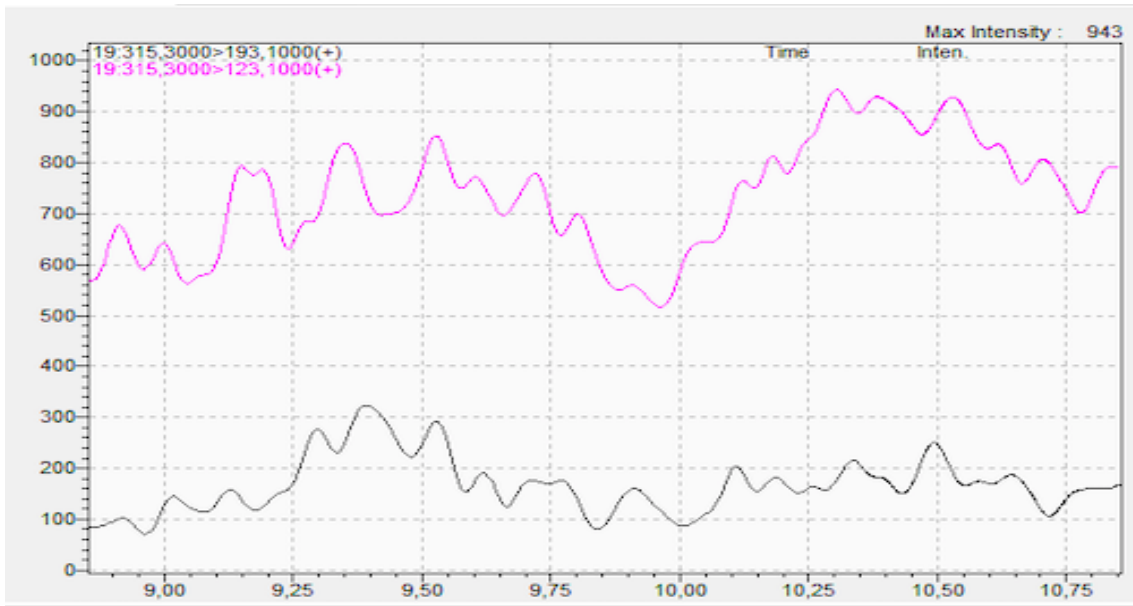
Şekil 19: 5 ng/mL THC-COOH-D3 (IS) çözeltisine ait LC kromatogramı



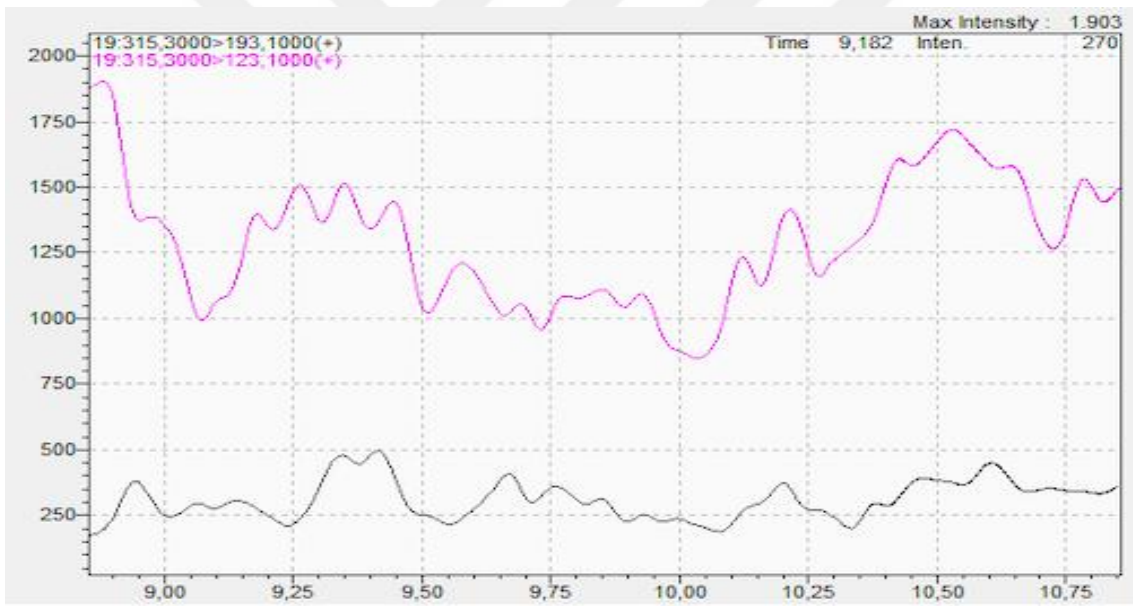
Şekil 20: 25 ng/mL THC-COOH-D3 (IS) çözeltisine ait LC kromatogramı

Seçicilik çalışması

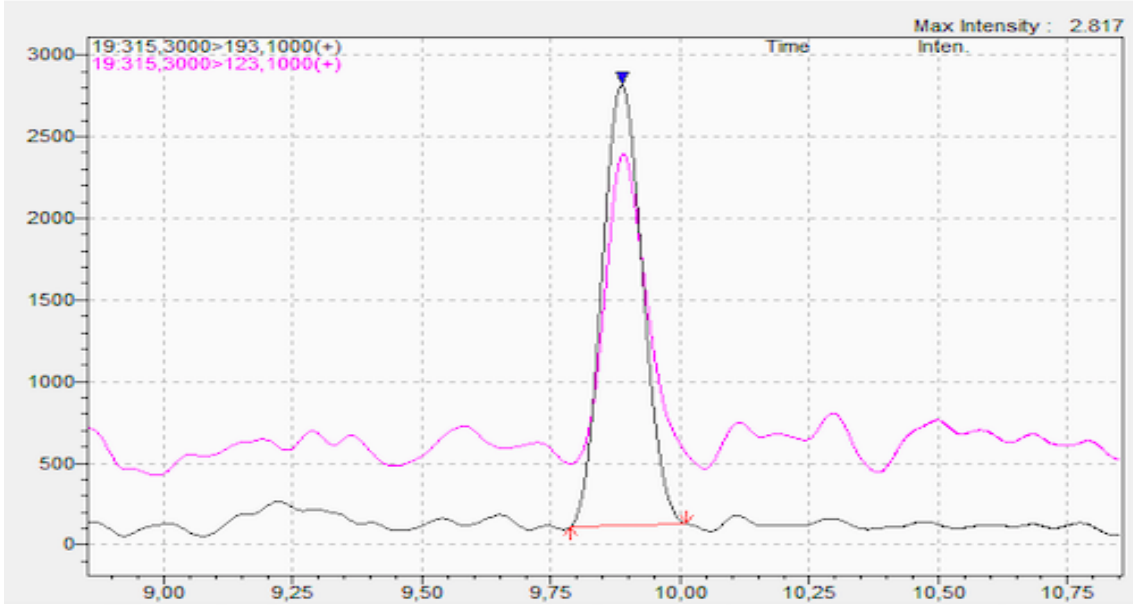
Yapılan seçicilik çalışmalarında Δ^9 -THC ve THC-COOH-D3(IS) için belirlenen alıkönme zamanlarında (rt) herhangi bir girişim gözlenmemiş olup, sadece çözücü olarak kullanılan Metanole ait kromatogram Şekil 21’de; sadece mobil faz çözeltisine ait LC kromatogramı Şekil 22’de; sadece sonra spike Δ^9 -THC içeren yBOS örneğine ait LC kromatogramı Şekil 23’de; sadece önce spike Δ^9 -THC içeren yBOS örneğine ait LC kromatogramı Şekil 24’de gösterildiği gibidir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, organik çözücü veya yBOS matrisine ilişkin herhangi bir girişim olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca tüm kantitatif basamaklar blank yBOS örneğine ilişkin değer çıkarıldıktan sonra hesaplanmıştır.



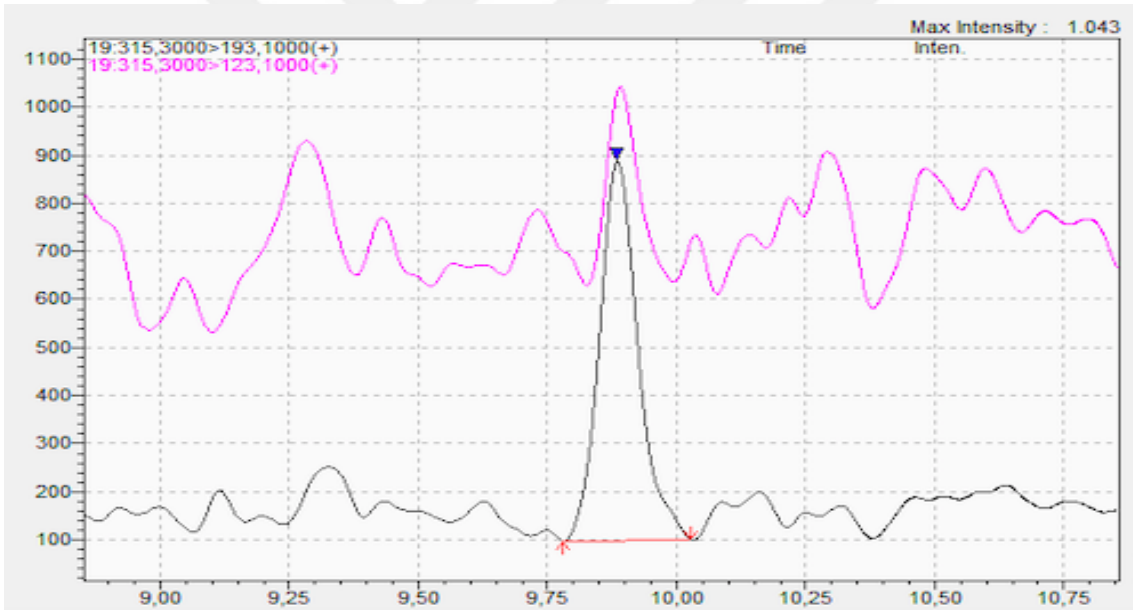
Şekil 21: Sadece MeOH çözeltisine ait LC kromatogramı



Şekil 22: Sadece Mobil faz çözeltisine ait LC kromatogramı



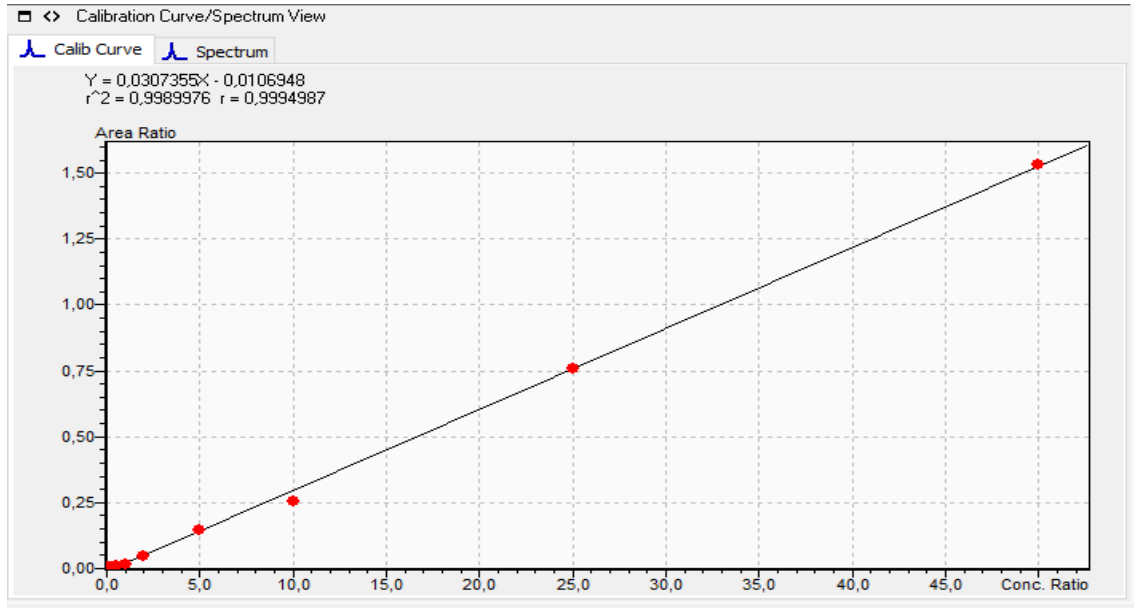
Şekil 23: 1 ppb spike edilen Δ^9 -THC çözeltisine ait LC kromatogramı (sonra spike)



Şekil 24: 1 ppb spike edilen Δ^9 -THC çözeltisine ait LC kromatogramı (önce spike)

Δ^9 -THC'ye ait kalibrasyon eğrisi

Δ^9 -THC için kalibrasyon aralığı 0.5-50ng/mL olarak belirlendi. Bu aralıktaki korelasyon katsayısı $R^2=0.9996$ olarak hesaplandı. Kalibrasyon eğrisi Şekil 25'de verilmiştir.



Şekil 25: 0.5-50 ng/mL aralığında Δ^9 -THC için elde edilmiş kalibrasyon eğrisi (7 noktalı)

(response/ratio: etken maddenin detektör cevabının IS'nin detektör cevabına oranı;
 concentration/ratio: etken maddenin konsantrasyonunun IS'nin konsantrasyonuna oranı)

Tablo IX. 0.5-50 ng/mL aralığında çizilmiş olan kalibrasyon eğrisinin denklemi ve korelasyon katsayısı

Doğrusal Aralık	0.5-50 ng/mL (7 noktada)
Denklem	$y = 0.0213190x + 0.00431829$
Korelasyon Katsayısı (r^2)	0,9996

Analitin konsantrasyonundaki değişikliklere karşı cihazın ölçüm sinyalinde meydana gelen değişiklikler belirlendi ve söz konusu kalibrasyon noktaları, kalibrasyon denklemi ve korelasyon katsayısı belirlenmiştir (Tablo IX).

▪ **LOD, LOQ sonuçları:**

LOD ve LOQ çalışması için hazırlanan 10 adet boş yBOS numunesi ile yapılan analizden elde edilen ortalama, standart sapma ve %RSD değerleri Tablo X'da gösterildiği gibidir.

Tablo X. 10 adet boş yBOS örneğinin bulunan miktarı ($\mu\text{g/mL}$), standart sapma ve %RSD değerleri

Boş yBOS analizi (n=10)	Bulunan Miktar (ng/mL)
1. tekrar	0.383
2. tekrar	0.379
3. tekrar	0.370
4. tekrar	0.365
5. tekrar	0.375
6. tekrar	0.398
7. tekrar	0.369
8. tekrar	0.374
9. tekrar	0.388
10. tekrar	0.376
<i>Ortalama</i>	0,378
<i>Standart sapma</i>	0.010
<i>%RSD</i>	2.60

LOD ve LOQ hesaplamaları gereç ve yöntemler bölümünde 3.6.2’de belirtilen formüller ile yapıldı. Δ^9 -THC için LOD 0.41ng/mL, LOQ 0.48ng/mL bulundu.

▪ **Kesinlik sonuçları:**

Tekrarlanabilirlik çalışması için, 3 ayrı konsantrasyon için 6 tekrarlı olacak şekilde analizi yapılan yBOS örneklerinden sonra spike yapılarak elde edilen sonuçların ortalama, standart sapma ve bağıl standart sapma değerleri ve yedi gün sonra aynı çalışmanın tekrar edilmesi ile elde edilen sonuçlar Tablo XI’da gösterildiği gibidir.

Tablo XI. Gün içi ve günler arası tekrar edilebilirlik sonuçlarının karşılaştırılması

Numune (ng/mL)	Gün içi tekrar edilebilirlik			Günler arası tekrar edilebilirlik		
	Ortalama sonuç	Standart sapma	%RSD	Ortalama sonuç	Standart sapma	%RSD
0,5 ng/mL (n=6)	0,408	0,032	5,42	0,289	0,089	7,13
5 ng/mL (n=6)	4,14	0,11	3,05	2,95	0,24	5,38
50 ng/mL (n=6)	40,83	0,76	1,61	37,55	1,56	3,87

▪ **Geri kazanım sonuçları:**

% Geri kazanım Tablo XII ve Tablo XIII, XIV, XV'de gösterildiği gibidir.

Tablo XII. 0,5 ng/mL Δ^9 -THC içeren yBOS numunesinin sonra spike geri kazanım tablosu

0,5 ng/mL 'lik numune (n=6)	Teorik miktar (ng/mL)	Ölçülen sonuç (ng/mL)	% GK
1. tekrar	0.5	0.409	81.80
2. tekrar	0.5	0.399	79.80
3. tekrar	0.5	0.387	77.40
4. tekrar	0.5	0.413	82.60
5. tekrar	0.5	0.408	81.60
6. tekrar	0.5	0.406	81.20
Ortalama %GK			80.73
Standart Sapma			1.87
%RSD			2.31

Tablo XIII. 5 ng/mL Δ^9 -THC içeren yBOS numunesinin sonra spike geri kazanım tablosu

5 ng/mL 'lik numune (n=6)	Teorik miktar (ng/mL)	Ölçülen sonuç (ng/mL)	% GK
1. tekrar	5	4.12	82.40
2. tekrar	5	4.09	81.80
3. tekrar	5	3.95	79.00
4. tekrar	5	4.13	82.60
5. tekrar	5	4.18	83.60
6. tekrar	5	3.98	79.60
Ortalama %GK			81.50
Standart Sapma			1.81
%RSD			2.22

Tablo XIV. 50 ng/mL Δ^9 -THC içeren yBOS numunesinin sonra spike geri kazanım tablosu

50 ng/mL 'lik numune (n=6)	Teorik miktar (ng/mL)	Ölçülen sonuç (ng/mL)	% GK
1. tekrar	50	41.27	82.54
2. tekrar	50	40.89	81.78
3. tekrar	50	40.78	81.56
4. tekrar	50	41.18	82.36
5. tekrar	50	40.65	81.13
6. tekrar	50	41.12	82.40
Ortalama %GK			81.96
Standart Sapma			0.56
%RSD			0.68

Tablo XV. 1.0 ng/mL konsantrasyonla spike edilen yBOS örneğinin önce spike ve sonra spike verilerinin kıyaslanması

1.0 ng/mL 'lik numune (n=9)	Sonra spike(ng/mL)	Önce spike(ng/mL)
1. tekrar	1.081	0,978
2. tekrar	1.147	0,958
3. tekrar	1.078	0,934
4. tekrar	0.867	0,720
5. tekrar	0.877	0,735
6. tekrar	0.868	0,712
7. tekrar	0.963	0,871
8. tekrar	0.934	0,897
9. tekrar	0.766	0,688
Ortalama	0.950	0,833
Ortalama %GK	95.00	83.30
Standart Sapma	0.13	0.12
%RSD	13.70	0.14

▪ **Stabilite sonuçları:**

Stabilite çalışması için 5 ng/mL'lik 6 adet yBOS numunesi hazırlandı ve 7 gün aradan sonra aynı numune LC-MS/MS sisteminde yeniden analiz edildi. Yapılan çalışmaların ortalamaları ve 7 gün arasındaki yüzde değişim Tablo XVI'de gösterilmektedir.

Tablo XVI. 5 ng/mL Δ^9 -THC içeren yBOS numunesinin stabilite tablosu

	Konsantrasyon (ng/mL)
1. çalışma (ort)	4,02
2. çalışma (ort)	2,35
%Değişim	0,0167

5. TARTIŞMA

Esrar, dünyadaki en eski ve en çok istismar edilen ilaçlardan biridir ve kullanımını patolojik ve davranışsal toksisite ile ilişkilidir. Bu nedenle, kannabinoid toksikokinetiğini ve kannabinoidlerin biyolojik sıvılara ve dokulara dağılımını anlamak önemlidir. Bir ilacın toksikokinetiğini anlamak, toksikodinamik etkilerinin başlangıcını, büyüklüğünü ve süresini bilmek ve farklı yasa dışı maddelerle/ilaçlarla birlikte kullanıldığında ne gibi advers etkiler gösterdiğini anlamak için gereklidir. Kannabinoid toksikokinetiğini etkileyen pek çok etken vardır, bunların başlıcaları; kullanım türü ve yöntemi, karaciğer ve ekstra hepatik dokulardan metabolizasyonu ve dışkı, idrar, ter, oral sıvı ve saçta eliminasyonu olarak sayılabilir. Toksikokinetik süreçler dinamiktir, zamanla değişebilir ve toksine maruz kalma sıklığı ve büyüklüğünden etkilenebilir. 1970'li yıllardan beri kannabinoid toksikokinetiğini anlamak adına birçok katkı gözden geçirilmiş ve bu bilgiye dayanan son araştırmaların bulguları ayrıntılı olarak açıklanmıştır (85, 132, 133).

Cannabis sativa bitki türünün, 60'dan fazlası kannabinoid olan yaklaşık 421'den fazla farklı kimyasal bileşik içerdiği bilinmektedir (66). Kannabinoidlere özgü bitki kimyası saf THC'den çok daha karmaşıktır ve ek kanabinoidler ve diğer kimyasalların varlığı nedeniyle farklı etkiler beklenmelidir. Dolayısıyla diğer bitkisel içerikler gibi alımı sonrası birçok metabolite dönüştüğü ve düşük seviyede bulunduğu için plazmada tespiti oldukça zordur.

Esrarın ana metabolit olan THC-COOH aktif değildir; yoğun kronik kullanıcılarda uygulamadan 11 hafta sonrasına kadar olan örneklerde bile tespit edilebildiği görülmektedir.

THC-OH aktif bir metabolitidir ve uygulamayı takiben 15-20 dakika içinde pik konsantrasyona ulaştığı ve oldukça kısa yarı ömürlü olduğu hatta ilk inhalasyonun ardından dakikalar içinde kan ve dokular arasında hızla yeniden dağılıma uğradığı bilinmektedir. Bu nedenle, postmortem kanda hem THC hem de THC-OH varlığına ilişkin bir bilginin, ölen

kişinin kannabinoid kullanımı etkisi altında olduğuna dair önemli bir gösterge olduğu kesinlik kazanmıştır. Özellikle bir kurbanda 5 ng/mL'den daha yüksek bulunan bir THC konsantrasyonun, ölen kişinin esrar etkisi altında olduğu ihtimalini kuvvetlendirmektedir. Esrar sarhoşluğuna kanaat edilebilecek minimum postmortem konsantrasyonun 1.5 - 3 ng/mL arasında olduğu belirlenmiştir (85, 138).

Δ^9 -THC in kanda en yüksek konsantrasyonuna, oral uygulamayı takiben yaklaşık 5-8 saat sonra ortaya çıktığı görülmüştür (56). Ortalama bir insanda yaklaşık 20 mg THC dozunun inhalasyon yolu ile alımına bağlı pik plazma seviyesi 10 ng/mL olarak tespit edilmiştir (53).

THC'nin toksik doz aralığı, 5 mg/m³ oral THC alımı hafif derecede merkezi sinir sistemi semptomları ile tolere edilebilir iken 15 mg/m³ oral THC alımı ile daha ciddi merkezi sinir sistemi semptomları görülebilmektedir (53). İnsanda tahmini THC letal dozu kilogramda 30 mg olarak belirtilse de, belirgin şekilde THC'nin toksik veya letal dozunun belirlenmesi, maddenin saflık derecesi ve alım yoluna bağlı olduğundan oldukça zordur.

Bu nedenle, kanabinoidlerin ölümlerdeki rolünü daha doğru bir şekilde belirlemek için adli toksikoloji analizlerdeki herhangi bir belirleme yöntemine THC ve metabolitlerinin (THCOH ve THC-COOH) dahil edilmesi önemlidir (132).

Trafik kazasıyla ilgili ölümlerde veya diğer bazı durumlarda travma, bozunma ve aşırı kan kaybı gibi nedenlerle otopsilerden kan örnekleri her zaman alınamaz. Bu nedenle, toksikoloji analizi için diğer dokulardaki esrar metabolitlerinin saptanması önemlidir (139).

Bununla birlikte, çok az sayıda çalışma THC ve metabolitlerinin kan haricindeki diğer postmortem örneklerdeki dağılım modellerini bildirmektedir. Hem analit metabolizmasının hem de postmortem yeniden dağılımın zor ve karmaşık doğası nedeniyle, kannabinoidlerin rutin postmortem analizlere son dönemlerde eklendiği görülmektedir (132).

Esrar kullanımının en önenli riski, motor becerilerindeki deformasyon şeklinde görülmektedir. Esrar, tüketimini takiben yaklaşık üç saat süresince sürüş veya benzeri koordinasyon gerektiren görevleri bozabilir ve kaza yapan sürücülerde alkolden sonra belirlenen ikinci en yaygın psikoaktif maddedir. Özellikle tıbbi esrar alan kişilere de, tolere edebilecekleri ve motor görevleri başarıyla gerçekleştirebilecekleri belirlenene kadar araba kullanmamaları talimatı verilmektedir (148). Ayrıca THC'nin, şizofrenik semptomlarda nüksü tetikleyebilme potansiyeli olduğu kanıtlanmıştır (149).

Alım türü ve şekli, emilim oranının belirlenmesinde oldukça önemli parametrelerdir. Esrar maruziyetinde en önemli metot olan sigara olarak içilmesi, akciğerlerden beyne ilaç dağılımının hızlı ve etkili bir yöntemini sağlayarak kötüye kullanım potansiyeline oldukça önemli katkıda bulunmaktadır. Böylelikle MSS'ne neredeyse anında yoğun keyif ve güçlü takviye edici etkiler üretilebilmektedir. Sigara olarak tüketilmesi, intravenöz uygulamaya kıyasla biraz daha düşük kanda THC pik konsantrasyonu elde edilmesi demektir (52).

Ancak şu da bilinmelidir ki sigara olarak içilirken pufların sayısı, süresi ve aralığı, bekleme süresi ve inhalasyon hacmi veya sigara içme topografyası esrar maruziyetinin derecesini büyük ölçüde etkilemektedir (140).

THC'nin dokularda hızlı şekilde dağılımı ve karaciğerde hızlı metabolize olması nedeniyle sigara olarak içildikten hemen sonra plazma konsantrasyonunun hızla azaldığı bildirilmektedir (53). THC yüksek oranda lipofiliktir ve başlangıçta akciğer, kalp, beyin ve karaciğer gibi yüksek oranda geçirgenliği olan dokular tarafından emilir. Eser miktarda radyoaktif THC dozunun vücutta takip edilmesi ile, THC'nin geniş dağılım hacmine sahip ve vücut depolarından yavaşça salındığı tasdik edilmiştir. Hayvanlarda, etiketli THC'nin intravenöz uygulamasından sonra, akciğerde diğer dokulara göre daha yüksek konsantrasyonda olduğu gözlemlenmiştir(141).

THC'nin beyin içinde dağılımına ilişkin çalışmalar, THC dozu ve davranışsal etkiler arasındaki ilişkileri anlamak için oldukça önemlidir. Sıçanlara ^{14}C etiketli Δ^8 -THC'nin tek bir kas içi uygulamasından sonra, uygulanan dozun % 0.06'sını temsil eden miktarının 2–4 saat sonra beyinde maksimum radyoaktiviteye ulaştığı görülmüştür (142).

Plazma konsantrasyonlarının, marihuana dumanına maruz kalan erkeklerde ölçülenlere benzer oranda olduğu gözlemlenmiştir. Kreuz ve Axelrod, radyoaktif işaretli THC'nin, beyindeki sınırlı tutulmanın aksine, çoklu dozlardan sonra nötr yağda kalıcı ve tercihli olarak tutulmasını tanımlayan ilk kişiler olmuştur (143).

Yağın beyindeki THC konsantrasyonuna oranı, 7 gün üst üste maruz kaldıktan sonra yaklaşık 21:1 ve 27 gün sonrası ise 64:1 olmuştur. Diğer araştırmacılar ayrıca, radyoaktif olarak etiketlenmiş THC'nin uygulanmasından sonra beyinde tutulan THC miktarının uygulanan dozun % 1'inden daha az olduğunu bulmuşlardır (85). Uzun süreli maruziyeti ile THC'nin, insan yağ dokusunda yoğunlaştığı ve uzun süre muhafaza edildiği bilinmektedir (144). THC ve 11-OH-THC'nin yağ asidi konjugatlarının oluşabileceği ve bu bileşiklerin yağdaki stabilitesinin arttırılabileceği önerilmektedir (145).

THC'nin periferik organlara ve beyine dağılımının incelendiği bir diğer çalışmada esrara karşı tolerans gösteren ve göstermeyen köpekler üzerinde dağılımda bir farklılık olmadığı bulunmuştur(146).

Ayrıca, güvercinlerde THC'nin davranışsal etkilerine geliştirdikleri toleransın, kannabinoidlerin beyne alımının azalmasından kaynaklanmadığını bulmuşlardır. THC toleransının insanlarda değerlendirildiği çalışmalardan, Hunt ve Jones, insanlarda toleransın 10–12 gün boyunca her 4 saatte bir 30 mg THC oral uygulama sırasında geliştiğini bulmuşlardır (147).

THC'nin insan vücudunda ortalama toplam metabolik eliminasyonu dakikada 605'ten 977 ml'ye ve başlangıçtaki dağılım hacimlerinin kilogramda 2.6'dan 6.4 litreye yükselmesine

rağmen, kronik uygulama sırasında birkaç farmakokinetik değişiklik kaydedilmiştir. Kronik oral THC uygulamasından sonraki farmakokinetik değişiklikler, gözlemlenen davranışsal ve fizyolojik toleransı açıklayamadığı, bunun yerine toleransın farmakodinamik adaptasyona bağlı olduğunu düşündürmüştür (53).

Adams ve Martin, insanlarda farmakolojik etkileri başlatmak için gerekli THC dozunu incelemiştir (73). Sigara olarak tüketime bağlı maruziyeti olan THC için % 10–25 biyoyararlanım temel alındığında 0.2–4.4 mg THC'nin vücuda alınması için bir esrar sigarasının 2–22 mg esrar içermesi gerekmektedir. En yüksek konsantrasyonda bu dozun sadece % 1'i beyinde bulunmakta olup, bu da beyne sadece 2–44 µg THC'nin nüfuz ettiğini göstermektedir (73).

GC/MS ile 2005 yılında gerçekleştirilmiş ve oldukça ilginç bir çalışmada Mura ve ark. bir düzine postmortem olguda THC ve THC-COOH için ve ilaveten iki düzenli esrar kullanıcısında (inhalasyon) 11-OH-THC için eşleştirilmiş kan ve beyin örneklerini analiz etmişlerdir (74). Kan ve beyindeki THC konsantrasyonlarının sırasıyla <0.2 ila 11.5 ng/ml ve 0.9 ila 29.9 ng/g arasında değiştiği ve örnekler arasında bir korelasyon olmadığı, beyindeki konsantrasyon seviyelerinin her zaman kan seviyelerinden daha yüksek olduğu ve üç vakada artık kanda tespit edilememesine rağmen ölçülebilir miktarda beyinde kaldığı bildirilmiştir. Ayrıca lokusniger, hipokampus, oksipital lob, striatum-putamen-paladyum, frontal lob, omurilik ve korpuskalozum dahil olmak üzere tüm beyin bölgelerinde önemli konsantrasyonlarda THC, 11-OH-THC ve THC-COOH bulunduğu ve bunun genellikle $THC \geq THC-COOH > 11-OH-THC$ şeklinde olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte beyindeki THC-COOH konsantrasyonlarının da belirlenmesi gerektiği vurgulanmaktadır (74).

THC'nin dağılım hacmi (Volume of distribution - Vd), öncelikle lipoproteinlere olmak üzere % 95-99 protein bağlı olmasına rağmen yaklaşık kilogramda 10 L olarak oldukça büyüktür. THC-COOH ve THC-COOH glukuronit için protein bağlayıcı değerler uygun THC'ninkilerle

(yaklaşık% 97) benzerdir (75). Daha sonra gelişmiş analitik tekniklerinden faydalanılarak THC'nin kararlı durumdaki Vd değerinin kilogramda 3.4 L olduğu tahmin edilmiştir (145). 6.000 (veya üzeri) partisyon katsayısında nötral pH olarak ölçüldüğü THC-COOH'un ana ilaçtan daha az, glukuronitten daha çok lipofilik olduğu bulunmuştur (75).

Farklı uygulama yollarından sonra kanda bulunan THC glukuronidin fraksiyonu yeterince çözülmemiştir, ancak son zamanlarda, bu bileşiğin ayrılma katsayısı beklenmedik derecede pH 7.4'de yaklaşık 18 olarak yüksek bir yağı sever derecesi göstermiştir.

Literatürde, Δ^9 -THC'nin çeşitli biyolojik matrislerde tayinine yönelik farklı amaçlar için geliştirilen çeşitli analitik yöntemlerin olduğu görülmektedir (80-85). Diğer yasa dışı maddeler ile karşılaştırıldığında, biyolojik örneklerden kannabinoidlerin analizi bazı zorluklar ortaya koymaktadır. THC ve 11-OH-THC yüksek oranda lipofiliktir ve vücut sıvılarında düşük konsantrasyonlarda bulunur. Karmaşık örnek matrisleri, yani kan, ter veya saç, kannabinoidleri endojen lipidlerden ve proteinlerden ayırmak için çok aşamalı ekstraksiyonlar gerektirmektedir. Cam ve plastik kaplara yüksek afinitesi olması dolayısıyla kannabinoidlerin düşük geri kazanımlarından kaçınılmasına ve alternatif matris toplama gereçlerine dikkat edilmelidir (120-123).

THC ve THC-COOH ağırlıklı olarak kanın plazma fraksiyonunda bulunur, burada % 95-99'u lipoproteinlere bağlanır. Sadece her iki bileşiğin yaklaşık % 10'u eritrositlerde bulunur (124).

Kelly ve ark. yaptığı çalışmada, intravenöz yoldan sekiz erkeğe 5 mg THC uygulamış ve ardından GC/MS (tayin limiti THC ve THC-COOH için 1 ng/ml olarak) ile plazmada THC, THC-COOH ve THC-COOH-glukuronid konjugatlarını, 10 saate kadar alkalın hidrolizi uygulayarak ve uygulamaksızın olmak üzere 12 gün boyunca günde bir kez GC/MS ile görüntülemişlerdir (64).

Sık esrar kullanıcılarının plazmasındaki THC, THC-COOH ve THC-COOH – glukuronid konjugatının yarılanma ömürleri sırasıyla 116.8 dk, 5.2 g ve 6.8 g iken sık kullanıcı

olmayanlarda 93.3 dk, 6.2 g ve 3.7 g olarak belirlenmiştir. Sık kullananların %75'inde ve sık kullanmayanların %25'inde plazmalarında 12 gün sonunda konjuge THC-COOH tespit edilmiştir (64).

Al-Asmari ve ark 2019 yılında geliştirdikleri bizim yöntemimize gerek kullanılan enstrüman gerekse tercih edilen SPE ekstraksiyon yöntemi ve LC kolonu yönünden çok benzeyen bir çalışmada LC-MS yöntemi ile rutin postmortem örneklerde (kan, idrar, safra, mide içeriği, göz içi sıvısı), THC, THC-OH ve THC-COOH belirlenmesine yönelik hızlı bir yöntem geliştirmişlerdir. SPE Ekstraksiyonuna geçmeden önce kan ve göz içi sıvısı örneklerinde protein çöktürmesi uygulanırken, idrar, safra ve mide içeriği örneklerinde de alkali hidroliz uygulanmıştır. Kannabinoid kullanımı olduğu belirlenen 31 olguda THC, THC-OH ve THC-COOH dağılımı incelenmiştir.

Şimdiye kadar postmortem analizlerde THC ve metabolitlerini ekstrakte edebilen ve belirleyen yöntemler birçok çalışmada bildirilmiştir. Özellikle ekstraksiyon yöntemlerinde protein çökmesini takiben sıvı-sıvı ekstraksiyon (150, 151, 132), idrar analizi için alkaline hidrolizi (150, 152, 153) ve THC ve metabolitleri için idrarda enzimatik hidroliz (Saenz, Papoutsis) başta gelmektedir. Bunun yanında postmortem örneklerdeki analiz yöntemlerinin büyük çoğunluğunda sıvı-sıvı ekstraksiyonun kullanıldığı (132, 150, 151, 153) görülmektedir. Bununla birlikte önemli ön işlem adımları gerçekleştirildikten sonra SPE ekstraksiyonun THC, THC-OH ve THC-COOH için oldukça duyarlı ve seçici olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (150, 152,153, 154 ,155).

Klasik ince tabaka kromatografisi (3), gaz kromatografisi ve buna bağlı kütle spektrometrisi negatif iyon kimyasal mod (GC – MS-NIC) (17), gaz kromatografisi kütle spektrometrisi (GC-MS) (5, 13, 14, 19) ve sıvıkromatografi ile birleştiğindetandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) (8, 15, 16) gibi sistemlerin iyi bir ayrımın sağlanması ve uygun belirleme limitlerinin oluşturmak için kannabinoid analizine uygulandığı görülmüştür.

Çeşitli varyasyonda THC ve/veya metabolitleri için farklı biyolojik örneklerde tespitine yönelik LC-MS/MS başta olmak üzere pek çok yöntemin uygulandığı bilirse de (100) yapılan inceleme sonucunda Δ^9 -THC'nin BOS'ta kromatografik olarak validasyon analizine özgü şimdiye kadar bildirilmiş bir çalışma bulunmadığı görülmektedir.

Bugüne kadar adli olaylara ilişkin olgu çalışmaları ile ya da metot geliştirme adına THC'nin analizine özgü çalışmalar görülmektedir. Esrar alkol gibi sürüş güvenliğini bozduğu durumlarda, her iki tarafında ölümle sonuçlandığı kazalarda kazada kusuru olanın belirlenmesi gibi durumların aydınlatılmasında sıklıkla karşımıza çıkan bir yasa dışı madde türevidir ve dünya genelinde oldukça yoğun kullanılmaktadır. Ölüm sonrası ister klasik olan isterse yeni nesil olsun kannabinoidlerin kandan çok çabuk eliminasyona uğradığı bilindiği için kan konsantrasyonlarının zor yorumlanmasına sebep olmakta bu da madde varlığının tespiti ve miktar tayini için diğer numunelerin de tercih edilmesine sebep olmaktadır. 2015 yılında antipsikotiklerin çeşitli matrislerde saptanması ve miktarının belirlenmesine ilişkin yapılan bir derlemede, son dört yıla ait analitik yöntemlerin ve elde edilen verilerin değerlendirildiği görülmektedir. Bu çalışmaya göre LC-MS/MS tekniğinin özellikle kannabinoidlerin miktar tayini için son dönemde daha fazla tercih edildiği anlaşılmaktadır. Bu hassas tekniğin, sadece serum, plazma ve tam kanda değil, aynı zamanda oral sıvı, kurutulmuş kan lekeleri, saç, tırnak ve diğer vücut dokuları gibi düşük konsantrasyonlarında madde akümüle edebilen alternatif matrislerde de maddenin tayinini mümkün kıldığı görülmektedir (101). Ancak bir maddenin herhangi bir biyolojik örnekten belirlenmesinde hassas analitik tekniklerden daha önemlisi, maddenin matristen ekstraksiyonunda uygulanacak manipülasyonun gücüdür. Dolayısıyla alternatif matrisler için geçerliliği kanıtlanmış analitik teknikler hakkındaki mevcut literatürün hala sınırlı sayıda olduğu görülmektedir.

Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST-National Institute of Standards and Technology) misyonu gereği, metroloji bilimini, standartlarını ve teknolojisini geliştirerek

yenilikçi ve endüstriyel rekabetçiliği teşvik eden bir kurumdur. Bu bağlamda adli toksikoloji hizmeti sunan laboratuvarlarda ölçüm kalitesinin de artırılması gerekliliğinden yola çıkarak NIST 1990'larda, yasa dışı maddelerin çeşitli matrislerde daha iyi kalitatif ve kantitatif ölçüm yapılması için bir dizi laboratuvarlar arası çalışma düzenlemiştir (102).

Katılımcı laboratuvarlara önceden hazırlanmış biyolojik örnekler gönderilmiş ve hangi bileşiklerin olduğunu ve konsantrasyonları hakkında bilgi vermeleri istenmiştir. Laboratuvarlar analiz için yöntem seçme konusunda özgür bırakılmışlardır. Laboratuvarların çoğunun, GC/MS ve LC-MS/MS'e dayalı yöntemler kullandığı gözlenmiştir. Bu seri çalışmasından elde edilen sonuçlarla laboratuvarlar arasında rutin deneyimi fazla olanın deneyimi az olana göre gerçek değere daha yakın olduğu belirlenmiştir. Bu seri çalışmasında sunulan biyolojik örnekler, söz konusu etken maddenin çözeltileri ile muamele edilerek hazırlanan biyolojik örneklere benzer şekilde oldukça homojen olmasına rağmen sonuçların laboratuvarlar arasında oldukça dağılım gösterdiği gözlemlenmiştir (8,9).

Bir etken madde için BOS örneğinin analizinin yaygın olarak kabul görmesinden önce, idrar ve kan gibi örneklerde olduğu gibi etken maddenin benzer şekilde en az tayin limitlerinin belirlenmesine ihtiyaç duyulmuştur. Bu limit değerlerin belirlenmesi için de laboratuvarların, BOS gibi bir örnekte düşük seviyelerde birikim yapan etken maddeler üzerinde iyi analiz yapma yeteneklerini göstermeleri gerekmiştir. Yukarıda belirtildiği gibi, NIST'in uyguladığı seri çalışmada laboratuvarların kantitatif sonuçlarında büyük farklılıklar gözlemlendiği için, bu ölçüm problemini gidermek adına yapay biyolojik örnekler bazlı CRM geliştirmeyi üstlenmiştir (10). O dönemde CRM'deki söz konusu analitlerin GC/MS bazlı yöntemlerle belirlendiği görülse de, günümüzde bu hassas ölçümler için sıklıkla LC-MS/MS'in tercih edildiği görülmektedir. Bu çalışma adli toksikolojide önemli bir yasa dışı madde olan Δ^9 -THC'nin insan BOS örneklerinde belirlenmesinde matris etkisinin anlaşılması için yöntem geliştirmeyi ve buna bağlı validasyon parametrelerini açıklamayı amaç edinmiştir. Söz konusu

örnekler, yapay olarak hazırlanan BOS örneklerine Δ^9 -THC in uygun konsantrasyonlarını içeren çözeltiler spike edilerek hazırlanmıştır. Analitin seviyeleri ve THC-COOH D-3 (IS) bir LC-MS/MS sistemi ile bağımsız yöntem kullanılarak ölçülmüştür.

Yukarıda bahsi geçen çalışmalardan da anlaşılacağı üzere, dünya genelinde en sık istismar edilen ve adli toksikolojinin önemli bir konusu olan esrar bağımlılığı ve kullanımının en önemli belirteci olan Δ^9 -THC etken maddesinin farklı analitik teknikler kullanılarak farklı matrislerde analiz edildiği görülmektedir. Her analitik tekniğin farklı matrislere göre değişkenlik gösterebildiği görülmektedir. Bizim çalışmamızda da yapay BOS örneğinde Δ^9 -THC etken maddesi için LC-MS/MS sisteminde, SPE ile kolay ve hızlı çekitleme aşaması ile bir analiz yöntemi geliştirilmiştir.

Çalışmaya ait doğrusallık sonuçları Tablo IX'de verildiği gibidir. 7 noktalı kalibrasyon çözeltisi sonuçlarına göre Δ^9 -THC in doğrusal aralığı 0,5-50 ng/mL olarak belirlenmiştir. Bu aralıktaki korelasyon katsayısı $R^2 = 0.9996$ olarak bulunmuştur. Elde edilen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.41 ng/mL ve 0.48 ng/mL'dir. yBOS örneği üzerinde yapılan sonra spike verilerine göre geri kazanım yüzdesi 0.5 ng/mL'lik konsantrasyonda 80.73 ± 1.87 ; 5 ng/mL'lik konsantrasyonda 81.50 ± 1.81 ; 50 ng/mL'lik konsantrasyonda 81.96 ± 0.56 bulunmuştur. Önce spike ve sonra spike verileri ile matris etkisinin anlaşılması için yapılan 9 tekrarlı deneyler sonucunda, önce spike geri kazanım sonuçlarının (83.30) sonra spike geri kazanım sonuçlarına (95.0) göre kısmen azaldığı görülmektedir. Gün içi tekrar edilebilirlik için 3 ayrı konsantrasyonda çalışılan geri kazanım numunelerinden; 0.5 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 0.408 ± 0.032 ng/mL, bağıl standart sapma değeri 5.42, 5 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 4.14 ± 0.11 ng/mL, bağıl standart sapma değeri 3.05, 50 ng/mL konsantrasyondaki 6 adet örneğin ortalaması 40.83 ± 0.76 olarak tespit edildi. Günler arası tekrar edilebilirlik için 3 ayrı konsantrasyonda çalışılan geri kazanım numunelerinden; 0.5 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması

0.289±0.089 ng/mL, bağıl standart sapma değeri 7.13, 5 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 2.95±0.24 ng/mL, bağıl standart sapma değeri 5.38, 50 ng/mL konsantrasyonundaki 6 adet örneğin ortalaması 37.55±1.56 ng/mL, bağıl standart sapma değeri 3.87 olarak tespit edilmiştir. Hem günüçi hem de günler arası tekrar edilebilirlik çalışması sonuçlarında bağıl standart sapma değerlerinin <20 olduğu gözlemlendi. Bu da yöntemin tekrar edilebilir olduğunu göstermektedir. Stabilitate çalışması için 7 gün ara ile analiz edilen örneklerdeki değişim %0.0167 bulunmuştur (Tablo XVI). Bu değer %1'in altında kaldığından geliştirilen yöntemin stabilitesi böylelikle kanıtlanmıştır.

Çalışmamızdaki geri kazanım oranı kabul edilebilir sınırlarda olduğu görüldü. Bununla birlikte şimdiye kadar yBOS'ta Δ^9 -THC validasyonuna yönelik bir yöntemin olmamasına rağmen diğer biyolojik örneklerdeki Δ^9 -THC tayini çalışmaları ile karşılaştırıldığında benzer veya daha yüksek limit değerlerde olduğu belirlenmiştir (80-85). Çalışmamızda valide edilen LC-MS/MS yönteminin doğrusal aralığının, diğer analitik sistemlerden daha hassas özelliğe sahip olması neticesinde 7 basamaklı olarak ayarlandığı ve 0.9996 gibi bir korelasyon katsayısı ile farklı dedektörlerle yapılan çalışmalardan daha hassas olduğu bu sayede, geniş aralıkta kantitatif analiz yapılabileceğini göstermektedir. Bu nedenle her türlü ölümle sonuçlanan olgularda kan örneğinin erişilemediği durumlarda BOS örneğinden THC maddesinin varlığı araştırılabilir ve varlığı bilimsel kanıtlara dayandırılabilir analiz imkanı sağlamaktadır. yBOS örneğinden Δ^9 -THC gibi adli toksikolojide önem arz eden bir etken maddenin, SPE ve takiben LC-MS/MS gibi hızlı ve güvenilir yöntemlerle tayin edilmesi adli toksikolojidepostmortem olgularda Δ^9 -THC in dışlanması adına adaletle önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, Δ^9 -THC gibi en eski ve en çok istismar edilen, trafik kazalarında alkolden sonra kurbanlarının kanında en sık bulunan ve özellikle son dönemde tedavi amacıyla kullanımıyla da karşımıza çıkan bir etken maddesinin yBOS örneğinden kantitatif analizine

özgü LC-MS/MS yöntemi geliştirmek amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda, yapay olarak oluşturulan bir BOS örneğinde etken maddenin matris içindeki tayin limitleri ve analizdeki etkileri, geri kazanım verimliliği, doğruluk, kesinlik ve stabilite gibi pek çok önemli validasyon parametresi belirlenebilmiştir. Bu sayede düşük orta ve yüksek konsantrasyonlarda tekrarlanabilir, kesin, kabul edilebilir geri kazanım verimine sahip ve güvenilir aralıklarda sonuç veren bir yöntem valide edilmiş olup; geliştirilen bu yöntem uzun süre arazide kalmış, pütrifiye olmuş dolayısıyla kan ve idrar gibi rutin biyolojik örneklerin bulunamadığı post-mortem olgularda beyin omurilik sıvısında Δ^9 -THC in analizini mümkün kılacağı düşünülmektedir.

Dünyada Δ^9 -THC etken maddesinin diğer biyolojik örneklerden belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılmışsa da yapay BOS örneğinden tespitine yönelik bir çalışma olmadığından, bu çalışmanın literatüre katkısının önemli olduğu düşünülmektedir.

6.SONUÇ

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, kötüye kullanımı en yaygın yasa dışı maddelerden biri olan esrarın ana etken maddesi Δ^9 -THC'nin, modifikasyon yapılarak hazırlanan yapay BOS örneğinden SPE yöntemi kullanılarak ekstre edilmesi ve LC/MS/MS cihazı kullanılarak analizinin yapılması ile validasyonu gerçekleştirilmiştir. Validasyon çalışması kapsamında doğrusallık ve kalibrasyon eğrisi, LOD ve LOQ, geri kazanım, ve stabilite çalışmaları yapılmıştır. İleriki çalışmalar ile Δ^9 -THC'nin diğer metabolitlerini de kapsayan daha düşük tayin limitlerine ulaşabilecek, daha hassas yöntemlerin geliştirilmesi ve geliştirilen bu yöntemin gerçek örneklerle doğrulanması hedeflenmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Engelhart DA, Jenkins AJ. Comparison of drug concentrations in postmortem cerebrospinal fluid and blood specimens. *J Anal Toxicol.* 2007;31(9):581-587.
2. Griffiths, J. L. *An investigation of the use of alternative matrices in clinical and forensic toxicology* (MSc tezi). University of Birmingham, 2013.
3. Tominaga M, Michiue T, Ishikawa T, Inamori-Kawamoto O, Oritani S, Maeda H. Evaluation of postmortem drug concentrations in cerebrospinal fluid compared with blood and pericardial fluid. *Forensic Sci Int.* 2015;254:118-125.
4. Öztürk M. Beyin omurilik sıvısında nitrotirozin, nitrat ve nitrit için tayin yönteminin geliştirilmesi (MSc tezi). Ondokuz Mayıs Üniversitesi, 2012.
5. McIntosh AL, Martin GG, Huang H, Landrock D, Kier AB, Schroeder F. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol induces endocannabinoid accumulation in mouse hepatocytes: antagonism by *Fabp1* gene ablation. *J Lipid Res.* 2018;59(4):646-657.
6. Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E. Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2004, 23:7:480-490.
7. Leweke FM, Giuffrida A, Wurster U, Emrich HM, Piomelli D. Elevated endogenous cannabinoids in schizophrenia. *Neuroreport.* 1999;10(8):1665-1669.
8. Formichi P, Battisti C, Radi E, Federico A. Cerebrospinal fluid tau, A beta, and phosphorylated tau protein for the diagnosis of Alzheimer's disease. *J Cell Physiol.* 2006;208(1):39-46.
9. Lescuyer P, Allard L, Zimmermann-Ivol CG, Burgess JA, Hughes-Frutiger S, Burkhard PR ve ark. Identification of post-mortem cerebrospinal fluid proteins as potential biomarkers of ischemia and neurodegeneration. *Proteomics.* 2004;4(8):2234-2241.
10. Pragst F, Spiegel K, Leuschner U, Hager A. Detection of 6-acetylmorphine in vitreous humor and cerebrospinal fluid--comparison with urinary analysis for proving heroin administration in opiate fatalities. *J Anal Toxicol.* 1999;23(3):168-172.
11. Jones G. Postmortem Toxicology. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, editorler. Clarke's Analysis of drugs and poisons. London: Pharmaceutical Press, 2011; 176-189.
12. Liu X, Van Natta K, Yeo H, Vilenski O, Weller PE, Worboys PD ve ark. Unbound drug concentration in brain homogenate and cerebral spinal fluid at steady state as a surrogate for unbound concentration in brain interstitial fluid. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(4):787-793.
13. Nagaya Y, Nozaki Y, Takenaka O, Watari R, Kusano K, Yoshimura T ve ark. Investigation of utility of cerebrospinal fluid drug concentration as a surrogate for interstitial fluid concentration using microdialysis coupled with cisternal cerebrospinal fluid sampling in wild-type and *Mdr1a(-/-)* rats. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2016;31(1):57-66.
14. Gaoni Y, Mechoulam R. The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. *J Am Chem Soc.* 1971;93(1):217-224.
15. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G ve ark. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 1992;258(5090):1946-1949.

16. Felder CC, Veluz JS, Williams HL, Briley EM, Matsuda LA. Cannabinoid agonists stimulate both receptor- and non-receptor-mediated signal transduction pathways in cells transfected with and expressing cannabinoid receptor clones. *Mol Pharmacol.* 1992;42(5):838-845.
17. Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature.* 1990;346(6284):561-564.
18. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993;365(6441):61-65.
19. Pertwee RG. Targeting the endocannabinoid system with cannabinoid receptor agonists: pharmacological strategies and therapeutic possibilities. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012;367(1607):3353-3363.
20. Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M. Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev.* 2009;89(1):309-380.
21. Pertwee RG, Ross RA. Cannabinoid receptors and their ligands. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002;66(2-3):101-121.
22. Gaoni Y, Mechoulam R. Isolation, structure, and partial synthesis of an active constituent of hashish. *Journal of the American chemical society,* 1964, 86.8: 1646-1647.
23. Meola SD, Tearney CC, Haas SA, Hackett TB, Mazzaferro EM. Evaluation of trends in marijuana toxicosis in dogs living in a state with legalized medical marijuana: 125 dogs (2005-2010). *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 2012;22(6):690-696.
24. Li HL. An archaeological and historical account of cannabis in China. *Economic Botany,* 1974, 28.4: 437-448.
25. ElSohly MA. Chemical constituents of cannabis. Russo E, Grotenhermen F, editorler. Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential. New york: The Haworth Integrative Healing Press, 2013; 27-36.
26. Newton DE. Marijuana: a reference handbook. 1.baskı Santa Barbara: ABC-CLIO, 2013.
27. Meier MH, Caspi A, Ambler A, Harrington HL, Houts R, Keefe RSE ve ark. Persistent cannabis users show neuropsychological decline from childhood to midlife. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(40):E2657-E2664.
28. Galli JA, Sawaya RA, FriedenberG FK. Cannabinoid hyperemesis syndrome. *Curr Drug Abuse Rev.* 2011;4(4):241-249.
29. Hasin DS, Saha TD, Kerridge BT, Goldstein RB, Chou SP, Zhang H ve ark. Prevalence of Marijuana Use Disorders in the United States Between 2001-2002 and 2012-2013. *JAMA Psychiatry.* 2015;72(12):1235-1242.
30. Winters KC, Lee CY. Likelihood of developing an alcohol and cannabis use disorder during youth: association with recent use and age. *Drug Alcohol Depend.* 2008;92(1-3):239-247.
31. Hall W, Degenhardt L. Prevalence and correlates of cannabis use in developed and developing countries. *Curr Opin Psychiatry.* 2007;20(4):393-397.
32. Degenhardt L, Coffey C, Carlin JB, Swift W, Moore E, Patton GC. Outcomes of occasional cannabis use in adolescence: 10-year follow-up study in Victoria, Australia. *Br J Psychiatry.* 2010;196(4):290-295.
33. Pertwee RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabivarin. *Br J Pharmacol.* 2008;153(2):199-215.
34. Russo E, Guy GW. A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med Hypotheses.* 2006;66(2):234-246.

35. Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance. *Endocr Rev.* 2006;27(1):73-100.
36. Pertwee RG. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *Int J Obes (Lond).* 2006;30 Suppl 1:S13-S18.
37. Kenney SP, Kekuda R, Prasad PD, Leibach FH, Devoe LD, Ganapathy V. Cannabinoid receptors and their role in the regulation of the serotonin transporter in human placenta. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;181(2):491-497.
38. Izzo AA. Cannabinoids and intestinal motility: welcome to CB2 receptors. *Br J Pharmacol.* 2004;142(8):1201-1202.
39. <http://fblt.cz/en/skripta/regulacni-mechanismy-2-nervova-regulace/12-likvor-hematoencefalicka-a-hematolikvorova-bariera/> (Son erişim tarihi: 19.08.2020)
40. Drummer OH. Postmortem toxicology of drugs of abuse. *Forensic Sci Int.* 2004;142(2-3):101-113.
41. Bachs L, Mørland H. Acute cardiovascular fatalities following cannabis use. *Forensic Sci Int.* 2001;124(2-3):200-203.
42. Gupta BD, Jani CB, Shah PH. Fatal 'Bhang' poisoning. *Med Sci Law.* 2001;41(4):349-352.
43. Flanagan RJ, Taylor A, Watson ID, Whelpton R. Fundamentals Of Analytical Toxicology. 1. Baskı Chichester: John Wiley & Sons, 2007.
44. https://www.researchgate.net/figure/A-Schematic-diagram-of-a-triple-quadrupole-mass-spectrometer-QQQ-MS-Typical-SRM_fig4_224940197 (Son erişim tarihi: 19.08.2020)
45. Sakka L, Coll G, Chazal J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2011;128(6):309-316.
46. Allen CMC, Lueck CJ, Dennis M. Neurological disease. Colledge NR, Walker BR, Ralston SH, editorler. Davidson's principles and practice of medicine. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier, 2010; 1221.
47. Hocking G, Wildsmith JA. Intrathecal drug spread. *Br J Anaesth.* 2004;93(4):568-578.
48. <https://www.cancercenter.com/treatment-options/chemotherapy/regional-therapies> (Son erişim tarihi: 19.08.2020)
49. Wright BL, Lai JT, Sinclair AJ. Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: a practical review. *J Neurol.* 2012;259(8):1530-1545.
50. Hajdu SI. A note from history: discovery of the cerebrospinal fluid. *Ann Clin Lab Sci.* 2003;33(3):334-336.
51. Lazenka MF, Selley DE, Sim-Selley LJ. Brain regional differences in CB1 receptor adaptation and regulation of transcription. *Life Sci.* 2013;92(8-9):446-452.
52. Huestis MA, Smith ML. Cannabinoid pharmacokinetics and disposition in alternative matrices. Pertwee RG editor. Handbook of Cannabis. Oxford: Oxford University Press, 2014; 296-316.
53. Huestis MA. Pharmacokinetics and metabolism of the plant cannabinoids, delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol. *Handb Exp Pharmacol.* 2005;(168):657-690.
54. Bergamaschi MM, Karschner EL, Goodwin RS, Scheidweiler KB, Hirvonen J, Queiroz RHC ve ark. Impact of prolonged cannabinoid excretion in chronic daily cannabis smokers' blood on per se drugged driving laws. *Clin Chem.* 2013;59(3):519-526.
55. Gaillard Y, Breuil R, Doche C, Romeuf L, Lemeur C, Prevosto JM ve ark. Detection of amitriptyline, nortriptyline and bromazepam in liver, CSF and hair in the homicidal poisoning of a one-month-old girl autopsied 8 months after death. *Forensic Sci Int.* 2011;207(1-3):e16-e18.

56. Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü. Madde Bağımlılığı Tanı ve Tedavi Kılavuzu El Kitabı. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, 2012.
57. Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J ve ark. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol*. 2007;152(7):1092-1101.
58. https://www.erowid.org/plants/cannabis/cannabis_chemistry.shtml (Son erişim tarihi: 19.08.2020)
59. Peyron PA, Lehmann S, Delaby C, Baccino E, Hirtz C. Biochemical markers of time since death in cerebrospinal fluid: A first step towards "Forensomics". *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2019;56(4):274-286.
60. Nieddu M, Boatto G, Serra D, Soro A, Lorenzoni S, Lubinu F. HPLC-DAD determination of mepivacaine in cerebrospinal fluid from a fatal case. *J Forensic Sci*. 2007;52(5):1223-1224.
61. https://brainbarriers4you.eu/files/img/csf_brain_legend.png (Son erişim tarihi: 19.08.2020)
62. Agar E. The role of cannabinoids and leptin in neurological diseases. *Acta Neurol Scand*. 2015;132(6):371-380.
63. Huestis MA. Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem Biodivers*. 2007;4(8):1770-1804.
64. Kelly P, Jones RT. Metabolism of tetrahydrocannabinol in frequent and infrequent marijuana users. *J Anal Toxicol*. 1992;16(4):228-235.
65. Nahas GG, Frick HC, Lattimer JK, Latour C, Harvey D. Pharmacokinetics of THC in brain and testis, male gametotoxicity and premature apoptosis of spermatozoa. *Hum Psychopharmacol*. 2002;17(2):103-113.
66. Turner CE, Elsohly MA, Boeren EG. Constituents of Cannabis sativa L. XVII. A review of the natural constituents. *J Nat Prod*. 1980;43(2):169-234.
67. Perez-Reyes M. Marijuana Smoking: Factors That Influence the Bioavailability of. *Research findings on smoking of abused substances*. 1990; 99: 42.
68. Lemberger L, Silberstein SD, Axelrod J, Kopin IJ. Marijuana: studies on the disposition and metabolism of delta-9-tetrahydrocannabinol in man. *Science*. 1970;170(3964):1320-1322.
69. Kreuz DS, Axelrod J. Delta-9-tetrahydrocannabinol: localization in body fat. *Science*. 1973;179(4071):391-393.
70. Grotenhermen F. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(4):327-360.
71. Dewey WL, McMillan DE, Harris LS, Turk RF. Distribution of radioactivity in brain of tolerant and nontolerant pigeons treated with 3 H- 9 -tetrahydrocannabinol. *Biochem Pharmacol*. 1973;22(3):399-405.
72. Hunt CA, Jones RT. Tolerance and disposition of tetrahydrocannabinol in man. *J Pharmacol Exp Ther*. 1980;215(1):35-44.
73. Adams IB, Martin BR. Cannabis: pharmacology and toxicology in animals and humans. *Addiction*. 1996;91(11):1585-1614.
74. Mura P, Kintz P, Dumestre V, Raul S, Hauet T. THC can be detected in brain while absent in blood. *J Anal Toxicol*. 2005;29(8):842-843.
75. Skopp G, Pötsch L, Mauden M, Richter B. Partition coefficient, blood to plasma ratio, protein binding and short-term stability of 11-nor-Delta(9)-carboxy tetrahydrocannabinol glucuronide. *Forensic Sci Int*. 2002;126(1):17-23.

76. Johansson E, Norén K, Sjövall J, Halldin MM. Determination of delta 1-tetrahydrocannabinol in human fat biopsies from marihuana users by gas chromatography-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr.* 1989;3(1):35-38.
77. Al-Asmari AI. Method for Postmortem Quantification of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Metabolites Using LC-MS-MS [published correction appears in *J Anal Toxicol.* 2020 Apr 30;44(3):e1]. *J Anal Toxicol.* 2019;43(9):703-719.
78. Lin DL, Lin RL. Distribution of 11-nor-9-carboxy-Delta9-tetrahydrocannabinol in traffic fatality cases. *J Anal Toxicol.* 2005;29(1):58-61.
79. Gronewold A, Skopp G. A preliminary investigation on the distribution of cannabinoids in man. *Forensic Sci Int.* 2011;210(1-3):e7-e11.
80. Lemos NP, San Nicolas AC, Volk JA, Ingle EA, Williams CM. Driving Under the Influence of Marijuana Versus Driving and Dying Under the Influence of Marijuana: A Comparison of Blood Concentrations of Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, 11-Hydroxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol, 11-Nor-9-Carboxy- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and Other Cannabinoids in Arrested Drivers Versus Deceased Drivers. *J Anal Toxicol.* 2015;39(8):588-601.
81. Kemp PM, Cardona PS, Chaturvedi AK, Soper JW. Distribution of $\Delta(9)$ -Tetrahydrocannabinol and 11-Nor-9-Carboxy- $\Delta(9)$ -Tetrahydrocannabinol Acid in Postmortem Biological Fluids and Tissues From Pilots Fatally Injured in Aviation Accidents. *J Forensic Sci.* 2015;60(4):942-949.
82. Papoutsis I, Nikolaou P, Dona A, Pistos C, Stefanidou M, Spiliopoulou C ve ark. A validated GC-MS method for the determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in bile samples. *Forensic Toxicology.* 2012; 30(1): 51-58.
83. Fabritius M, Staub C, Mangin P, Giroud C. Distribution of free and conjugated cannabinoids in human bile samples. *Forensic Sci Int.* 2012;223(1-3):114-118.
84. Saenz SR, Lewis RJ, Angier MK, Wagner JR. Postmortem Fluid and Tissue Concentrations of THC, 11-OH-THC and THC-COOH. *J Anal Toxicol.* 2017;41(6):508-516.
85. Holland MG, Schwoppe DM, Stoppacher R, Gillen SB, Huestis MA. Postmortem redistribution of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC (11-OH-THC), and 11-nor-9-carboxy-THC (THCCOOH). *Forensic Sci Int.* 2011;212(1-3):247-251.
86. Shaw LM, Hansson O, Manuilova E, Masters CL, Doecke JD, Li QX ve ark. Method comparison study of the Elecsys® β -Amyloid (1-42) CSF assay versus comparator assays and LC-MS/MS. *Clin Biochem.* 2019;72:7-14.
87. Cairns T, Hill V, Schaffer M, Thistle W. Amphetamines in washed hair of demonstrated users and workplace subjects. *Forensic Sci Int.* 2004;145(2-3):137-142.
88. Ambach L, Hernández Redondo A, König S, Weinmann W. Rapid and simple LC-MS/MS screening of 64 novel psychoactive substances using dried blood spots. *Drug Test Anal.* 2014;6(4):367-375.
89. Weinmann W, Schaefer P, Thierauf A, Schreiber A, Wurst FM. Confirmatory analysis of ethylglucuronide in urine by liquid-chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry according to forensic guidelines. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2004;15(2):188-193.
90. Dresen S, Weinmann W, Wurst FM. Forensic confirmatory analysis of ethyl sulfate--a new marker for alcohol consumption--by liquid-chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2004;15(11):1644-1648.

91. Peters FT, Remane D. Aspects of matrix effects in applications of liquid chromatography-mass spectrometry to forensic and clinical toxicology--a review. *Anal Bioanal Chem.* 2012;403(8):2155-2172.
92. Basher A, Faiz MA, Arif SM, Khandaker MAK, Kuch U, Toennes SW. Toxicological Screening of Drug Facilitated Crime among Travelers in Dhaka, Bangladesh. *Asia Pacific Journal of Medical Toxicology.* 2017; 6(2): 47-49.
93. Knoop A, Thomas A, Fichant E, Delahaut P, Schänzer W, Thevis M. Qualitative identification of growth hormone-releasing hormones in human plasma by means of immunoaffinity purification and LC-HRMS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408(12):3145-3153.
94. Semenistaya E, Zvereva I, Krotov G, Rodchenkov G. Solid-phase extraction of small biologically active peptides on cartridges and microelution 96-well plates from human urine. *Drug Test Anal.* 2016;8(9):940-949.
95. Magdy MA, Abdelfatah RM. Green validated HPTLC and HPLC methods for determination of ephedrine hydrochloride and naphazoline nitrate in the presence of methylparaben, in their pure forms and pharmaceutical formulation. *JPC-J Planar Chromat.* 2020; 33: 141–148.
96. Begcevic I, Brinc D, Drabovich AP, Batruch I, Diamandis EP. Identification of brain-enriched proteins in the cerebrospinal fluid proteome by LC-MS/MS profiling and mining of the Human Protein Atlas. *Clin Proteomics.* 2016;13:11.
97. Irie K, Nanjo S, Hata A, Yamasaki Y, Okada Y, Katakami N ve ark. Development of an LC-MS/MS-based method for quantitation of osimertinib in human plasma and cerebrospinal fluid. *Bioanalysis.* 2019;11(9):847-854.
98. Fogh JR, Jacobsen AM, Nguyen TTTN, Rand KD, Olsen LR. Investigating surrogate cerebrospinal fluid matrix compositions for use in quantitative LC-MS analysis of therapeutic antibodies in the cerebrospinal fluid. *Anal Bioanal Chem.* 2020;412(7):1653-1661.
99. Speicher KD, Kolbas O, Harper S, Speicher DW. Systematic analysis of peptide recoveries from in-gel digestions for protein identifications in proteome studies. *J Biomol Tech.* 2000;11(2):74-86.
100. Josefsson M, Roman M, Skogh E, Dahl ML. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of olanzapine and N-desmethyloanzapine in human serum and cerebrospinal fluid. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;53(3):576-582.
101. Blanco ME, Mayo OB, Bandiera T, Tonelli DP, Armirotti A. LC-MS/MS analysis of twelve neurotransmitters and amino acids in mouse cerebrospinal fluid. *J Neurosci Methods.* 2020;341:108760.
102. Strasinger SK, Di Lorenzo MS. Urinalysis and body fluids. 6. Baskı Philadelphia: F. A. Davis Company, 2014.
103. Ashton CH. Pharmacology and effects of cannabis: a brief review. *Br J Psychiatry.* 2001;178:101-106.
104. <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/marihuana/med/infoprof-eng.php> (Son erişim tarihi: 19.08.2020)
105. McGilveray IJ. Pharmacokinetics of cannabinoids. *Pain Res Manag.* 2005;10 Suppl A:15A-22A.
106. Schwilke EW, Schwöpe DM, Karschner EL, Lowe RH, Darwin WD, Kelly DL ve ark. Delta9-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC plasma pharmacokinetics during and after continuous high-dose oral THC. *Clin Chem* 2009; 55:2180.
107. Tanasescu R, Constantinescu CS. Pharmacokinetic evaluation of nabiximols for the treatment of multiple sclerosis pain. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013;9(9):1219-1228.

108. Toennes SW, Ramaekers JG, Theunissen EL, Moeller MR, Kauert GF. Comparison of cannabinoid pharmacokinetic properties in occasional and heavy users smoking a marijuana or placebo joint. *J Anal Toxicol*. 2008;32(7):470-477.
109. Cooper ZD, Haney M. Comparison of subjective, pharmacokinetic, and physiological effects of marijuana smoked as joints and blunts. *Drug Alcohol Depend*. 2009;103(3):107-113.
110. Perez-Reyes M, Wall ME. Presence of delta9-tetrahydrocannabinol in human milk. *N Engl J Med*. 1982;307(13):819-820.
111. Devine ML, Dow GJ, Greenberg BR, Holstein DW, Icaza L, Jue PY ve ark. Adverse reactions to delta-9-tetrahydrocannabinol given as an antiemetic in a multicenter study. *Clin Pharm*. 1987;6(4):319-322.
112. Dow GJ, Meyers FH, Stanton W, Devine ML. Serious reactions to oral delta-9-tetrahydrocannabinol in cancer chemotherapy patients. *Clin Pharm*. 1984;3(1):14.
113. Zuurman L, Ippel AE, Moin E, van Gerven JM. Biomarkers for the effects of cannabis and THC in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 2009;67(1):5-21.
114. Hall W, Solowij N. Adverse effects of cannabis. *Lancet*. 1998;352(9140):1611-1616.
115. Kalant H. Adverse effects of cannabis on health: an update of the literature since 1996. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004;28(5):849-863.
116. Linszen D, van Amelsvoort T. Cannabis and psychosis: an update on course and biological plausible mechanisms. *Curr Opin Psychiatry*. 2007;20(2):116-120.
117. Barkus E. High-potency cannabis increases the risk of psychosis. *Evid Based Ment Health*. 2016;19(2):54.
118. Di Forti M, Marconi A, Carra E, Fraietta S, Trotta A, Bonomo M ve ark. Proportion of patients in south London with first-episode psychosis attributable to use of high potency cannabis: a case-control study. *Lancet Psychiatry*. 2015;2(3):233-238.
119. Mundt AL, Shanahan K. Graff's textbook of routine urinalysis and body fluids. 2. Baskı Philadelphia: Wolters Kluwer, 2011.
120. <https://www.fda.gov/news-events/public-health-focus/lung-injuries-associated-use-vaping-products> (Son erişim tarihi: 09.08.2020)
121. Parker LA. Cannabinoids and the Brain. London: The MIT Press, 2017.
122. Marangoni IP, Marangoni AG. Cannabis edibles: dosing, encapsulation, and stability considerations. *Current Opinion in Food Science*. 2019, 28: 1-6.
123. Wikler A. Aspects of tolerance to and dependence on cannabis. *Ann N Y Acad Sci*. 1976;282:126-147.
124. <http://www.tusf.org/Data/Sites/1/doping/2018/2018-yasakl%C4%B1lar-listesi.pdf> (Son erişim tarihi: 09.08.2020)
125. <https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/11323/turkey-cdr-2018-with-numbers.pdf> (Son erişim tarihi: 09.08.2020)
126. Shokry E, Marques JG, Ragazzo PC, Pereira NZ, Filho NRA. Earwax as an alternative specimen for forensic analysis. *Forensic Toxicol*. 2017;35(2):348-358.
127. Dilly Penchala S, Alagaratnam J, Challenger E, Amara A, Else L, Winston A ve ark. The development and validation of a novel LC-MS/MS method for the quantification of cenicriviroc in human plasma and cerebrospinal fluid. *Biomed Chromatogr*. 2020;34(1):e4711.

128. Moldovan RC, Bodoki E, Servais AC, Chankvetadze B, Crommen J, Oprean R ve ark. Capillary electrophoresis-mass spectrometry of derivatized amino acids for targeted neurometabolomics - pH mediated reversal of diastereomer migration order. *J Chromatogr A*. 2018;1564:199-206.
129. Topkara B, Yananli HR, Sakalli E, Demirkapu MJ. Effects of Injection of Gamma-Aminobutyric Acid Agonists into the Nucleus Accumbens on Naloxone-Induced Morphine Withdrawal. *Pharmacology*. 2017;100(3-4):131-138.
130. Azcarate PM, Zhang AJ, Keyhani S, Steigerwald S, Ishida JH, Cohen BE. Medical Reasons for Marijuana Use, Forms of Use, and Patient Perception of Physician Attitudes Among the US Population. *J Gen Intern Med*. 2020;35(7):1979-1986.
131. Duperrouzel JC, Granja K, Pacheco-Colón I, Gonzalez R. Adverse Effects of Cannabis Use on Neurocognitive Functioning: A Systematic Review of Meta- Analytic Studies. *J Dual Diagn*. 2020;16(1):43-57.
132. Lemos NP, Ingle EA. Cannabinoids in postmortem toxicology. *J Anal Toxicol*. 2011;35(7):394-401.
133. Drummer OH, Odell MS. The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse. London: Arnold, 2001.
134. Olivier V, Guibert B, Leviel V. Direct in vivo comparison of two mechanisms releasing dopamine in the rat striatum. *Brain Res*. 1995;695(1):1-9.
135. Cobo-Golpe M, de-Castro-Ríos A, Cruz A, Páramo M, López-Rivadulla M, Lendoiro E. Determination of antipsychotic drugs in nails and hair by liquid chromatography tandem mass spectrometry and evaluation of their incorporation into keratinized matrices. *J Pharm Biomed Anal*. 2020;189:113443.
136. Kim J, Cho HD, Suh JH, Lee JY, Lee E, Jin CH ve ark. Analysis of Nicotine Metabolites in Hair and Nails Using QuEChERS Method Followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Molecules*. 2020;25(8):1763.
137. Ambrosio G, Joseph JF, Wuest B, Mazzarino M, De La Torre X, Diel P ve ark. Detection and quantitation of ecdysterone in human serum by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Steroids*. 2020;157:108603.
138. Castro AL, Tarelho S, Melo P, Franco JM. A fast and reliable method for quantitation of THC and its 2 main metabolites in whole blood by GC-MS/MS (TQD). *Forensic Sci Int*. 2018;289:344-351.
139. Saenz SR, Lewis RJ, Angier MK, Wagner JR. Postmortem Fluid and Tissue Concentrations of THC, 11-OH-THC and THC-COOH. *J Anal Toxicol*. 2017;41(6):508-516.
140. Wall ME, Perez-Reyes M. The metabolism of delta 9-tetrahydrocannabinol and related cannabinoids in man. *J Clin Pharmacol*. 1981;21(S1):178S-189S.
141. Lemberger L. The metabolism of the tetrahydrocannabinols. *Advances in Pharmacology*. 1972,10: 221-255.
142. Nahas G, Leger C, Tocque B, Hoellinger H. The kinetics of cannabinoid distribution and storage with special reference to the brain and testis. *J Clin Pharmacol*. 1981;21(S1):208S-214S.
143. Kreuz DS, Axelrod J. Delta-9-tetrahydrocannabinol: localization in body fat. *Science*. 1973;179(4071):391-393.
144. Johansson E, Norén K, Sjövall J, Halldin MM. Determination of delta 1-tetrahydrocannabinol in human fat biopsies from marihuana users by gas chromatography-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr*. 1989;3(1):35-38.
145. Grotenhermen F. Pharmacology of cannabinoids. *Neuro Endocrinol Lett*. 2004;25(1-2):14-23.

146. Dewey WL, Martin BR, Beckner JS, Harris LS. A Comparison of the Subcellular Distribution of Cannabinoids in the Brains of Tolerant and Nontolerant Dogs, Rats, and Mice After Injecting Radiolabeled Δ^9 -Tetrahydrocannabinol. *Marihuana*. 1976. 349-365.
147. Hunt CA, Jones RT. Tolerance and disposition of tetrahydrocannabinol in man. *J Pharmacol Exp Ther*. 1980;215(1):35-44.
148. Wolff K, Johnston A. Cannabis use: a perspective in relation to the proposed UK drug-driving legislation. *Drug Test Anal*. 2014;6(1-2):143-154.
149. Müller-Vahl KR, Emrich HM. Cannabis and schizophrenia: towards a cannabinoid hypothesis of schizophrenia. *Expert Rev Neurother*. 2008;8(7):1037-1048.
150. Lin DL, Lin RL. Distribution of 11-nor-9-carboxy-Delta9-tetrahydrocannabinol in traffic fatality cases. *J Anal Toxicol*. 2005;29(1):58-61.
151. Gronewold A, Skopp G. A preliminary investigation on the distribution of cannabinoids in man. *Forensic Sci Int*. 2011;210(1-3):e7-e11.
152. Kemp PM, Cardona PS, Chaturvedi AK, Soper JW. Distribution of $\Delta(9)$ -Tetrahydrocannabinol and 11-Nor-9-Carboxy- $\Delta(9)$ -Tetrahydrocannabinol Acid in Postmortem Biological Fluids and Tissues From Pilots Fatally Injured in Aviation Accidents. *J Forensic Sci*. 2015;60(4):942-949.
153. Fabritius M, Staub C, Mangin P, Giroud C. Distribution of free and conjugated cannabinoids in human bile samples. *Forensic Sci Int*. 2012;223(1-3):114-118.
154. Papoutsis I, Nikolaou P, Dona A, Pistos, C, Stefanidou M, Spiliopoulou C ve ark. A validated GC-MS method for the determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and 11-nor-9- tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in bile samples. *Forensic Toxicology*. 2012, 30.1: 51-58.
155. Holland MG, Schwöpe DM, Stoppacher R, Gillen SB, Huestis MA. Postmortem redistribution of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC (11-OH-THC), and 11-nor-9-carboxy-THC (THCCOOH). *Forensic Sci Int*. 2011;212(1-3):247-251.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Neslihan ZENGİN

Doğum Tarihi/Yeri : 07.09.1989/İstanbul

e-posta : mavinesli89@hotmail.com

Telefon : 0553-570-61-97

EĞİTİM

Üniversite (Yüksek Lisans)

(2017-2020) İstanbul Üniversitesi

Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri

Üniversite (Lisans)

(2007-2012) Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon

Fen Fakültesi, Kimya Bölümü

(2010-2012) Pedagojik Formasyon Eğitimi, Trabzon

Fatih Eğitim Fakültesi, Kimya Öğretmenliği

İŞ DENEYİMLERİ

- Pegasus Hava Taşımacılığı A.Ş., İstanbul

Misafir Hizmetleri Uzmanı, Haziran 2013-Eylül 2016

- Dışpatent Marka Tescil ve Danışmanlık Hiz. LTD. ŞTİ., İstanbul

Yurtdışı Operasyon Sorumlusu, Eylül 2019-Ekim 2019

- ATM Kozmetik San. ve Dış Tic. A.Ş.

Belgelendirme Uzmanı, Haziran 2020

- Trabzon Adli Tıp Kurumu

Kimya İhtisas Dairesi'nde stajyer, Ağustos 2011

SERTİFİKALAR

- TS EN ISO/IEC 17025:2005, Karadeniz Teknik Üniversitesi, 2011