

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

**EROİNİN GLUTATYON METABOLİZMASI ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN METABOLOMİK DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

Ecz. Şilan ÇATAK

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEKLİSANS TEZİ**

**ANKARA
2023**

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EROİNİN GLUTATYON METABOLİZMASI ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN METABOLOMİK DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

Ecz. Şilan ÇATAK

**Farmasötik Toksikoloji Programı
YÜKSEKLİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU**

**ANKARA
2023**

ONAY SAYFASI**EROİNİN GLUTATYON METABOLİZMASI ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
METABOLOMİK DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI****Öğrenci: Şilan ÇATAK****Danışman: Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU**

Bu tez çalışması 11 Ocak 2023 tarihinde jürimiz tarafından “Farmasötik Toksikoloji Programı”nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT*
(Hacettepe Üniversitesi)

Tez Danışmanı: *Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Özge CEMİLOĞLU ÜLKER*
(Ankara Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Ülfet Pınar ERKEKOĞLU*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Gözde GİRGİN*
(Hacettepe Üniversitesi)

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

27 Ocak 2023

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ
ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayımlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

O Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾

O Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾

O Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

11 /01/2023

ŞİLAN ÇATAK

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Şilan ÇATAK

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca çok kıymetli bilgi ve tecrübelerini sabırla aktaran, desteğini hiç esirgemeyen ve her zaman yol gösteren, öğrencisi olmaktan büyük bir onur ve mutluluk duyduğum çok değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Suna SABUNCUOĞLU'na,

Eğitimime katkıda bulunan Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine,

Deney sürecimdeki bilimsel destekleri için Prof. Dr. Emirhan NEMUTLU ve Asst. Prof. Suat SARI hocalarıma,

Yüksek lisans eğitimim sayesinde tanıştığım, benden yardımlarını esirgemeyen çok değerli arkadaşım Ecz.Sara MUHAMMETLİ'ye,

Eczacılık mesleğini seçmemde öncü bir rol üstlenen sevgili babam Ecz. Metin ÇATAK'a, eğitim hayatımın her sürecinde bana destek olan biricik annem Seral ÇATAK'a, varlığı ile hayatı anlamlı kılan sevgili kardeşim Barış Civan ÇATAK'a ve ailemizin küçük üyesi kedimiz Pablo'ya,

Dünyayı değiştirme iradesi ve inadı göstererek yolumuzu açan tüm bilim kadınlarıma,

Çok teşekkür ederim.

ÖZET

Çatak, Ş. Eroinin Glutasyon Metabolizması Üzerindeki Etkisinin Metabolomik Düzeyde Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Toksikoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023. Eroin, sentetik bir opioid türevleri arasında yer alan ve bağımlılık yapma potansiyeli oldukça yüksek olan bir maddedir. Eroin kullanımına bağlı olarak ciddi toksik etkiler ortaya çıkabilmektedir. Bu etkilerin ortaya çıkmasında farklı pek çok mekanizma etkili olmakla birlikte, ana toksik etki mekanizması içinde oksidatif stres oluşumu ve glutasyon (GSH) tüketimi de yer almakta, kullanıcılarda ciddi oksidatif hasar meydana getirmektedir. Bu tez çalışmasında SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında eroinin glutasyon metabolizması üzerindeki etkilerinin hem hedefli hem de hedefsiz metabolomik analizlerle araştırılması, *in siliko* modelleme yöntemleri ile GSH yolağındaki enzimlerle eroinin ilişkisinin ortaya konması, *N*-asetilsistein (NAC) ile *N*-asetilsistein amidin (NACA) bu toksisite üzerindeki olası etkilerinin ortaya konarak bağımlılardaki genel sağlık durumlarına katkı sunacak bir ön çalışma yapılması amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular, eroine bağlı oluşan sitotoksik cevabın NAC ve NACA uygulaması ile önlendiği, ayrıca GSH düzeylerinde eroin uygulaması ile görülen azalmanın da GSH öncü maddeleri ile engellendiği belirlenmiştir. Ancak NAC ve NACA kıyaslandığında koruyuculukları açısından aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir. Ayrıca yapılan *in siliko* moleküler modelleme çalışmalarında GSH yolağındaki önemli enzimlerden biri olan glutasyon transferaz ile eroinin en önemli metaboliti olan morfin arasında anlamlı bir bağlanma belirlenmiştir. Metabolomik çalışmaları da hem glutasyon hem de sistein metabolizma yollarının eroin uygulaması ile değiştiğini ve eroin toksisitesinde bu hedeflerin önemli olduğunu göstermiştir. Yapılan literatür taramasında eroin toksisitesine karşı *N*-asetilsistein ile *N*-asetilsistein amidin karşılaştırmalı etkisinin metabolomik düzeyde incelendiği bir çalışmaya rastlanmamış olup, ileride klinikte de eroin bağımlıları üzerinde uygulanabilecek bir alternatif yaklaşımın geliştirilmesine katkıda bulunulması planlanmaktadır. Dolayısıyla, planlanan çalışma ile elde edilecek veriler, söz konusu bilimsel boşluğun dolmasına katkıda bulunacaktır.

Anahtar kelimeler: eroin, glutasyon, metabolomik, *in siliko*

ABSTRACT

Çatak, Ş. Investigation of the Effect of Heroin on Glutathione Metabolism at Metabolomic Level, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Pharmacy Department of Pharmaceutical Toxicology Master of Science Thesis, Ankara, 2023. Heroin is a substance that is a synthetic opioid derivative with a high addictive potential. Serious toxic effects may occur due to heroin use. Although many different mechanisms are effective in the emergence of these effects, oxidative stress formation and glutathione (GSH) consumption are also included in the main toxic effect mechanism, causing serious oxidative damage to users. In this thesis study, investigating the effects of heroin on glutathione metabolism in SH-SY5Y neuroblastoma cell line with both targeted and untargeted metabolomic analyzes, revealing the relationship of heroin with enzymes in the GSH pathway with *in silico* modeling methods, It is aimed to conduct a preliminary study that will contribute to the general health status of addicts by revealing the possible protective effects on this toxicity with N-acetylcysteine (NAC) and N-acetylcysteine amidine (NACA). According to the findings, it was determined that the cytotoxic response due to heroin was prevented by NAC and NACA administration, and the decrease in GSH levels with heroin administration was also prevented by GSH precursors. However, when NAC and NACA were compared, there was no significant difference between them in terms of protection. In addition, *in silico* molecular modeling studies, a significant binding was determined between glutathione transferase, one of the important enzymes in the GSH pathway, and morphine, the most important metabolite of heroin. Metabolomics studies have also shown that both glutathione and cysteine metabolism pathways are altered by heroin administration and these targets are important in heroin toxicity. In the literature review, no study was found in which the comparative effect of NAC and NACA against heroin toxicity was examined at the metabolomic level, and it is planned to contribute to the development of an alternative approach that can be applied to heroin addicts in the future. Therefore, it will contribute to filling the scientific gap in the development of treatment approaches.

Key Words: heroin, glutatyon, metabolomic, *in silico*

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| ONAY SAYFASI | iii |
| YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI | iv |
| ETİK BEYAN | v |
| TEŞEKKÜR | vi |
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT | viii |
| İÇİNDEKİLER | ix |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | xi |
| ŞEKİLLER | xiii |
| TABLOLAR | xv |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. Opioidlerin Tanımı, Tarihçesi ve Üretimi | 4 |
| 2.2. Bağımlılık Kavramı ve sınıflaması | 10 |
| 2.3. Opioid Tipi Bağımlılık | 11 |
| 2.4. Opioidlerin Kimyasal Yapıları ve Sınıflandırmaları | 12 |
| 2.5. Opioidlerin Genel Etki Mekanizmaları ve Toksik Etkileri | 16 |
| 2.6. Opioid Reseptörleri | 18 |
| 2.7. Eroin | 19 |
| 2.7.1. Eroin ve Tarihçesi | 19 |
| 2.7.2. Eroinin Fizikokimyasal Özellikleri | 20 |
| 2.7.3. Eroinin Kimyasal Sentezi | 23 |
| 2.7.4. Eroinin Farmakokinetik Özellikleri | 24 |
| 2.7.5. Eroinin Farmakodinamik Özellikleri | 26 |
| 2.7.6. Eroine Maruziyet Yolları | 27 |
| 2.7.7. Eroinin Toksik Etkileri | 27 |
| 2.7.8. Eroin Toksisitesinde Oksidatif Stresin Rolü | 33 |
| 2.8. <i>N</i> - Asetilsistein | 38 |
| 2.9. <i>N</i> -Asetilsistein Amid | 40 |
| 2.10. Toksikolojide <i>in siliko</i> Uygulamalar | 42 |
| 2.11. Toksikolojide Metabolomik Uygulamalar | 42 |

| | |
|--|----|
| 3. GEREÇ ve YÖNTEM | 45 |
| 3.1. Gereçler | 45 |
| 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler | 45 |
| 3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler | 45 |
| 3.2. Çözeltilerin Hazırlanması | 46 |
| 3.3. Yöntemler | 47 |
| 3.3.1. Hücre Kültürü Yöntemi | 47 |
| 3.3.2. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür (MTT) Testi | 47 |
| 3.3.3. Eroin Uygulama Dozu ve Süresinin Belirlenmesi | 49 |
| 3.3.4. <i>N</i> -Asetil Sistein (NAC) ve <i>N</i> -Asetil Sistein Amid (NACA)'nın Uygulama Dozlarının Belirlenmesi | 50 |
| 3.3.5. GSH Düzeylerinin Analizi | 51 |
| 3.3.6. Eroin için <i>İn silico</i> Moleküler Modelleme Yöntemi | 52 |
| 3.3.7. Metabolomik Analizi Yöntemi | 53 |
| 3.3.8. İstatistiksel Değerlendirme | 56 |
| 4. BULGULAR | 57 |
| 4.1. Sitotoksikite bulguları | 57 |
| 4.2. Hücrelerin Işık Mikroskobu Altındaki Görünümlerine İlişkin Bulgular | 57 |
| 4.3. GSH Düzeylerine ilişkin bulgular | 58 |
| 4.4. <i>In silico</i> Moleküler Kenetleme Yöntemine Ait Bulgular | 59 |
| 4.5. Metabolomik Bulguları | 64 |
| 4.6. Yolak Analizleri | 66 |
| 5. TARTIŞMA | 69 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 76 |
| 7. KAYNAKLAR | 77 |
| 8. EKLER | 85 |
| EK-1: Tez Çalışması Orijinallik Raporu | |
| EK-2: Orijinallik Raporu | |
| 9. ÖZGEÇMİŞ | |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---------------|---|
| 6-MAM | 6-Monoasetilmorfin |
| AB | Avrupa Birliği |
| ADH | Antidiüretik Hormon |
| BKNF | Beyin Kaynaklı Nörotrofik Faktör |
| BM | Birleşmiş Milletler |
| Cu | <i>Cuprum</i> , Bakır |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DNA | Deoksiribonükleik Asit |
| DOX | Doksorubisin |
| GABA | Gama aminobütirik asit |
| GI | Gastrointestinal |
| GPCR | <i>G Protein-Coupled Receptor</i> , G proteini kenetli reseptör |
| GSH | Glutatyon |
| H9c2 | Kardiyomiyositleri |
| ICD-11 | <i>International Classification of Diseases</i> , Uluslararası Hastalık Sınıflandırması |
| IgM | Immunoglobulin M |
| IV | İntravenöz |
| M.Ö. | Millattan Önce |
| M3G | <i>Morphine-3-Glucuronide</i> , Morfin-3-Glukronit |
| MDA | Malondialdehit |
| MGN | Membranöz Glomerülonefrit |
| MSS | Merkezi Sinir Sistemi |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide |
| NA | Noradrenerjik |
| NAC | <i>N</i> -Asetil Sistein |
| NAc | Nükleus Akumbens |
| NACA | <i>N</i> -Asetil Sistein Amid |
| NADPH | Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat |
| QSAR | <i>Quantitative Structure Activity Relationship</i> , Nicel Yapı Aktivite İlişkisi |

| | |
|---------------|--|
| ROS | Reaktif Oksijen Türevleri |
| SBF | Sinir Büyüme Faktörü |
| SOD | Süper Oksit Dismutaz |
| UNODC | <i>United Nations Office on Drugs and Crime</i> , Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi |
| YPM | Yeni Psikoaktif Maddeler |
| Zn-SOD | Çinko-Süperoksit Dismutaz |
| δ | Sigma |
| κ | Kappa |
| μ | Mü |



ŞEKİLLER

| Şekil | Sayfa |
|---|-------|
| 2.1. <i>Papaver somniferum</i> (haşhaş) bitkisinin genel görünümü. | 4 |
| 2.2. Haşhaş bitkisinden lateks eldesi. | 6 |
| 2.3. Afganistan'dan Rusya Federasyonu'na ve Avrupa'ya eroin kaçakçılığı. | 9 |
| 2.4. Opioid agonistleri, kısmi agonistleri ve antagonistlerinin kimyasal yapıları. | 14 |
| 2.5. Opioidlerin vücutta etki ettiği organlar. | 17 |
| 2.6. Opioid Reseptörü. | 19 |
| 2.7. Eroin kimyasal yapısı. | 20 |
| 2.8. Eroinin çeşitli formları. | 22 |
| 2.9. Eroinin kimyasal sentez reaksiyonu. | 23 |
| 2.10. Eroin metabolizması. | 26 |
| 2.11. GSH'ın antioksidan fonksiyonu. | 37 |
| 2.12. NAC'ın kimyasal yapısı. | 38 |
| 2.13. NAC etki mekanizması. | 39 |
| 2.14. NACA (B) kimyasal yapısı. | 41 |
| 3.1. MTT'nin MTT formazana indirgenmesi. | 48 |
| 3.2. SHSY5Y hücre hattına 24 ve 48 saat süre ile 100 µM-0,78 µM konsantrasyon aralığında ve 20 aralığında eroin uygulaması ile elde edilen sitotoksisite verileri; A: 100 µM-0,78 µM konsantrasyon aralığında 24 saat uygulama, B: 200 µM-1,56 µM konsantrasyon aralığında 48 saat uygulama, C: 100 µM-0,78 µM konsantrasyon aralığında 24 saat uygulama. | 50 |
| 3.3. SHSY5Y hücre hattına 24 saat süre ile 50 mM-0,39 mM aralığında 8 farklı konsantrasyonda NAC ve 3000 µM-23,43 µM aralığında 8 farklı konsantrasyonda NACA uygulaması ile elde edilen sitotoksisite verileri; A:NAC uygulaması, B: NACA uygulaması. | 51 |
| 3.4. Metabolomik çalışmaların iş akışı. | 54 |
| 4.1. SHSY5Y hücre hattına ait sitotoksisite bulguları. | 57 |
| 4.2. Işık mikroskopu altında çalışma gruplarına ilişkin SHSY5Y hücre hattının görüntüleri. | 58 |
| 4.3. Uygulama gruplarındaki GSH Düzeyleri (ng/ml). | 59 |
| 4.4. GSH'nin GSTA1 (A) ve GSTA2 (B) aktif bölgesine bağlanma biçimi. | 62 |
| 4.5. Eroinin GSTA1 (A) ve GSTA2 (B) aktif bölgesinde moleküler modelleme ile tahmin edilen bağlanma biçimi. | 63 |

- 4.6.** Morfinin GSTA1 (A) ve GSTA2 (B) aktif bölgesinde moleküler modelleme ile tahmin edilen bağlanma biçimi. 64
- 4.7.** SHSY5Y hücre hattında eroin maruziyetine ait çok değişkenli veri analiz. 65
- 4.8.** Eroin maruziyeti ile hücre hattında değişen yollar. 67
- 4.9.** Eroin maruziyetine bağlı olarak hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı değişen metabolitlerin yer aldıkları yollar. 68



TABLULAR

| Tablo | | Sayfa |
|--------------|--|--------------|
| 2.1. | Dünya sağlık örgütü'ne göre madde bağımlılığı türleri. | 10 |
| 2.2. | Opioidlerin yapısına göre sınıflandırılması. | 15 |
| 2.3. | Eroinin genel fizikokimyasal özellikleri. | 22 |
| 2.4. | Eroinin LD ₅₀ değeri. | 28 |
| 2.5. | Eroinin sistemler üzerindeki etkileri. | 32 |
| 2.6. | Antidotall tedavi seçenekleri. | 33 |
| 3.1. | Moleküler kenetleme çalışmasında kullanılan enzim yapıları. | 53 |
| 3.2. | GC-MS için çalışma koşulları. | 55 |
| 4.1. | Geri kenetleme ve eroin ile morfinin moleküler kenetleme sonuçları. | 60 |
| 4.2. | Eroin maruziyeti ile hücre hattında anlamlı şekilde değiştiği tanımlanan metabolitler. | 66 |

1. GİRİŞ

Opioidler, afyon haşhaşının (*Papaver somniferum*) reçinesinden türetilen, afyonda bulunan doğal bitki alkaloidleriyle yapısal olarak ilişkilendirilen geniş bir ilaç sınıfı olarak bilinmektedir. Doğal alkaloidler de aynı zamanda opiatlar olarak adlandırılmakta olup, morfin ve kodeini içermektedir. Sentetik türevler arasında eroin, fentanil, hidromorfon, metadon, buprenorfin ve diğerleri yer almaktadır. Opioidler oldukça güçlü ve etkili analjezik bileşikler arasında gösterilmektedir. Ancak çoğunun bağımlılık yapıcı ve suistimal edilebilir madde potansiyeli oldukça yüksektir (1).

Opioidlerin güçlü ağrı kesici etkileri başta olmak üzere çeşitli klinik etkileri bulunmaktadır. Genellikle analjezi ile bağlantılı diğer etkiler arasında öfori, ruh halindeki değişiklikler, uyuşukluk ve zihinsel bulanıklık yer almaktadır. Ancak opioidlerin neden olduğu analjezinin ayırt edici özelliği bilinç kaybı olmamasıdır. Opioidlerin, yanlış kullanımı veya suistimali söz konusu olmakta ve güçlü bağımlılık yaratabilmektedir. Bağımlılık, kişide zevk duygusu oluşturan madde veya davranışların artan miktarlarda ve durdurulamaz şekilde tekrarlanmasıyla oluşan psikososyal bir davranış bozukluğudur (2).

Opioidler arasında bağımlılık potansiyeli en güçlü madde olan eroin (Diasetil morfin veya 3,6-diasetil morfin), pek çok hastalık ve sosyal problemlere hatta ölüme sebep olabilen bir madde olarak tanımlanmaktadır. Eroin, güçlü bağımlılık yapıcı etkisi dolayısıyla, tüm dünyada global bir sorun olarak kabul görmekte olan bir maddedir. Eroin etkisini başta mü-opioid reseptörleri olmak üzere, Gama aminobütirik asit (GABA), dopamin ve noradrenerjik (NA) sistem üzerinden göstermektedir (3,4).

Opioid reseptörlerin aktivasyonu, GABA salınımını inhibe ederek, dopaminerjik nöronlar üzerindeki tonik inhibitör etkileri önleyip Nükleus Akumbens (NAc), dorsal striatum ve prefrontal kortekste dopamin salınımına neden olmaktadır (5). Eroin beyne ulaştıktan sonra morfine dönüşmekte ve hızla opioid reseptörlerine bağlanmaktadır. Hissedilen öfori yoğunluğu, alınan madde miktarına ve maddenin beyne ulaşım opioid reseptörlerine bağlanma süresine bağlı bir fonksiyondur. Eroinle birlikte, rusha genellikle deride sıcak bir kızarma, ağız kuruluğu ve ekstremitelerde ağırlık hissi ile beraber bulantı, kusma ve şiddetli kaşıntı eşlik etmektedir. İlk etkilerin ardından, kullanıcılarda genellikle birkaç saat uykulu olma hali, zihinsel işlev açısında bulanıklık, kalp fonksiyonu ve inhalasyonda ciddi şekilde yavaşlama gibi etkiler

görülmektedir. Bazen kişinin yaşamını tehdit edecek kadar yavaş inhalasyon ayrıca komaya ve kalıcı beyin hasarına yol açabilmektedir (6).

Eroin kullanımına bağlı olarak ciddi toksik etkiler ortaya çıkabilmektedir. Bu etkilerin ortaya çıkmasında farklı pek çok mekanizma etkili olmakla birlikte, ana toksik etki mekanizması içinde oksidatif stres oluşumu ve glutatyon (GSH) tüketimi de yer almakta, kullanıcıların makromoleküllerinde önemli oksidatif hasar meydana getirmektedir (3). Yapılan çalışmalarda eroin kullanımına bağlı olarak lipid peroksidasyonunun arttığını ve antioksidan enzim düzeylerinin ise düştüğünü gösteren çalışmalar bulunmaktadır (7,8).

Maddelerin toksisitelerinin saptanmasında bilgisayar temelli yöntemlerin kullanılması önem taşımaktadır. *In silico* toksikoloji, bilgisayarların yardımıyla kimyasalların toksisite değerlendirmesi için çalışan bütünleştirici teknoloji için kullanılan bir terimdir. Bu teknik, algoritmalar, yazılımlar ve ilgili veriler aracılığıyla kimyasalların toksisitesinin değerlendirilmesi, modellenmesi, simülasyonu ve tahmin edilmesi için bir platform sağlamaktadır(7).

Canlı hücrelerdeki metabolizma ürünlerinin tamamı metabolom olarak tanımlanmaktadır. Söz konusu metabolitler, pekçok biyokimyasal reaksiyonun ara ürünü olup hücrede gerçekleşen metabolik yolların gerçekleşme süreci içinde ortaya çıkan önemli küçük moleküllerdir(9) Metabolomik çalışmalar, bilimsel ve teknolojik gelişmelerin de getirisi olarak araştırma alanlarında yerini almış, araştırmalara yön vermeye başlamıştır (10). Metabolomik çalışmalarında; belirli bir dönemde vücut içinde lipid, karbohidratlar, protein, gibi hücre bileşenlerinden ortaya çıkan küçük moleküllü metabolitlerin saptanması, miktarının belirlenmesi ve tanımlanması söz konusudur (11).

Eroin bağımlılarında, eroin toksisitesine bağlı olarak oluşan oksidatif hasarı önleyebilecek veya geri çevirebilecek çözüm önerilerinin ortaya konulması önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında eroinin glutatyon metabolizması üzerindeki etkilerinin hem hedefli hem de hedefsiz metabolomik analizlerle araştırılması, *in silico* modelleme yöntemleri ile GSH yolağındaki enzimlerle eroinin ilişkisinin ortaya konması, *N*-asetilsistein (NAC) ile *N*-asetilsistein amidin (NACA) bu toksisite üzerindeki olası etkilerinin ortaya konarak

bağımlılardaki genel sağlık durumlarına katkı sunacak bir ön çalışma yapılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Opioidlerin Tanımı, Tarihçesi ve Üretimi

Opiodler, doğal bitkisel alkaloidlerin geniş bir sınıfını oluşturan, *Papaveraceae* familyasından haşhaş, afyon çiçeği olarak da bilinen *Papaver somniferum* (Şekil 2.1) bitkisinden elde edilmektedir. İçeriğinde morfin, kodein, tebain, papaverin, narkotin gibi doğal bileşikler barındırmaktadır. Kökeni Doğu Akdeniz olan haşhaş, Hindistan ve Anadolu'da uzun yıllardır tarımı yapılan bir bitkidir (12,13).



Şekil 2.1. *Papaver somniferum* (haşhaş) bitkisinin genel görünümü (14).

Opiyat (afyon) terimi başlangıçta afyondan türetilen alkaloidler için kullanılmıştır. Morfinin kimyasal yapısı belirlendikten ve kapsamlı sentez çalışmalarından sonra bu terim hidromorfin, eroin, oksikodon ve nalokson gibi morfin benzeri yapılara sahip tüm bileşikler için genişletilmiştir. Morfinin en karakteristik etkilerinden biri uyku-uyuşukluk hali olup, opioidlerin tanımlandığı bir başka alan da narkotik ilaçlardır. Daha kapsayıcı opioid terimi; opiatlar, endojen peptidler ve morfin benzeri etkilere sahip olup ancak farklı kimyasal yapılarıdaki diğer bileşikler için geçerli kabul edilmektedir (15).

Opioidler “narkotik analjezikler” olarak da adlandırılmakta olup, güçlü analjezik etkileri nedeniyle yaygın kullanılmaktadır. Tüm türevlerinde ilaç bağımlılığı yapma potansiyeli bulunmaktadır. Yaygın depresif etkileri nedeniyle verilen dozun büyüklüğüne göre narkoz hali oluşturur. Narkotik analjeziklerin antipiretik veya antiinflamatuvar etkileri bulunmamaktadır. Analjezik etkileri tamamıyla merkezi sinir sistemi üzerindeki etkilerinin bir sonucudur (12,13).

Opiyat (Yunanca "opos" veya "meyve suyu" kelimesinden gelmektedir) *Papaver somniferum*'un olgunlaşmamış kapsüllerinin okside olmuş sütlü öz suyudur.

Haşhaş bitkisi Türkiye'ye özgüdür ve yaklaşık 4 ay süren bir büyüme döngüsüne sahiptir. Millattan Önce (M.Ö.) 4. Yüzyılın sonlarına doğru bu bitkinin ilk kez kültürünün yapıldığına dair kanıtlar mevcuttur ve psikoaktif etkiler için kullanımı Bronz Çağı'na (MÖ 1600-1200) kadar uzanmaktadır (5).

Afyon bitkisi, birincil psikoaktif bileşiği olan morfin de dahil olmak üzere birçok alkaloid içermektedir. Kimyasal açıdan alkaloidler baz yapısındadır. Yapısındaki azot atomu nedeniyle kusmayı tetikleyebilmekte ve karakteristik acı bir tat içermektedir. Bitkiyi lezzetli hale getirmek için tarihte haşhaş bitkisinin baş kısmının tümü ezilip şarapla, balla ve suyla karıştırılarak kullanılmıştır. Başka bir müstahzarda ise; hindistan cevizi, kakuleli haşhaş veya safran karıştırılarak hazırlanmıştır. Afyonda bulunan diğer bileşikler kodein, tebain, papaverin ve noskapindir. Morfin, kodein ve tebain benzer bir kimyasal yapıya sahiptir, ancak ilk ikisi sedasyona neden olurken, tebainin uyarıcı etkisi bulunmaktadır (5).

Uygurlik tarihinin başından beri opioidler insanlar tarafından farklı amaçlarla kullanılmıştır. İnsanların yaşamlarının sosyal, tıbbi ve ekonomik yönlerini önemli derecede etkileyen opioid pazarı, çeşitli dönemlerde ülkeler arasında savaşların çıkmasına da neden olmuştur (5).

Bu nedenle Birleşik Krallık, Asya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde, opiyat kullanımı on dokuzuncu yüzyılın sonlarında yaygın olduğu için bağımlılık bir endişe kaynağı olmuştur. Bunun sonucunda Almanya, Amerika Birleşik Devletleri, Çin, Fransa, Birleşik Krallık, İtalya, Japonya, Hollanda, İran, Portekiz, Rusya ve Tayland opiyat üretimini ve ticaretini kontrol etmek için 1912'de Lahey Uluslararası Opiyat Sözleşmesini imzalamıştır. İki yıl sonra, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Harrison Narkotik Vergi Yasasını çıkartmıştır. Bu yasa opiyat ya da koka bitkisinin tuzlarını,

türevlerini, preparatlarını; üreten, ithal eden, yetiştiren, ticaretini ve dağıtımını yapan tüm şahıslara ek vergi uygulamasını yürürlüğe koymuştur (16).

Topluluklar tıbbi olmayan opioid kullanımının olumsuz sonuçlarına karşı koymak amacıyla yasalar ve anlaşmalar geliştirmiştir (5).

Mezopotamya’da (Bugün Irak), Sümerliler’in adına “eğlence bitkisi” dedikleri haşhaş yetiştirilmiştir. Bin yıldan uzun süre kullanımının ardından, kil Babil tabletleri haşhaş suyunu tıbbi bir madde olarak ifade etmiştir. Haşhaş tohumlarına keskin bir aletle sığ paralel kesiler atılarak hava ile temas ettiğinde kısa sürede kuruyarak kahverengimsi yapışkan bir macuna dönüşen lateks toplanarak afyon hasat edilmektedir. Şekil 2.2.’de haşhaşa kesi atılarak lateks eldesi gösterilmiştir (5).

Bu sakız daha sonra kaynatılmakta ve safsızlıklardan kurtulmak için süzülmemektedir. Kurutma ve kalıplama süreci Hint, Bengal, Türk, Fars ve Mısır uygarlıklarında farklılık göstermiş olmakla birlikte genel süreç 2000 yılı aşkın bir süredir aynı kalmıştır (5).



Şekil 2.2. Haşhaş bitkisinden lateks eldesi (17).

Milattan önce 1500 civarında yazılan Mısır Ebers Papirüsü, haşhaş bitkisinin bazı taneleri ile oluşturulmuş bir karışımı “duvarda bulunan ateş salgıları...” ile “çocukların aşırı ağlamasını önlemek için bir çare” olarak ifade etmiştir. MÖ 400’de Yunan doktor Hipokrat, afyonun tedavi edici özelliklerine sık sık atıfta bulunmuş ve uykusuzluk çeken hastalara reçete etmiştir. Daha sonra, MÖ 3. yüzyıldan kalma

Eresuslu Theophrastus, afyonu bir bağırsak temizleyici olarak listelediği botanik üzerine bir inceleme tezi yazmıştır (5).

Milattan sonra 1. yüzyılda doğan Yunan hekim-botanikçi Dioscorides, İmparator Nero'nun altında asker hekimi olarak görev yaparken Roma egemenliği altındaki bölgeleri ziyaret etmiştir. Hevesli bir bilim insanı olarak, seyahat ettiği her yerden doğal kaynaklar hakkında bilgi toplamış ve gelecek yüzyıllarda da çok değerli olacak bir tıbbi özet yazmıştır. De Materia Medica adlı ünlü eserinde opiyumu hem bir analjezik olarak hem de öksürük ile intestinal rahatsızlıklara çare olarak tanımlamıştır (5).

Arap tüccarlar haşhaşı Çin, İran, Hindistan, Kuzey Afrika ve İspanya'ya yaklaşık olarak sekizinci yüzyılda, Hindistan'a ise dokuzuncu yüzyılda tanıtmışlardır. Hindistanda müslüman yönetimi sırasında afyon esas olarak tıbbi amaçlar için yaygın olarak yetiştirilmiştir. Afyon bir ev ilacı olarak kabul edilmiş, daha sonra sosyal ve dini kullanımı da söz konusu olmuştur. Müslüman Türk kökenli Babür hanedanı döneminde haşhaş ekimi 1524 yılında devlet tekeli haline gelmiş, Çin ve Doğu ile afyon ticareti yaptığı gibi ekimi Batı kıyısında yaygın olarak genişlemiştir (5).

1707'de, İngiliz İmparatorluğu altında aktif olarak içki ve uyuşturucu teşvik eden İngiliz Doğu Hindistan Şirketi'ne devredilmiş ve eğlence amaçlı afyon kullanımı katlanarak artmıştır. Daha sonra, 1773'te General Warren Hastings, İngiliz Hindistan Valisi, zararlı etkileri nedeniyle sıkı kontrol önlemleri almış ve iç afyon tüketimini kısıtlamıştır. İngiliz Farmakopesi, on dokuzuncu yüzyılın başlarında afyonun içmek için hazırlanması prosedürünü yayınlamıştır (5).

Doğu Hindistan Şirketi'nin egemenliği 1858'de İngiliz Kraliyetine devredilmiş ve sonraki on yıllarda hükümet gelirlerini artırmaya devam ederken uyuşturucu tüccarlarının rolünü değiştirecek olan afyon tekeli kaldırılmak için birkaç girişimde bulunulmuştur. Sonunda, 1924'te Gandhi, afyon politikasının nüfusun ahlaki refahına aykırı olduğunu belirten bir karar çıkartmıştır. 1937'de Hindistan Ulusal Kongresi'nin iktidara gelmesiyle bazı illere afyon yasağı getirilmiştir. Bu politika aynı zamanda medya kampanyalarını, halka açık toplantıları, “bağımlıların” kaydını ve ücretsiz yatarak tedaviyi de içermiştir. 1920'de Narkotik Komisyonu'nun kurulmasıyla tüm afyon ekimi ve üretimi hükümetin sorumluluğu haline gelmiş, 1920'de Narkotik Komisyonu'nun kurulmasıyla tüm afyon ekimi ve üretimi devletin sorumluluğuna

girmiştir. Sonuç olarak, tıbbi olmayan kullanım azalmış, fiyatlar yükselmiştir. 1944'te Amerika Birleşik Devletleri Hindistan'da afyon kullanımıyla ilgili endişelerini dile getirmiştir, ancak İngiliz hükümeti tüm ekim ve ticaretin yerleşik politikalar ve ticaret anlaşmaları izlediğini söylemiştir. Hintli Hükümet, baskıyı fark ederek afyon içilmesini yasaklamış, bu çaba II. Dünya Savaşı'nın sonlarına doğru durdurulmuştur. Üç yıl sonra Hindistan'ın bağımsızlığı tıbbi ve bilimsel amaçlar dışında afyon üretiminin tamamen yasaklanmasını beraberinde getirmiştir. Ayrıca daha fazla ücretsiz tedavi merkezi açılmış ve kaçakçılık cezalandırılmıştır. On yıl sonra, afyon satışları yasaklanmış ve tıbbi gerekçelerle yalnızca kayıtlı "bağımlıların" oral tüketimine izin verilmiştir (5).

1970'e gelindiğinde, eroinin oral tüketimi ve sigara gibi kullanımı azalmıştır. Çoğu eroin kullanıcısının 50 yaşında veya daha büyük olduğu gösterilmiştir (18).

Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi'ne (UNODC) göre, yeni psikoaktif maddeler (YPM), "Psikotrop Maddeler hakkında (saf halde veya müstahzar halinde), 1961 Narkotik Uyuşturucu Tek Sözleşmesine veya 1971 Sözleşmesine kadar kontrol edilmeyen, ancak halk sağlığı tehdidi oluşturabilecek suistimal edilen maddelerdir" şeklinde tanımlanmaktadır. Kontrolsüz sentetik uyuşturucuların kullanımı yeni bir konu olmamakla birlikte, YPM bu yüzyılın başında küresel bir endişe konusu haline gelmiştir. Haşhaş bitkisinin üretimi bağımlılık yapıcı özellikleri nedeniyle, yasalarla sınırlandırılmıştır. Birleşmiş Milletler denetiminde yasal ana üretici olarak Türkiye, Hindistan, Avustralya, Fransa, İspanya, Macaristan'da haşhaş ekimi yapılmaktadır(19). Ancak küresel boyutta Afganistan hem haşhaş ekiminin hem de afyon üretiminin en fazla gerçekleştiği ülkedir. Nitekim UNODC tarafından 2020 yılında Afganistan'da haşhaş ekiminin bir önceki yıla göre %37 artışla 224.000 hektara ulaştığını ve afyon üretiminin ise 6.300 ton olarak gerçekleştiği tahmin edilmektedir (19).

Son beş yılda küresel afyon üretiminin yaklaşık %84'ünün gerçekleştiği Afganistan; Avrupa, Yakın ve Orta Doğu, Güney Asya, Afrika ve az oranda olmak üzere Kuzey Amerika (özellikle Kanada) ve Okyanusya'daki yasa dışı uyuşturucu pazarlarının kaynağıdır. Çoğunlukla Myanmar (küresel afyon üretiminin %7'si) ve az oranda Laos (küresel afyon üretiminin %1'i) ise Doğu ve Güneydoğu Asya ile Okyanusya pazarlarının tedarikini sağlamaktadır. ABD'ye olan eroin sevkiyatında ise

üzerinden kaçakçılığı yapılan opiyatlardan yılda ortalama 28 milyar ABD Doları gelir elde edildiği tahmin edilmektedir (19). Rekor olarak nitelendirilen yüklü eroin yakalamaları nedeniyle Türkiye; Balkan Rotası üzerinde hayati bir öneme sahiptir. Eroinin Avrupa Birliği'ne (AB) girişinde Balkan Rotasının hala kilit bir koridor olma özelliğini sürdürdüğü, bu nedenle de Türkiye'nin eroinin AB pazarlarına girişinin önlenmesi adına merkezi bir öneme sahip olduğu 2019 Avrupa Uyuşturucu Pazarları Raporunda da belirtilmiştir (21). Geçmiş yıllarda olduğu gibi halen ülkemiz kolluk birimleri tarafından tüm AB ülkelerinden daha fazla miktarda eroin yakalaması gerçekleştirilmektedir. 2019 yılında tüm AB ülkelerinin ele geçirdiği eroin miktarının iki buçuk katı ülkemizde gerçekleştirilen yakalamalarda ele geçirilmiştir (AB ülkeleri: 7,9 ton, Türkiye: 20.2 ton). Bu miktar son 10 yılda ele geçirilen en yüksek miktardır (21).

2.2. Bağımlılık Kavramı ve sınıflaması

Amerikan Bağımlılık Tıbbi Derneği bağımlılığı beyin devreleri, genetik, çevre ve bireyin yaşam deneyimleri arasındaki karmaşık etkileşimlerini içeren tedavi edilebilir, kronik bir hastalık olarak tanımlamaktadır. Bir madde kullanımına bağımlı veya kompulsif hale gelen bir davranış bağımlısı kişiler, bağımlılığın getirdiği zararlı sonuçlara rağmen bu durumu sürdürmeye devam etmektedirler (22).

Tablo 2.1. Dünya sağlık örgütü'ne göre madde bağımlılığı türleri (23)

| |
|--|
| Opiat Tipi Bağımlılık |
| Alkol, Barbütürat, Benzodiazepin Tipi Bağımlılık |
| Esrar Tipi Bağımlılık |
| Kokain Tipi Bağımlılık |
| Uyarıcı Tipi Bağımlılık |
| Halüsinojen Tipi Bağımlılık |
| Solunan Çözücü Tipi Bağımlılık |
| Tütün Tipi Bağımlılık |

2.3. Opioid Tipi Bağımlılık

Uluslararası Hastalık Sınıflandırması (ICD-11), opioid bağımlılığını “opioidlerin tekrarlanan veya sürekli kullanımından kaynaklanan opioid kullanımının düzenlenmesindeki bir bozukluk” şeklinde tanımlamaktadır. Karakteristik özelliği, maddenin kullanımını kontrol etme yeteneğinde bozulma, diğer faaliyetlere göre kullanıma verilen önceliğin artması ve zarara veya olumsuz sonuçlara rağmen kullanımın devam etmesine sebep olan opioidleri kullanmak için duyulan güçlü bir dahili dürtü olmuştur. Bu deneyimlere genellikle opioidleri kullanmak için öznel bir dürtü veya istek hissi eşlik edebilmektedir. Bağımlılığın fizyolojik özellikleri de mevcuttur. Opioidlerin etkilerine karşı tolerans geliştirilmesi, opioid kullanımının kesilmesini, azaltılmasını takiben yoksunluk belirtilerini önlemek ve hafifletmek için opioidlerin ve farmakolojik olarak benzer maddelerin tekrar tekrar kullanımı görülebilmektedir (24).

Bağımlılığın özellikleri genellikle en az 12 aylık bir süre boyunca gözlenmekte, teşhisin konulması için en az 3 ay sürekli (günlük veya hemen hemen her gün) opioid kullanımı olması gerekmektedir.

Opioid kullanım bozukluğunu teşhis etmek için sunulan on kriter aşağıda özetlenmiştir:

- Opioidlerin amaçlanandan daha büyük miktarlarda veya daha uzun süreler boyunca alınması.
- Opioid kullanımını azaltmak veya kontrol etmek için ısrarlı istek duyulması veya çabaların başarısız olması.
- Opioid elde etmek veya kullanmak için gerekli faaliyetlerde çok fazla zaman harcamak.
- Opioid kullanmak için şiddetli istek veya arzu duyulması.
- İş, okul veya evde önemli rol yükümlülüklerini tekrarlayan opioid kullanımı nedenleriyle yerine getirememesi:
- Önemli sosyal, mesleki veya eğlence etkinlikleri opioid kullanımı nedeniyle bırakmak veya azaltmak.
- Fiziksel olarak tehlikeli durumlarda dahi tekrarlayan opioid kullanımının görülmesi.

- Kalıcı veya tekrarlayan fiziksel durumları ya da veya opioidlerle ilişkili psikolojik problemleri bilmesine veya yaşamasına rağmen kişinin sürekli opioid kullanımı.

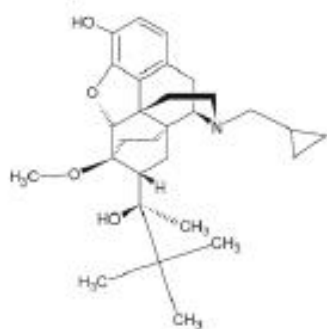
- Tolerans gelişmesi.
- Yoksunluk gelişmesi.

Yukarıdaki durumlardan madde kullanım bozukluğu hasta; 2-3 kriteri karşıladığı takdirde hafif, 4-5 semptomu gösterdiği takdirde orta ve 6 veya daha fazla kriteri karşıladığı takdirde ise şiddetli kabul edilmektedir (25).

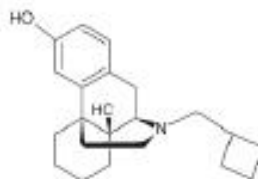
2.4. Opioidlerin Kimyasal Yapıları ve Sınıflandırmaları

Opioidler, bir piperidin halkasının eklendiği fenantren çekirdeğini (koyu olarak) oluşturan altı üyeli doymuş heterosiklik halkalardan oluşmaktadır. Şekil 2.5'te Opioid Agonistleri, Kısmi Agonistleri ve Antagonistlerinin Kimyasal Yapıları gösterilmektedir (15).

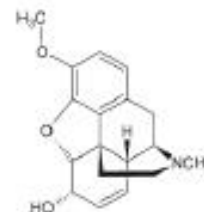
Buprenorfin



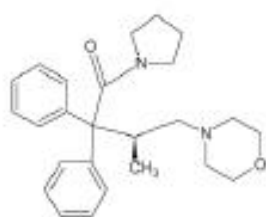
Butorfanol



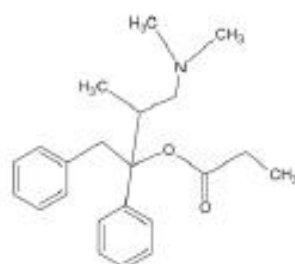
Kodein



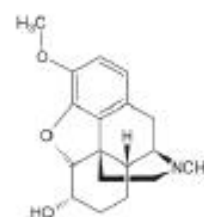
Dekstromoramid



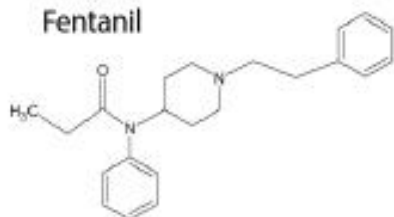
Dekstropropoksifen



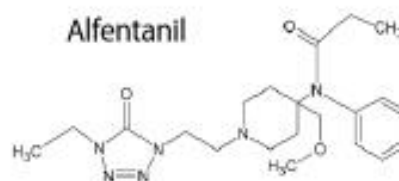
Dihidrokodein



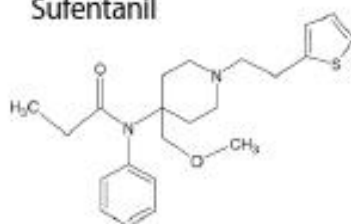
Fentanil



Alfentanil



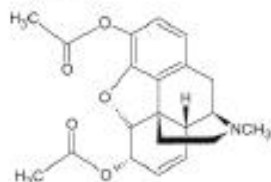
Sufentanil



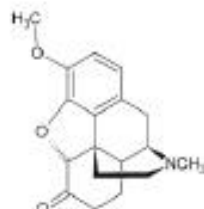
Remifentanil



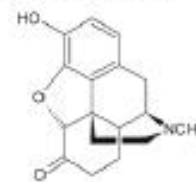
Eroin

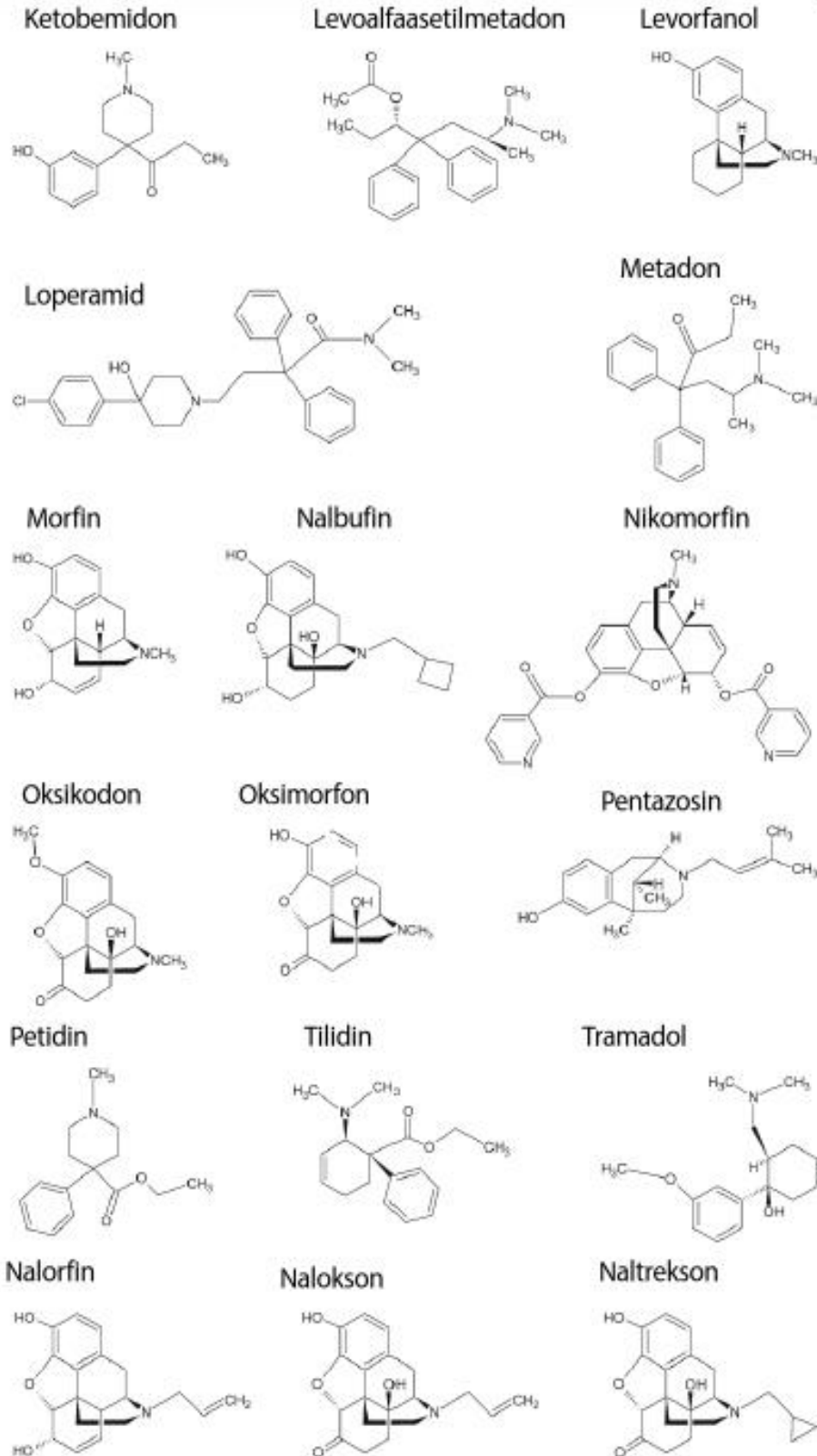


Hidrokodeon



Hidromorfon





Şekil 2.4. Opioid agonistleri, kısmi agonistleri ve antagonistlerinin kimyasal yapıları (26).

Morfin kimyasal yapısı, metadon ve meperidin hariç tüm opioidler için prototipi temsil etmektedir. Daha önemli opiyat alkaloidleri fenantren çekirdek içermesine rağmen opiyat alkaloid türevlerinin çoğu izokinolin halka yapısına sahiptir (15).

Diasetilmorfin oluşumunda olduğu gibi fenolik fonksiyonların esterleşmesi, lipid çözünürlüğü, etki gücü ve toksisitesi artmış bir bileşik ile sonuçlanmaktadır (15). Opioidler kimyasal yapılarına göre:

- Doğal opiyat alkaloidleri (kodein, morfin),
- Sentetik opiyat alkaloidi türevleri (hidrokodon, hidromorfon, oksikodon, buprenorfin),
- Çeşitli sentetik opioid sınıfları
 1. Anililopiperidinler (fentanil, alfentanil, sufentanil, remifentanil),
 2. Difenilpropilamin türevleri (propoksifen, dekstropropoksifen, metadon, difenoksilat, loperamid),
 3. Diğerleri (pentazosin, butorfanol, nalbufin, levorfanol, tramadol),
- Opioid antagonistleri (nalmefen, nalokson ve naltrekson)

gibi alt sınıflara ayrılmaktadır (27).

Tablo 2.2. Opioidlerin yapısına göre sınıflandırılması (27).

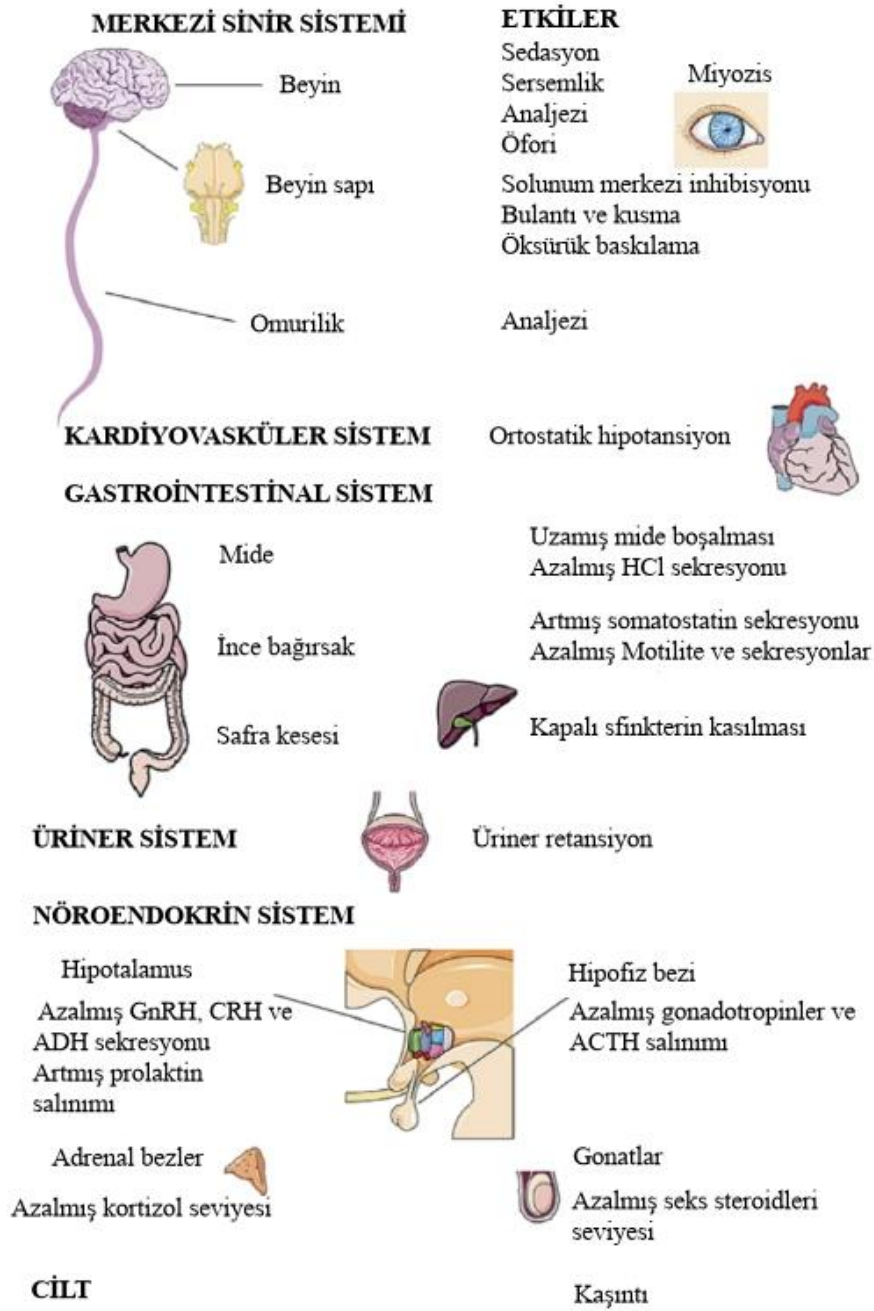
| Doğal Olarak Meydana Gelen Bileşikler | Yarı- Sentetik Bileşikler | Sentetik Bileşikler |
|--|----------------------------------|----------------------------|
| Morfin | Diamorfin (Eroin) | Petidin |
| Kodein | Dihidromorfon (Hidromorfon) | Fentanil |
| Tebain | Buprenorfin | Metadon |
| Papaverin | Oksikodon | Alfentanil |
| | | Remifentanil |
| | | Tapentadol |

Opioidler etki gösterdikleri reseptörlere göre de sınıflandırılabilir:

1. Mü- reseptörüne seçici olarak bağlanan bileşikler, morfin benzeri analjezi, öfori, solunum depresyonu, miyoz, kısmi gastrointestinal (GI) inhibisyon ve yatıştırıcı etkiler sergilemektedir.
2. Pentazosin, nalorfin ve levorfanol gibi narkotik antagonistler analjezi, sedasyon, sanrı, halüsinasyonlar (psikotomimesis), gastrointestinal inhibisyonu ve miyotik etkilerine rağmen Kappa reseptörüne bağlanmaktadır.
3. Pentazosin ve nalorfin de delta reseptörleri için afiniteye sahip olmakla birlikte, bu bağlanma ana olarak distfori ve ruh hali değişiklikleri (dopamin salınımının inhibisyonu) ile ilişkilendirilmiştir. Epsilon ve zeta reseptörlerinin insandaki rolü henüz tanımlanmamıştır. Pentazosinin afiniteye sahip olduğu iddia edilen sigma reseptörünün bir opioid reseptörünü temsil ettiği anlaşılmıştır (15).

2.5. Opioidlerin Genel Etki Mekanizmaları ve Toksik Etkileri

Opiyat toksisitesinin mekanizması merkezi sinir sistemi ve diğer dokulardaki stereospesifik, doyurulabilir bağlanma bölgeleri veya reseptörler ile doğrudan etkileşim ile ilgilidir. Bu reseptörler, çeşitli opioid etkileriyle kaydedilen deneysel gözlemlere göre sınıflandırılmaktadır. Opioid reseptörleri, iki pentapeptit, metiyonin-enkefalin ve lösin-enkefalin dahil olmak üzere birçok endojen ligandın biyolojik olarak aktif bölgeleridir. Endojen opioid benzeri maddelerin en güçlüsü β -endorfin gibi opioid reseptörlerine bağlanan büyük birkaç polipeptittir (28).



Şekil 2.5. Opioidlerin vücutta etki ettiği organlar (29)

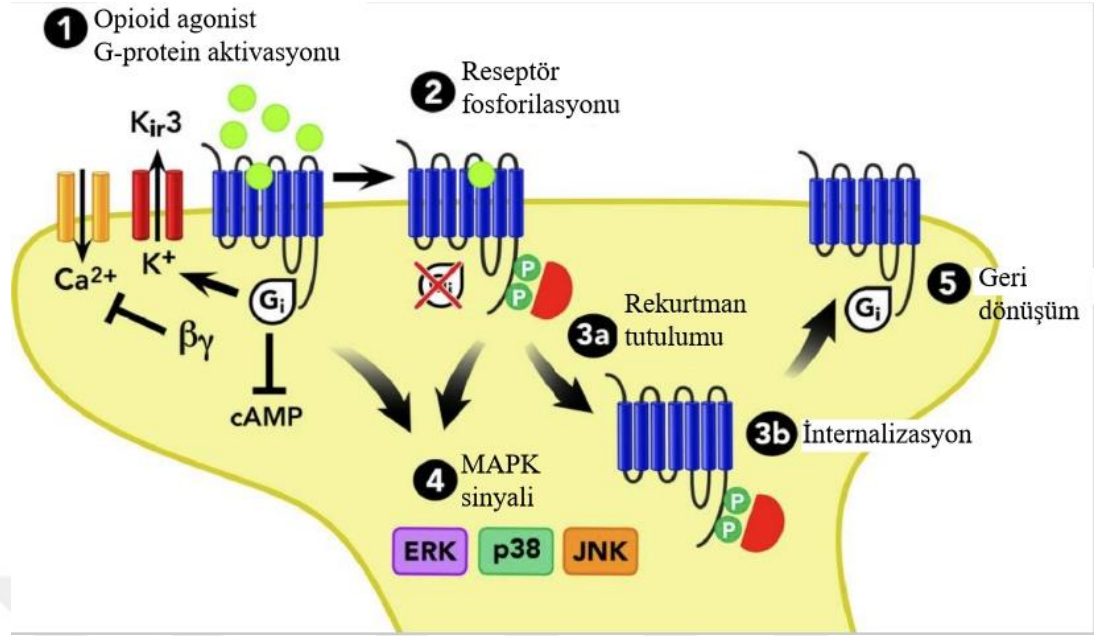
Opioid toksisitesinin klinik bulguları merkezi sinir sistemi depresyonu (koma), miyozis ve solunum depresyonu ile karakterizedir. Miyozis gözlenmesi hastanın yanıt verdiğini düşündürdüğü için genellikle cesaret verici bir işarettir (Şekil.2.5.) Solunum depresyonu; normal solunum ritminin korunmasından sorumlu beyin sapı ve medüllerdeki solunum merkezlerinin baskılanmasıyla meydana gelmektedir. Mü-

reseptör agonistleri solunumu doza bağımlı bir şekilde baskılamakta ve dakikalar içinde solunumun durmasına neden olabilmektedir. Akut opioid doz aşımının yüzde ellisine köpüklü, kardiyojenik olmayan, pulmoner ödem eşlik etmektedir ve bunlar ölümlerin çoğundan sorumlu olan bulgulardır(29).

Periferik etkiler bradikardi, hipotansiyon ve azalmış GI motiliteyi içermektedir. Artan antidiüretik hormon (ADH) salgılanmasının bir sonucu olarak idrar çıkışı da azalmaktadır (15).

2.6. Opioid Reseptörleri

Farmakolojik kanıtlar 1967'den bu yana opioidler için spesifik bağlanma bölgelerinin varlığını göstermiş, ancak spesifik opioid reseptörlerinin farklı alt tiplere sahip biyokimyasal varlıklar olarak tanımlanması, 1990'ların başında gerçekleşmiştir. Opioid reseptörleri, rodopsin benzeri aileye veya A sınıfı G proteinine bağlı reseptörlerdir (GPCRs). Klasik opioid reseptör alt tipleri μ (veya MOR), δ (veya DOR) ve κ (veya KOR) olarak adlandırılmaktadır. Bu grubun dördüncü üyesi, nosiseptin/orfanin FQ peptit (NOP) reseptörüdür. NOP başlangıçta bir "yetim" opioid reseptörü olarak kabul edilmiştir çünkü endojen ligandı karakterizasyonu sırasında tanımlanmamıştır. NOP, klasik opioid reseptörleri ile benzerlik göstermekle birlikte farklı farmakolojik etkiye sahiptir. Tüm opioid reseptörleri, % 49-58 birincil sekans özdeşliği sergilemektedir ve yapısal olarak benzemektedir. Farklı etkilerin ortaya çıkmasına aracılık eden reseptörler beyin, omurilik, deri ve gastrointestinal sistem boyunca dağılım göstermektedir. Diğer GPCR'ler gibi opioid reseptörleri de inaktif ve aktif konformasyonlar arasında farklı durumlar üstlenebilen, bağlayıcı ligandlar ve sodyum iyonlar ile G proteinleri gibi küçük moleküller tarafından düzenlenen dinamik yapılardır (5).



Şekil 2.6. Opioid Reseptörü; α G-protein alfa alt birimi, arrestin fosforilasyonuna bağlı GPCR yapı iskelesi, $\beta\gamma$ - G-protein beta-gama alt birimi, cAMP-siklik adenozin monofosfat, ERK $\frac{1}{2}$ - hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz, JNK - c-Jun N- terminal kinaz, p38- p38 MAPK, P-fosforilasyonu (28).

Opioid reseptörü sinyal iletimini ve trafiğini göstermektedir (Şekil 2.6.). Genel olarak, dört opioid reseptör alt tipinin tümü, μ , δ , κ ve ORL1 şeklindeki ortak yolları paylaşmaktadır. Yeni yapılan bir araştırma her bir opioid reseptöründeki seçici ligandların, opioid reseptörünü bir yada birden çok sinyalleme (önyargılı agonizm veya liganda yönelik sinyalleşme) lehine yönlendirebileceğini göstermektedir. Oklar, aktivasyon adımlarını ifade etmektedir; T çizgileri, işlevin bloklanmasını (engellenmesini) veya indirgenmesini ifade etmektedir (28).

2.7. Eroin

2.7.1. Eroin ve Tarihçesi

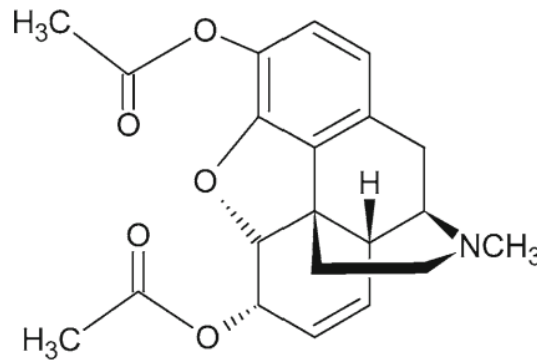
Eroin (3,6-diasetilmorfin, diamorfin) Bayer tarafından şiddetli akciğer hastalığı olan hastalarda solunuma yardımcı olmak için öksürük kesici olarak 1898'de kullanılmaya başlanan morfinin bir di-esteridir. Eroin ismi, diasetilmorfin formülasyonlarına veya birkaç saat kaynatılmış morfine Bayer tarafından verilmiştir. 1898'de Bayer Şirketi, ticari ölçekte eroin üretimine başlamıştır. İlk klinik sonuçlar

ümit verici olduğundan, eroin mucize ilaç olarak adlandırılmıştır. Eroinin klinikteki etkileri incelendiğinde solunum yolu hastalıklarında kodeinden çok daha yüksek etkinlik gösterdiği gözlenmiştir (30). Bununla birlikte bronşit, tüberküloz ve öksürüğe neden olan diğer solunum yolu hastalıklarının tedavisinde de eroin kullanılmıştır. 1906'da Amerikan Tabipler Birliği eroini genel kullanım için onaylamış ve morfin yerine kullanılmasını tavsiye etmiştir (31). 1910'ların başında eroinin öforik özelliklerini morfin bağımlıları tarafından keşfedilmiş olup bu etki intravenöz uygulamayla artırılmıştır. Eroin narkotik bir uyuşturucu haline gelmiş ve suistimal edilerek kullanımı hızla yayılmaya başlamıştır. Üretimi, kullanımı ve dağıtımına ilişkin kısıtlamalar uluslararası kanunlarla düzenlenmiştir. Eroin üretiminin tamamen yasaklanması da önerilmiştir. Sıkı düzenlemeler sonucunda eroin üretimi ve tüketimi 1931'den sonra önemli bir düşüş göstermiştir, ancak aynı dönemde eroin kısıtlaması fark edilmiş, yasadışı üretim ve kaçakçılığı başlamıştır (30,32).

Morfinden iki kat daha güçlü bir öksürük kesici olduğu bilinmekle birlikte analjezik gücünün morfinin iki ila üç katı yüksek olduğu, bağımlılık yapıcı özelliğinden dolayı birçok ülkede reçete edilmesi yasalandıktan onlarca yıl sonra anlaşılmıştır. Eroin, Birleşmiş Milletler'in uluslararası kontrol altındaki Narkotik uyuşturucular listesine dahil edildiği için bir suistimal edilebilir madde olarak kabul edilmektedir (33).

Ancak eroin tıbbi uygulamalardan tamamen yasaklanmamıştır; ilaç ve müstahzarları bugün hala İngiliz Farmakopesinde yer almaktadır (34).

2.7.2. Eroinin Fizikokimyasal Özellikleri



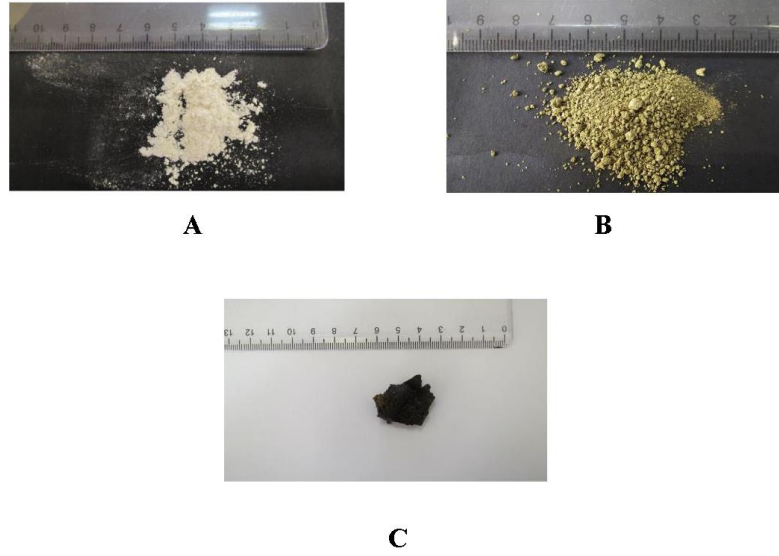
Şekil 2.7. Eroin kimyasal yapısı (26).

Eroin, kimyasal adı ile diasetilmorfin bir morfin esteridir. Kimyasal olarak sentezi 3. ve 6. pozisyonlarında bulunan iki hidroksil grubunun asetil gruplarıyla yer değiştirmesi ile gerçekleşmektedir. Eronin baz formu mevcuttur, ancak hidroklorür monohidrat tuzu farmasötik dozaj formlarında çok daha yaygın kullanılmıştır. Diasetilmorfin, morfin (P = 6) ve fentanil (P = 955) arasında bir partiyon katsayısına (P(oktanol/su) = 52) sahip olan lipofilik bir maddedir.

Diasetilmorfinin pKa'sı (7.6) fizyolojik pH'a yakın ve lipofilik olduğundan vücutta büyük oranda non-iyonize formda bulunmaktadır. Bu durum eroinin absorpsiyonunu artırırken, iyonize formu da çok iyi derecede suda çözünürlüğe sahiptir (35).

Diasetilmorfin bazının erime noktası (173 °C) hidroklorür tuzundan (243–244 °C) daha düşüktür. Bu durum da baz formun sigara şeklinde sarılarak, enfiye edilerek veya bir alüminyum folyo tabakası üzerinde toz halindeki ısıtılmış bir çözeltisinden buharının solunarak kullanımının tercih edilmesine sebep olmaktadır (35).

Sokak eroininin kimyasal bileşimi değişiklik göstermektedir: genellikle, bir kahverengi eroin numunesinin yaklaşık %35-45'i diasetilmorfin (hidroklorür) olarak tanımlanırken, beyaz eroin genellikle çok daha saftır ve diasetilmorfin hidroklorür içeriği %85-95'e kadardır. Diasetilmorfin (hidroklorür) dışında sokak eroinde bulunan maddeler; üretim safsızlıkları, seyrelticiler ve katkı maddeleri olarak ayrılabilir. İlk kategori morfin, kodein, papaverin, noskapin, asetilmorfin, asetilkodein, vb.'den oluşmaktadır; bunlar da eroin sentezinde kullanılan afyon veya morfinden kaynaklanan aktif maddeler ve asetilasyon prosesinden elde edilen ara ürünlerdir. İkinci kategori, esas olarak, inert hacim arttırıcı maddeler olarak kullanılan şekerleri içermektedir. Üçüncüsü, eroin gibi acı bir tada sahip olan veya bazı etkilerini taklit edebilecek katkı maddeleri olan parasetamol, kafein, fenobarbiton, metakalon, prokain, strikinin, kinin, pirasetam gibi aktif ilaçlar olabilir. Sokak eroinin etkinliği ve toksisitesi, safsızlıkların, seyrelticilerin ve katkı maddelerinin varlığından etkilenmektedir. Eroinin farklı formlarda bulunabilmekte olup saf ve katkılı formları şekil 2.8.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Eroinin çeşitli formları; En saf haliyle ince beyaz bir toz halinde eroin (A), Katkı maddeleri ile rengi değişen ve topaklaşan eroin (B), Katkı maddeleri ile siyah katran yapısında yapışkan bir malzemeye dönüşen eroin (C) (36).

Eroinin genel fizikokimyasal özellikleri Tablo 2.3'te özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Eroinin genel fizikokimyasal özellikleri (1).

| Özellik | Değer |
|-----------------------------|--|
| Molekül Formülü | $C_{21}H_{23}NO_5$ |
| Molekül Ağırlığı | 369,41 g/mol |
| Renk/ Form | Beyaz kristal/ kristal pudra Havaya maruziyet ile pembeye dönüşür. |
| Koku | Kokusuzdur. Havaya uzun süreli maruziyeti ile asetik bir koku yayar. |
| Tat | Bitter (Acı tada sahiptir.) |
| Kaynama noktası (BP) | 12 mm Hg'da 272-274 °C'de kaynar. |
| Erime Noktası (MP) | 173 °C |
| Yoğunluk (d) | 25 °C'de 1.56 g/cu m olarak ölçülmüştür. |
| LogP | log = 1,58 |
| Disosiyasyon Sabiti | pKa = 7,95 |
| Çözünürlük | 25 °C'de suda: 60 mg/L 1 g Eroin; 1,700 mL suda, 1,5 mL kloroformda, 31 mL alkolde, 100 mL eterde çözünmektedir. Amonyum ya da sodyum karbonatta kısmen çözünmektedir. Alkalilerde çözünmektedir. Benzende ise iyi çözünmektedir. |
| Buhar Basıncı (VP) | 25 °C'de 7,59x10 ⁻¹⁰ mm Hg |

2.7.4. Eroinin Farmakokinetik Özellikleri

Eroin, 3- ve 6- numaralı konumlarına hidroksil asetil grupları bağlı olan, iki bileşenli yarı sentetik bir morfin esteridir. Eroin gibi ester yapısındaki türevlerinin kan-beyin bariyerini öncü ürünü olan morfinden daha hızlı geçtiği düşünülmektedir ve farmakodinamik etkisinin morfinden daha yüksek olması bu şekilde açıklanmaktadır (38).

a. Eroinin Absorpsiyonu

Eroin, tüm uygulama yolları ile hızla emilmektedir. İntravenöz yolla uygulanan eroin 1 dakikadan kısa sürede kanda pik konsantrasyona ulaşırken, burun içi ve kas içi eroin uygulamalarında 3 ile 5 dakikada bu seviyeye gelmektedir. Deri altı eroin uygulamasında ise serumda pik yapma süresi 5 ile 10 dakika arasındadır (38).

Morfinin oral biyoyararlanımı %20-40'tır. Sigara şeklinde sarılarak kullanılan eroinin biyoyararlanımı ise yaklaşık %44-61'dir (38).

Eroin, morfinden ve diğer opioidlerden daha fazla yağda çözüldüğünden kan-beyin bariyerini 15-20 saniye içinde geçebilmekte ve beyinde etkisini gösterebilmektedir. İntravenöz(iv) morfinin %5'ten daha azı beyne ulaşabilirken bu oran iv eroinde %68 seviyelerindedir(39).

Eroin kullanan iki hasta ile yapılan çalışmada inhale ve intavenöz (iv) eroin verilmiştir ve biyoyararlanımları karşılaştırılmıştır. İki gönüllüde de inhale edilen eroin, iv olarak verilen eroine göre 1-5 dakika sonra kanda pik konsantrasyonuna ulaşmıştır (40).

Yapılan bir diğer çalışmada eroin hidroklorid partiküllerinin (sıvı aerosol) inhale edilmesi (solunması), %58'lik bir biyoyararlanım ile sonuçlanmıştır. İki deneğin üç inhalasyon seansını toz aerosol ile inhale etmesini takiben eroinin (baz) %35'lik biyoyararlanım ile sonuçlanmıştır (18).

b. Eroinin Dağılımı ve Yarılanma Ömrü

Morfin %12-35'i plazmada esas olarak albümine bağlanmakla birlikte yaklaşık %5'i g-globuline, %5'i α 1- asit-glikoprotein 'e de bağlanabilmektedir. Sağlıklı bireylerde kan/plazma konsantrasyonu oranı yaklaşık 1.02'dir(18).

Morfin kısmen hidrofilik özellik göstermektedir ve bu nedenle eroine kıyasla dokularda yavaş dağılır. Morfinin dağılım hacmi genellikle 1–5/ kg/L aralığındadır. Eroin ve metaboliti 6-MAM, kan-beyin bariyerini morfine göre daha kolay geçebilmektedir. Morfin, beyin kapiller endotelinde bulunan *P* glikoprotein tarafından beyne taşınır ve özellikle yüksek konsantrasyonda opioid reseptörleri bulunan hipokampusta birikmektedir(18).

c. Eroinin Metabolizması ve İtrahı

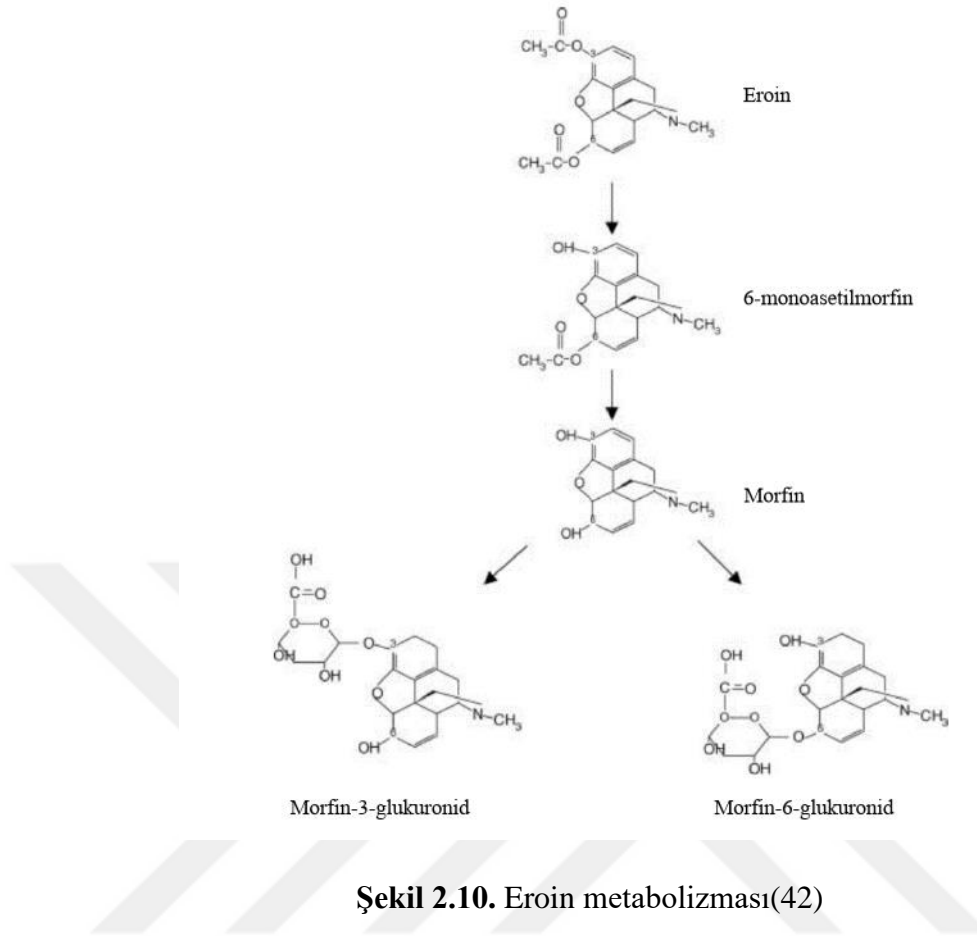
Eroin MSS'de 5-10 dakika içinde eroin monoasetilmorfine hidrolize olmaktadır. 20-30 dakikayı aşan bir sürede ise monoasetilmorfin morfine metabolize olmaktadır(41).

Absorpsiyondan sonra eroin, serum ve karaciğer esterazları tarafından hızla 6-monoasetilmorfine ve morfine hidrolize edilmektedir. Ayrıca, eroinin metaboliti morfin, glukuronidlere konjüge edilmektedir(18).

Eroin hızla 6-MAM'e ve morfine metabolize olmaktadır(39).

Morfin öncelikle 3 ve 6. pozisyonlarda sırasıyla morfin-3-glukuronid (M3G) ve morfin-6-glukuronid (M6G) oluşturmak için glukuronit konjugatına metabolize edilmektedir. Az bir miktarı (%5) CYP3A4 ve daha düşük ölçüde CYP2C8 enzimleri tarafından demetile edilerek normorfine dönüştürülür. Eroinin 2-6 dakikalık son derece kısa bir yarı ömrü vardır. 6-MAM ve morfinin yarı ömürleri sırasıyla 6–25 dakika ve 1,5–7 saattir. M6G morfinden daha yüksek potensli aktif bir metabolitidir. M6G'nin yarı ömrü $4 \pm 1,5$ saattir (39).

Eroin metabolizması Şekil 2.15.'te verilmiştir.



Şekil 2.10. Eroin metabolizması(42)

İdrarda pozitif morfin ölçülmesi genellikle son 2-3 gün içinde veya uzun süreli eroin kullanımı sonrasında göstermektedir. İdrarda 6-MAM saptanması ise eroin kullanımının önemli bir belirteç göstergesidir. Yüksek konsantrasyonlarda metabolit ölçülmesi ilacın kronik kullanımına işaret edebilmektedir (39).

Bir tek morfin dozunun yaklaşık %90'ı 72 saatte idrarla, %75'i M3G olarak ve %10'dan azı değişmemiş morfin olarak atılmaktadır (39).

2.7.5. Eroinin Farmakodinamik Özellikleri

Eroinin en önemli metaboliti ve prekürsörü olan morfin MSS üzerindeki ana etkilerini esas olarak μ -reseptörleri aracılığıyla ve daha sonra da κ - ile δ -reseptörleri ile etkileşerek göstermektedir. μ - reseptörleri hemen hemen her zaman presinaptik kavşaklarda bulunmaktadır. Opioidlerin, ödül ve bağımlılık mekanizmasında (nükleus akumbens'te) inhibe edici GABAerjik internöronlarda bulunan μ - opioid reseptörleri ile etkileşimi, bu nöronların inhibisyonuna yol açarak, dopaminerjik nöronların

inhibisyonunda azalmaya ve ödül mekanizmasıyla tekrarlayan ilaç kullanımıyla ilişkili artan sinaptik dopamin konsantrasyonlarına neden olmaktadır. μ -opioid reseptörlerinin en yüksek konsantrasyonunu içeren beyin bölgesi periakvaduktal gri maddedir ancak bu reseptörler aynı zamanda hipokampusta, omuriliğin yüzeysel sırt boynuzunda, koku ampulünün dış pleksiform tabakasında, nükleus akumbens'te ve ayrıca serebral korteksin bazı kısımlarında ve amigdalada da bulunmaktadır. μ 1-reseptörler ağrı modülasyonu, analjezi, solunum depresyonu, miyozis, öfori ve azalmış gastrointestinal aktivitede görev alırken, μ 2-reseptörlerinin etkileri solunum depresyonu, uyuşukluk, mide bulantısı ve zihinsel bulanıklıkla ilgilidir. κ -reseptörleri analjezi, diürez, sedasyon, disfori, hafif solunum depresyonu ve miyozis ile ilişkilendirilmiştir. δ -reseptörleri ise analjezi, disfori, sanrılar ve halüsinasyonların oluşumunda rol almaktadır(18).

2.7.6. Eroine Maruziyet Yolları

Eroin çok farklı yollarla uygulanarak kullanılabilir. Genelde sigara gibi içilebildiği gibi burundan çekilerek enfiye de edilmektedir. Nazal yol yanısıra intravenöz ve deri altı uygulama şeklinde de enjekte edilmektedir. Morfin ise oral, kas içi, damar içi, deri altı, rektal, epidural ve intratekal olarak kullanılabilir(39).

Biyoyararlanımdaki farklılara rağmen iv verilen ya da içilen eroinin farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri yönünden çok benzer olduğu görülmüştür(39).

Bilinen ilk empirik çalışma, iv uygulama ile vücuda verilen eroin aynı miktarda içilen eroine kıyasla daha şiddetli (toplam ve maksimum olarak) yoksunluk sendromuyla bağlantılı olduğunu göstermiştir (43).

2.7.7. Eroinin Toksik Etkileri

Eroinin opiat reseptörlerine afinitesi düşüktür ve yüksek oranda lipofilik bir morfin taşıyıcısı gibi davranmaktadır. Bu da daha hızlı ve daha yoğun MSS etkilerine neden olmaktadır. Farmakolojisinin çoğu, aktif metabolitleri olan 6-MAM, morfin ve M6G aracılığı ile gerçekleşmektedir. Morfinin etkileri dozuna ve veriliş yoluna bağlı olarak, 5-60 dakika içinde başlayıp ve 4-6 saat sürebilmektedir. Eroin kullanımını takiben yaşanan yoğun öfori genellikle 45 saniyeden birkaç dakikaya kadar

sürebilmektedir. Pik etkileri 1-2 saat sürebilir ve genel etkiler 3-5 saat içinde kaybolmaktadır(39).

Eroinin toksik ve öldürücü dozları büyük ölçüde kullanan kişinin maddeye karşı toleransına bağlıdır. Bu nedenle bir bağımlının birkaç günlük yoksunluğunun ardından toleransında meydana gelen düşüş normal koşullarda onun için olağan kabul edilen bir dozu tehlikeli hale getirebilmektedir. Eroin dozunun 20 mg'ı ile, tolerans göstermeyen deneklerde öldürücü olabilirken, bağımlılar 10 kat daha yüksek dozları tolere edebilir. 12 mg'lık bir dozdan sonra ise solunum depresyonundan kaynaklanan ölümler gözlenmiştir. Ölümcül doz aşımından sonra morfinin plazma konsantrasyonu genellikle 0,1-2,8 mg/1 aralığındadır ve öldürücü doz 12-180 mg aralığındadır (39).

Tablo 2.4. Eroinin LD₅₀ değeri (1).

| Eroinin LD ₅₀ Değeri | Eroinin Veriliş yolu |
|---------------------------------|-----------------------|
| 137 µg/kg | Fare (intracerebral) |
| 261,6 mg/kg | Fare (derialtı) |
| 21,8 mg/kg, 23 mg/kg | Fare (iv), Sıçan (iv) |

Eroinin LD₅₀ değeri farelerde yaklaşık 21,8 mg /kg (iv) ve sıçanlarda 23 mg kg1 iken (Tablo 2.5.), morfin için farelerde LD₅₀ 226-318 mg kg1 (iv)'dir (1).

Eroine bağlı toksik etkiler akut veya kronik maruziyet durumuyla ortaya çıkmakta ve farklı klinik tablolara neden olabilmektedir. Kronik eroin bağımlıları sıklıkla rabdomiyoliz yaşamaktadır, bu durum da eroin etkisi altındayken yaşanan uzun süreli hareketsizlik sırasında kas sıkışması nedeniyle damar arzının tıkanması ile şiddetlenmektedir. Bağımlılığın sonucu olan böbrek hasarı terminal böbrek yetmezliğine kadar ilerleyebilmektedir. Lenfosit proliferasyonunda, spontan sitolitik aktivitede, fagositozda ve interferon üretiminde azalma ile ilişkili olabilecek muhtemelen immün yetersizliğe bağlı olarak solunum ve deri komplikasyonları da gözlenebilmektedir. Eroin bağımlılarında antijenik stimülasyona bağlı splenomegali de tanımlanmıştır (44).

a. Akut Eroin Toksisitesi ve Tedavisi

Eroin beyne ulaştıktan sonra burada morfine dönüştürüp ve hızla opioid reseptörlerine bağlanmaktadır. Eroin kullanan kişiler tipik olarak öforik bir haz duygusu dalgası hissettiklerini bildirmişlerdir. Öforinin yoğunluğu; alınan madde miktarıyla, maddenin beyne ulaşma süresiyle ve opioid reseptörlerine bağlanmasıyla ilişkili fonksiyondur (45).

Eroin ile hissedilen bu hızlı etkiye genellikle deride sıcak bir kızarma, ağız kuruluğu ve ekstremitelerde ağırlık hissi eşlik etmektedir. Mide bulantısı, kusma ve şiddetli kaşıntı da görülebilmektedir. Görülen ilk etkilerin ardından eroin kullanıcılarında genellikle birkaç saat uykulu olma hali, zihinsel işlev bulanıklığı, yavaşlamış kalp fonksiyonu ve bazen yaşamı tehdit edecek kadar ciddi derecede yavaşlamış solunum fonksiyonları görülmektedir. Yavaşlamış solunum fonksiyonları ayrıca komaya ve kalıcı beyin hasarına yol açabilmektedir (45).

Akut toksisite durumundan klinik değerlendirme hava yolu ve solunuma öncelik verecek şekilde yapılmaktadır. Uyuşturucu bakmak için yapılan idrar testinde eroin; morfin, kodein, hidromorfon ve hidrokodon ile birlikte opioid testinde pozitif sonuç vermektedir. Diğer opioidler genellikle bu testte pozitif sonuç vermemektedir. Metadon, oksikodon, fentanil, buprenorfin ve tramadol dahil olmak üzere bu opioidlerin ayrıca test edilmeleri gerekmektedir. Eroin kullanımını kanıtlayan tek idrar bulgusu 6-MAM tespittir. Bu metabolit, eroin metabolizmasının spesifik bir yan ürünüdür. 6-MAM idrarla hızla atılmakta ve eroin suistimalinden 8 saatten daha kısa bir süre sonra idrarda tespit edilebilmektedir (46).

Eroinin doz aşımı alımına bağlı hipopne (etkisiz şekilde yavaş ve sığ nefes alma) apneye ilerleyebilmektedir. Bu durum da nalokson akut toksisite tedavisinin temel dayanağıdır ancak birinci basamak tedavinin ilk adımı hava yolu kontrolü ve kurtarıcı solunum uygulamalarından geçmektedir (46).

Tıbbi müdahale yapan sağlık profesyonelleri akut toksisite durumunda mevcut nalokson uygulama yöntemlerini değerlendirirken, hayati organların oksijensiz kalmaması için oksijen desteği için bir müdahale başlatılmalıdır. Temel yaşam desteği Gelişmiş Kardiyak Yaşam Desteği doz aşımı ile gelen hastaya uygulanmalıdır (46).

Başlangıç olarak iv. 0,4-0,8 mg'lık bir intravenöz nalokson dozu genellikle nörolojik ve kardiyorespiratuar semptomları doz aşımına sebep olan madde karfentanil

ve benzeri maddelerle kontamine olmamış saf eroin ise hızla tersine çevirebilmektedir. Eroinin hasta sisteminden temizlendiğinden emin olunması için kardiyorespiratuar durumun ve vital bulguların takibi gereklidir. Aşırı dozda eroin aldıktan sonra nalokson ile tedavi edilen hastalar, normal mentaliteye ve yaşamsal belirtilere sahiplerse, hastaneye veya acil servise nakledilmeden güvenli bir şekilde taburcu edilebilirler (46).

Aşırı dozda eroin aldıktan sonra nalokson ile tedavi edilen hastalar, normal mental ve yaşamsal belirtilere sahiplerse hastaneye veya acil servise nakledilmeden güvenli bir şekilde taburcu edilebilirler (46).

b. Kronik Eroin Toksikitesi ve Tedavisi

Tekrarlayan eroin kullanımı beynin fiziksel yapısını, fizyolojisini değiştirmekte ve nöronal, hormonal sistemlerde kolayca tersine çevrilemeyen uzun vadeli dengesizlikler yaratmaktadır. Çalışmalar, eroin kullanımına bağlı olarak beynin beyaz maddesinde; karar verme, davranış düzenleme, stresli koşullara cevap üretme yetilerinde bir miktar bozulma olduğunu bildirmiştir (47).

Eroin ayrıca ciddi derecede tolerans ve fiziksel bağımlılık üretmektedir. Tolerans, eroin kullanan kişinin aynı etkileri elde etmek için daha fazla madde kullanımına ihtiyaç duyması durumunda ortaya çıkmaktadır. Vücut maddenin varlığına fiziksel bağımlılık ile uyum sağlamaktadır ve kullanımın aniden azaltılması durumunda yoksunluk belirtileri ortaya çıkmaktadır. Maddenin alınma yolundan bağımsız olarak kronik eroin kullanıcıları uykusuzluk ve kabızlık da dahil olmak üzere çeşitli tıbbi komplikasyonlar yaşamaktadır (47).

Eroine karşı geliştirilen tolerans, kan veya plazmadaki morfin konsantrasyonunun yorumlanmasını son derece zorlaştırmaktadır. Aşırı dozda eroinin sebep olduğu ölüm sonrası analizlerde (post mortem) kan morfin konsantrasyonları 0.1 ve 2.8 mg/ml arasında bulunmaktadır (47).

Opiat intoksikasyon sendromu ilk olarak depresif bilinç düzeyi, miyotik göz bebekleri ve baskılanmış solunum semptomları üçlüsü olarak 1970'lerde tanımlanmıştır (45).

Yüksek doz eroin tedavisi gören hastalarda hastaneye yatış oranı %3 - %7 arasında değişmiştir ve başvuru tanısı kardiyojenik olmayan pulmoner ödem

(hastaların %1 ile %2,4'ü), pnömoni (%0,5), olası endokardit (%0,25), ve kalıcı bir zihinsel durum değişikliği veya solunum depresyonu (%0,7 ila %4) görülmüştür (45).

Kronik eroin kullanımında ortaya çıkan nörotoksositeye bağlı olarak kullanıcılarda dikkat bozukluğu, öğrenme, hafıza, reaksiyon süresi, bilişsel esneklik, dürtü kontrolü ve seçici işleme dahil olmak üzere çeşitli merkezi sinir sistemi (MSS) işlev bozuklukları sergilemektedir. Bu bulgular, bu maddenin normal beyin fonksiyonlarını değiştirebileceğini ve muhtemelen nörotoksositeye neden olabileceğini düşündürmektedir. Nörotrofinler, MSS nöronları için hayatta kalma faktörleri olarak hizmet eden bir protein sınıfıdır. Özellikle sinir büyüme faktörü (SBF), kolinerjik nöronların hayatta kalmasında ve işlevinde önemli bir rol oynamakta ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BKNF) sinaptik plastisitede ve orta beyin dopaminerjik ve kolinerjik nöronların korunmasında yer almaktadır. Yapılan bir klinik çalışmada BKNF faktörü eroin kullanıcılarında azalırken, SBF hem eroin hem de kokain kullanıcılarında azalmıştır. Bulgular, SBF ve BKNF'nin bu ilaçların neden olduğu nörotoksosite ve bağımlılıkta rol oynayabileceğini göstermektedir. Şizofreninin nörotrofin hipotezi ışığında, veriler aynı zamanda düşük nörotrofin düzeylerinin madde kullanıcılarında gelişen psikoz ile şizofreninin riskini artırabileceğini düşündürmektedir (48).

Kronik eroin kullanımına bağlı böbrek hasarı ilk kez McGinn ve arkadaşları tarafından 1970 yılında tanımlanmıştır. 17-22 yaş aralığındaki 3 eroin bağımlısında nefrotik sendrom görüldüğünü renal biyopsi ile göstermişlerdir. Bu bağımlılarda 3 aylık prednison, azatioprin ve bunların kombinasyonu ile uygulanan tedaviye rağmen stabil veya ileri proteinüre görülmüştür. Bu hastaların birinde yapılan 2. biyopsinin ardından membranöz glomerülo nefrit (MGN) saptanmıştır (48).

Diğer vaka çalışmaları serilerinde biyopsi yapılan eroin kullanıcılarında fokal ve segmental glomerüloskleroz (FSGS) yaygın bir glomerüler lezyon olarak görülmüştür. Bu çalışmada böbrek hasarı başlamadan önce 1-18 yıldır eroin enjekte ettiğini kabul eden 19-34 yaş arası siyahi erkek hastalar incelenmiştir. Üç hastanın yakın zamanda ikterik hepatit ve diğer üç hastanın yüksek Antistreptolizin O (ASO) titreleri öyküsü vardı. İmmünofloresan çalışmaları, tutarlı bir fokal ve segmental glomerüler IgM ve C3 birikintileri modeli saptamıştır (49).

Bir başka klinik çalışmada FSDS bulgularının aksine bazı renal biyopsilerde sklero glomerülo nefrit prevalansının yüksek olduğunu saptamıştır. 15 yıllık eroin

kullanım hikayesi olan 23 siyahi erkek hasta hipertansiyon, böbrek yetmezliği, proteinüre ve üriner anormallikler saptanmıştır. Bu çalışmalar sonucu kronik eroin kullanımını böbrek hasarı ile ilişkilendirilmiştir (49).

Kronik eroin bağımlılığı tedavisinde ilaçlar ve davranış terapileri de dahil olmak üzere bir dizi tedavi insanların eroin kullanımını bırakmalarına yardımcı olmaktadır. Her bir hastanın özel ihtiyaçlarını karşılamak için en iyi tedavi yaklaşımını hastayla eşleştirmek önemlidir (6).

Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış Lofeksidin isimli opioid yoksunluk semptomlarını azaltmak için tasarlanmış opioid olmayan bir ilaç bulunmaktadır (50).

Eroin kullanım bozukluğu dahil olmak üzere opioid kullanım bozukluklarına yönelik ilaçlar güvenli, etkili ve hayat kurtaran ilaçlar olarak kabul edilmektedir. Bu ilaçlar, beyinde eroinin etki ettiği aynı opioid reseptörler ile etkileşime girmektedirler ancak aynı etkileri yaratmamaktadırlar (6).

Tablo 2.5. Eroinin sistemler üzerindeki etkileri (28)

| Organ Sistemi | Etkileri |
|-------------------------------|---|
| Merkezi Sinir Sistemi | Analjezi (↑) Öfori (↑) Sedasyon (↑) Solunum Hızı (↓) Miyozis (Göz Bebeklerinin Daralması) Gövde Sertliği (↑) Mide Bulantısı ve kusma (↑) |
| Mide-Bağırsak Sistemi | Kabızlık (↑) Mide hareketliliği (↓) İnce bağırsakta sindirim (↓) Kolondaki peristaltik dalgalar (↓) Safra düz kasının daralması (↑) Özofagus reflü (↑) |
| Diğer Düz Kaslar | Böbrek fonksiyonunun depresyonu (↑) Rahim tonu (↓) İdrar retansiyonu (↑) |
| Deri | Kaşınıtı ve terleme (↑) Yüz, boyun ve göğüste kızarma (↑) |
| Kardiyovasküler Sistem | Kardiyovasküler sistem stres altındaysa kan basıncı ve kalp atış hızı (↓) |
| Bağışıklık Sistemi | İnsan lenfositleri tarafından rozet oluşumu (↓) Doğal öldürücü hücrelerin sitotoksik aktivitesi (↓) |
| Diğer | Davranışsal huzursuzluk |

Tablo 2.6. Antidotol tedavi seçenekleri (6).

| | |
|--------------------|--|
| Metadon | Opioid reseptörü tam agonisti; yoksunluk semptomlarını ve isteklerini hafifletmek için opioid reseptörlerine bağlanıp ve onları aktive etmektedir. |
| Buprenorfin | Opioid reseptörü kısmi agonisti; yoksunluk semptomlarını ve isteklerini hafifletmek için opioid reseptörlerine bağlanıp ve kısmen aktive etmektedir. |
| Naltrekson | Opioid reseptörü antagonisti; eroinin opioid reseptörlerine bağlanmasını önleyerek etkilerini bloke etmektedir. |

2.7.8. Eroin Toksisitesinde Oksidatif Stresin Rolü

Reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS), çeşitli patolojik durumlar yanısıra normal fizyoloji sırasında üretilen aerobik metabolizmanın ürünleridir. Hücrenin hayatta kalması, çoğalması, farklılaşması ve apoptoz dahil olmak üzere hücrel fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Ancak bölgesel veya sistemik stresin ROS veya RNS üretimini artırması, endojen antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kalması ile oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması durumunda oksidatif stres meydana gelmektedir (51).

Bu sitotoksik süreç, proteinlere, DNA'ya ve lipitler gibi önemli makromoleküllere zarar verme ve apoptoza yol açan sinyal yollarını aktive etme potansiyeline sahiptir. Bu nedenle, bir hücrenin oksidanlar, antioksidanlar veya redoks durumu arasındaki denge, sağlıklı hücre yaşamı ve işlevi için kritiktir. Redoks durumu, hücreler içinde büyük ölçüde bölümlere ayrılmıştır ve farklı hücrel aktiviteleri yansıtmaktadır. Örneğin mitokondrideki yüksek metabolik aktivite, sitozolden nispeten daha fazla indirgeyici bir ortam gerektirir. Redoks homeostazının sürdürülmesi, vücudun oksijen ihtiyacının yaklaşık %20'sini tüketen bir organ olan beyinde özellikle kritiktir; beyin yüksek konsantrasyonda oksidasyona eğilimli çoklu doymamış lipitlere ve daha düşük seviyelerde antioksidan enzimlere sahiptir (51).

ROS üretimi ile antioksidan kapasite arasındaki oksidatif stresle sonuçlanan dengesizlik, nöroinflamatuvar ve nörodejeneratif süreçlere bağlı olanlar da dahil olmak üzere nörolojik bozuklukların etiyolojisinde rol oynamaktadır (51).

Oksidatif stres oluşumuna bağlı olarak proteinlerde oksidasyon oluşur. Oksidatif ve nitrozatif strese karşı vücudun korunmasına vücudun en önemli küçük ve hidrofilik özellikteki γ -glutamilsistein-glisin yapısında bir tripeptid olan glutatyon (GSH) aracılık etmektedir. Spesifik beyin bölgelerindeki GSH içeriğinde oksidatif stres kaynaklı azalma, daha önce Parkinson hastalığı, şizofreni, Alzheimer ve epilepsi gibi nörolojik bozukluklarla ilişkilendirilmiştir. Merkezi sistein varlığı nedeniyle, GSH indirgenmiş formda ya da oksidatif koşullar altında glutatyon disülfid (GSSG) olarak bulunmaktadır. Bu nedenle GSH:GSSG oranı, belirli bir hücresel bölme içindeki redoks metabolizmasının bir göstergesini sağlamaktadır (51).

Azalan GSH, beyin dokularında yüksek (2-3 mM) konsantrasyonlarda bulunmaktadır ve normal homeostaz sırasında hücrenin indirgen durumuna katkıda bulunmaktadır. Bu indirgen hücre içi ortamın bir sonucu olarak birçok sitoplazmik protein, oksidatif modifikasyona uğrayabilen serbest sistein tiyolleri açısından zengindir. GSH'deki sistein kalıntısının tioller ve sülfenik asit dahil olmak üzere kısmen oksitlenmiş reaktif protein tiyolleri ile karışık bir disülfid oluşturmak üzere konjugasyonu S-glutatiyonilasyon olarak bilinir (51).

Glutatyon, sentezlenen ve hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda (mM) tutulan bir tripeptittir (γ -L-glutamil-L-sisteinilglisin, GSH). C-glutamilsistein ara maddesi ilk olarak c-glutamilsistein sentetaz enzimi (glutamat sistein ligaz) aracılığıyla L-glutamat ve sisteinden sentezlenmektedir. Bu reaksiyon, glutatyon sentezinde hız sınırlayıcı adım olmakla birlikte sonraki bir sentez adımında; L-glisin glutathione sentetaz enzimi aracılığıyla γ -glutamilsisteinin C-terminaline eklenmektedir (51).

Glutatyon (GSH), bir tripeptit, γ -L-glutamil-L-sisteinilglisindir (52). Glutatyon, hücrelerde bol miktarda tiyol içeren düşük molekül ağırlıklı madde olmakla beraber glutamat, sistein ve glisinden sentezlenmektedir. N-asetilsistein, hücre içi GSH sentezi için kararlı, etkili bir sistein öncüsüdür (4). En yüksek konsantrasyon karaciğerde olmak üzere tüm memeli dokularında 1-10 mM konsantrasyonlarda bulunmaktadır. En fazla miktarda bulunan protein olmayan (non-protein) tiyol olarak oksidatif strese karşı koruyucu bir etki göstermektedir. GSH aynı zamanda redoks sinyalinde, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda hayati önem taşımaktadır ve hücre çoğalması, apoptoz, bağışıklık fonksiyonu ve fibrogenezi modüle etmektedir. Karaciğer GSH homeostazında organlar arası merkezi bir rol oynamaktadır (52).

GSH'nin antioksidan işlevi büyük ölçüde GSH peroksidaz (GPx) katalizli reaksiyonlar tarafından; hidrojen peroksit ve lipid peroksidi GSH olarak indirgeyip, GSSG'ye yükseltgeyerek gerçekleşmektedir. GSSG, NADPH'ın kaybı pahasına GSSG redüktaz tarafından tekrar GSH'ye indirgenir ve bir redoks döngüsü oluşturur. Organik peroksitler ayrıca GPx ve GSH S-transferaz ile indirgenebilmektedir. Katalaz ayrıca hidrojen peroksidi de azaltabilir ancak yalnızca peroksizomda bulunmaktadır. Bu da GSH'yi hem fizyolojik hem de patolojik olarak üretilen oksidatif strese karşı savunmada mitokondride özellikle önemli kılmaktadır. GSH'den GSSG'ye oranı, hücre içi redoks potansiyelini büyük ölçüde belirlediğinden ($[GSH]^2 / [GSSG]$ logaritmasıyla orantılı), oksidatif stres hücrenin GSSG'yi GSH'ye indirgeme kabiliyetini aştığında redoks dengesinde büyük bir kaymayı önlemek için GSSG aktif olarak hücre dışına ihraç edilebilme veya bir protein sülfhidril grubu ile reaksiyona girerek karışık bir disülfid oluşumuna yol açabilmektedir. Bu nedenle, şiddetli oksidatif stres hücrenin GSH'yi tüketir(52). GSH'nin tükenmesi durumunda, makromoleküllere kovalent bağlanma ve/veya enzimlerdeki sülfhidril gruplarının oksidasyonu hücre ölümüne neden olabilmektedir (53).

Yarısı erkek yarısı dişi olmak üzere 120 deney Kunming deney faresinin kullanıldığı bir *in vivo* çalışmada, *ad libitum* ortamdaki farelere intraperitoneal olarak 40 gün boyunca enjeksiyon yapılmıştır. Deneye alınan fareler rastgele olacak şekilde her grup kendi kontrolü ile beraber üç gruba ayrılmıştır. I, eroine bağlı grup olmak üzere 40 gün boyunca eroin enjekte edilmiştir. (Gün₁₋₅=1.0, Gün₆₋₁₀=2.0, Gün₁₁₋₁₅=4.0, Gün₁₆₋₂₀=8.0, Gün₂₁₋₂₅=16.0, Gün₂₆₋₃₀=20.0, Gün₃₁₋₃₅=25.0, Gün₃₆₋₄₀=30.0, mg.kg⁻¹, günde bir defa intraperitoneal olarak). II, antioksidan koruyucu grup olmak üzere II, eroin ile kombine intraperitoneal olarak 1-40 gün boyunca uygulanan antioksidanlar ile oluşturulmuş grup. III, antioksidan tedavi grubu olmak üzere, eroin bağımlı grupların stratejisine göre 40 gün boyunca eroin ile uygulamadan sonra, antioksidanlar 41. günden 50. güne kadar tek başına intraperitoneal olarak verilmiştir (54).

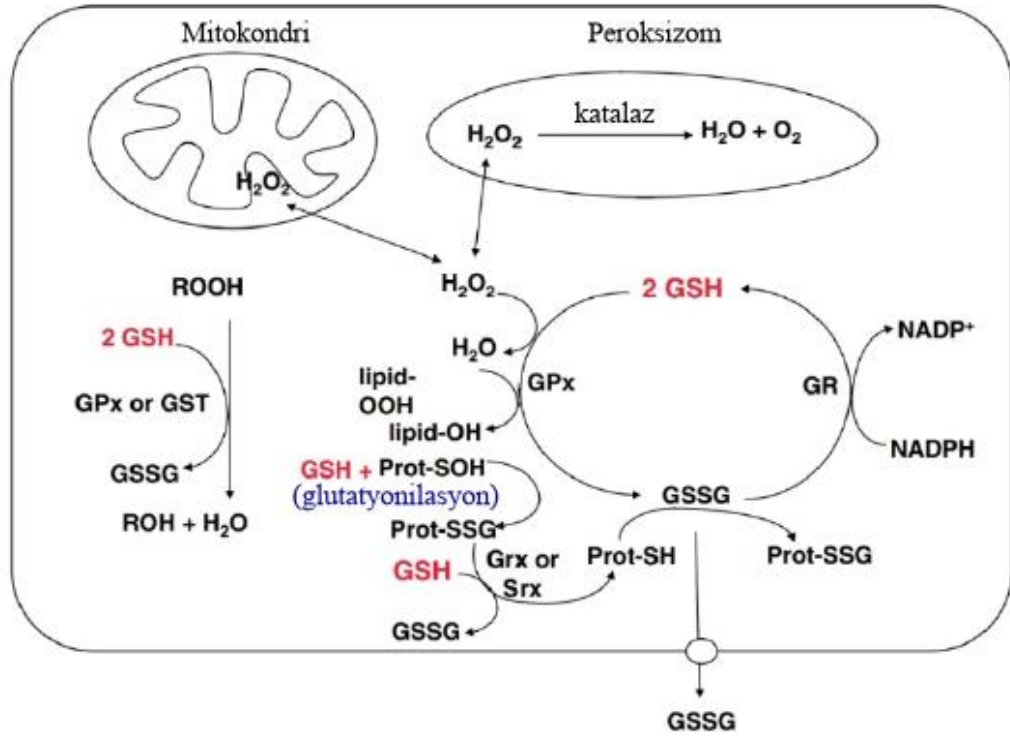
Antioksidanların dozu şu şekilde verilmiştir: Askorbik asit (1 mg/g/gün), ürik asit (0,5 mg/g/gün, intraperitoneal), glutatyon (1,2 mg/g/gün) ve mannitol (1,2 mg/g/gün) normal tuzlu suda çözülmüştür, kuersetin (0.5 mg/g/gün) ve resveratrol (0.5

mg/g/gün) dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözüldü (%1'lik son konsantrasyon). Tüm kontrol grupları intraperitoneal olarak aynı hacimde solvent almıştır (54).

Çalışmanın sonucunda eroinin, DNA hasarlı hücrelerin yüzdesini artırdığı beyin ve periferik kan lenfositlerinde, karbonil grubu içerikleri (oksidatif hasarlı protein üretimi) ve malondialdehit (MDA, lipidlerin oksidatif hasarlı üretimi) uzamış uygulama süresi ve artan doz ile beyin ve serumda gösterilmiştir.

Eroin sonuç olarak serumun toplam antioksidan kapasitesini ve beyindeki antioksidatif enzim aktivitelerini azaltmıştır. Toplam antioksidan kapasitesi, SOD ve CAT aktiviteleri başlarda daha yüksekken 15-20 günün sonrasında kademeli olarak düşmüştür. Hatta uzatılmış uygulama süresi ve artan doz ile oluşturulmuş kontrollerde toplam antioksidan kapasites GSH peroksidaz aktivitesi tüm test periyodunda önemli ölçüde azalırken bunun bile altına düşmüştür (54).

Genel olarak, eroin gibi bazı eğlence amaçlı uyuşturucu maddelerin kronik olarak suiistimal edilmesi insan beynine hasar verir ve bu nörotoksik hasarın en azından bir aşaması oksidatif stresten kaynaklanmaktadır. Merkezi sinir sisteminde eroine maruziyetin etkilerinin oksidatif strete rol oynadığına dair kanıtlar bulunmaktadır. Beyin çok fazla miktarda çoklu doymamış yağ asitleri içerdiğinden vücut tarafından kullanılan oksijenin %20'ye kadarını tüketmektedir ve düşük antioksidan aktivite göstermektedir. Özellikle de reaktif oksijen türlerinin sebep olduğu toksisiteye karşı daha hassas olduğu görülmektedir. Glutasyon ve glutatyona bağlı enzimler beyindeki antioksidan ve detoksifikasyon süreçlerinde önemli rol oynamaktadır. İndirgenmiş GSH; tek başına veya serbest radikallerin indirgenmesinde rol oynayan enzimlerle iş birliği yaparak, beyindeki oksidatif hasarı ve diğer antioksidanların rejenerasyonunu onaran en önemli enzimatik olmayan antioksidanlardan biri olduğu gösterilmiştir.



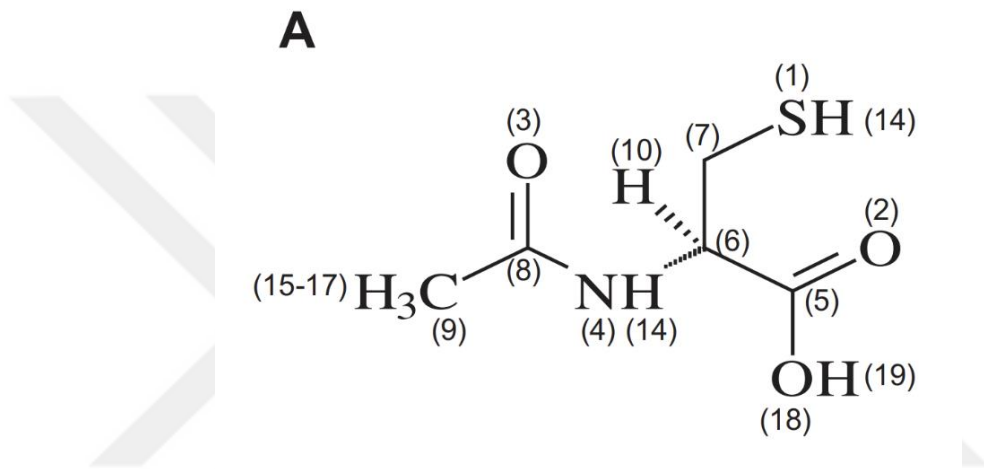
Şekil 2.11. GSH'ın antioksidan fonksiyonu(55)

Aerobik metabolizma, sitozol ve mitokondride GSH peroksidaz (GPx) tarafından ve peroksisomda katalaz tarafından metabolize edilebilen hidrojen peroksit (H_2O_2) üretmektedir. GSSG, NADPH pahasına GSSG redüktaz (GR) tarafından tekrar GSH'ye indirgenebilir, böylece bir redoks döngüsü oluşturulur. Organik peroksitler (ROOH), GPx veya GSH S-transferaz (GST) ile indirgenebilmektedir. GSH ayrıca protein redoks sinyalleşmesinde de önemli bir rol oynamaktadır. Oksidatif stres sırasında, protein sistein kalıntıları, GSH ile reaksiyona girerek protein karışık disülfürler Prot-SSG (glutathionilasyon) oluşturmak üzere sülfenik aside (Prot-SOH) oksitlenebilir; bu da glutaredoksin yoluyla tekrar Prot-SH'ye (Grx) veya sülfiredoksin (Srx) indirgenebilmektedir. Bu, hassas protein tiyollerini geri dönüşsüz oksidasyondan koruyan bir mekanizmadır ve ayrıca oksidatif koşullar altında GSH kaybını önlemeye de yardımcı olabilmektedir. Hücrenin GSSG'yi GSH'ye indirgeme yeteneği, şiddetli oksidatif hasar sırasında aşılabilir ve bu da GSSG birikimine yol açabilmektedir. Redoks dengesinde bir kaymayı önlemek için, GSSG ya aktif olarak hücre dışına taşınabilmekte ya da karışık bir disülfid (Prot-SSG) oluşturmak üzere bir protein sülfhidril (Prot-SH) ile reaksiyona girebilmektedir (52).

Hepatosit hücre kültürü ile yapılan bir çalışmada 3 saat eroin ile muamele edilen hücrelerde maksimum GSH tüketimi gözlenmiştir. 24 saat boyunca sıçan hepatositlerinin eroin inkübasyonu ile doza bağlı sitotoksisite ile sonuçlandığı görülmektedir (56).

2.8. N- Asetilsistein

N-asetilsisteinden (NAC) ilk olarak 1962'de bir mukolitik ajan olarak bahsedilmiştir (57).



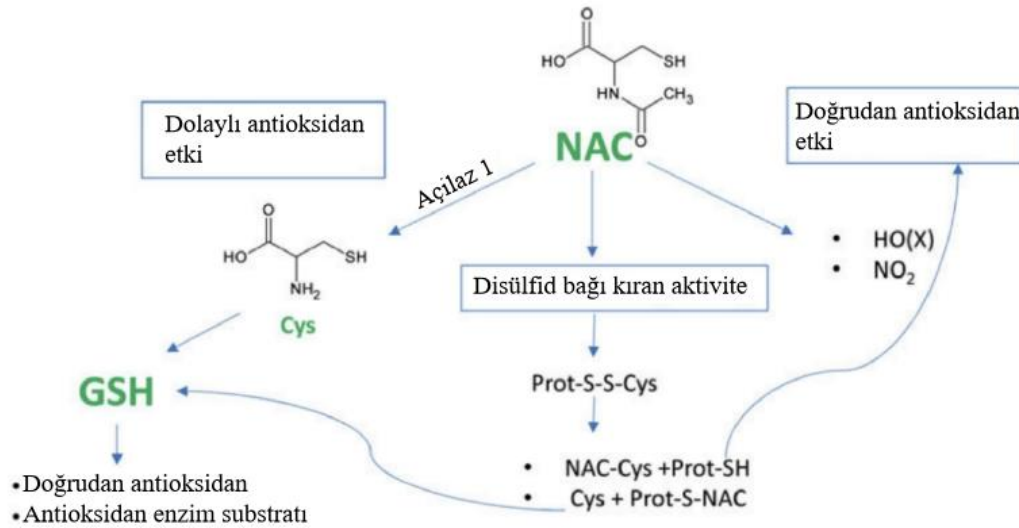
Şekil 2.12. NAC'ın kimyasal yapısı (57).

N-asetilsistein, reaktif elektrofilleri ve serbest radikalleri konjugasyon ya da indirgeme reaksiyonları aracılığı kararlı hale getirerek detoksifiye edebilmektedir. İlk olarak, reaktif oksijen türlerini daha az reaktif olanlara indirgemektedir. İkinci olarak ise birçok doku ve hücrede doğrudan bir antioksidan veya GSH redoks döngüsünde bir substrat olarak hizmet eden GSH biyosentezinin önemli bir basamağında gerekli olansisteini oluşturmak için deasetillenmektedir. Böylece GSH sentezini desteklemektedir (53).

N-asetilsistein, asetaminofen doz aşımı için bir antidot görevi görmektedir ve aynı zamanda mukolitik bir ajan olarak etkisini göstermektedir. NAC'ın etki mekanizması bir indirgeme aktivitesidir (58). NAC fizyolojik etkisini solunum yolunda mukozanın viskozitesinin azaltarak ve glutatyon konsantrasyonunu arttırarak göstermektedir (53).

Oral olarak alındığında hızla emilen NAC, deasetillenmekte ve hücre içi ile hücre dışı GSH depolarına katılmaktadır. NAC, sistein türevlerinden biri olarak kabul edilmektedir ve en az toksisite ile en iyi GSH prekürsörü olma yetisini aynı anda gösterebilmektedir (53).

N-asetilsistein, acil durum prosedürlerinden kaynaklanan aşırı doz kullanımında ve hastada alta yatan patofizyolojik durumların yarattığı durumların varlığında bile vücutta iyi tolere edilmektedir. NAC oksidatif stresin katkıda bulunduğu hastalık durumunun başlangıç ve ilerlemesi sırasında tedavisi amaçlı olarak 1980'lerden beri önerilmektedir. Pek çok *in vitro* çalışma, oksidatif süreci değerlendirmek için farklı oksidanlar, substratlar ve yöntemler kullanarak NAC'nin antioksidan aktivitesinin etkinliğini bildirmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, biyoyararlanımı ve güvenliği dikkate alınarak NAC ayrıca birçok *in vivo* çalışmada da bir antioksidan olarak kullanılmıştır. Yapılan *in vivo* çalışmalarda, NAC tedavisinin oksidatif süreci önlediği ve/veya inhibe ettiği oksidatif stresin farklı biyobelirteçleri tarafından ölçülerek gösterilmiştir.



Şekil 2.13. NAC etki mekanizması (59)

Bir tiyol bileşiği olarak NAC, en tipik radikal ve radikal olmayan oksidanlarla test tüpünde bile reaksiyona girebilmektedir. Bununla birlikte, biyolojik bir matriste bir antioksidan olarak hareket etmek için, NAC dahil herhangi bir antioksidanın

oksidanlarla reaksiyon hızının, endojen antioksidanlardan ve açıkça substratlarındaki çok daha yüksek olması gerekmektedir. Reaksiyon hızı oksidanların üretildiği bölgedeki molekül konsantrasyonunun ve reaksiyon hızı sabitinin antioksidanı spesifik oksidanlara doğru yönlendirmesinin sonucunda gösterilmiştir(59).

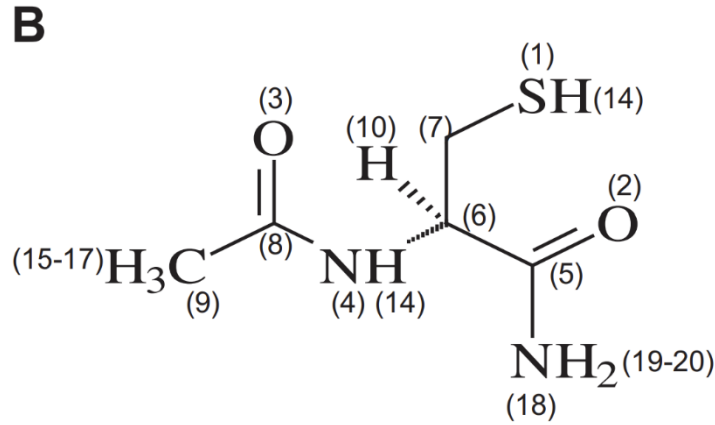
Farklı patolojik durumlarda GSH'nin kendisi doğrudan koruyucu bir madde olarak kullanılmıştır. Ancak bu şekilde tripeptit, hücre zarlarını kolayca geçemediğinden klinik pratikte etkinliği çok sınırlı kalmıştır. Sistein kendiliğinden hücre içi GSH sentezi için gereklidir, ancak insanlarda kullanımını toksisite sorunları nedeniyle engellenmiştir. Bir sistein konjugatı olan NAC, sisteinin toksisitesinden kaçınarak bir GSH öncüsü sağlamak için sentezlenmektedir(59).

2.9. N-Asetilsistein Amid

N-asetilsistein amid (NACA), NAC'ın karboksil grubu yerine bir amid grubu içeren N-asetilsisteinin değiştirilmiş şekline denilmektedir. Karboksil grubunu nötralize etmenin hücre membranlarının içinden geçişine yardımcı olacağı olasılığı ile tasarlanmış ve sentezlenmiştir (57).

N-asetilsistein amid, NAC'ın bir amin içeren, karboksil grupla etkileşime girebilen asit baz dengesi nötre yakın amid formudur bu da NACA'nın NAC'tan daha hidrofobik ve zardan geçirgen olmasını sağlamaktadır (57).

N-asetilsistein hidrofilik karakterinden dolayı kan beyin bariyerini geçemezken, NAC'ın amid formu olan NACA ise NAC'den daha yüksek hücresel membran geçirgenliğe sahiptir ve bu nedenle dikkate değer bir alternatif terapötik ajan olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle NACA, oksidatif strese bağlı bir dizi hastalığı tedavi etmek için kullanılmıştır. Her iki molekülde ortak olan asetil grubu, glutatyon üretimi için ek antioksidan potansiyele sahip olmuştur. NAC ve NACA molekülleri, yapı olarak yalnızca -NH₂/-OH fonksiyonel grubu ile farklılık gösterdikleri için karşılaştırmalı çalışmalar için ideal görülmüştür (57).



Şekil 2.14. NACA (B) kimyasal yapısı (57).

N- Asetilsistein amidin bir antioksidan olarak koruyucu etkileri farklı hücre hatları ve kemirgen hayvanlar kullanılarak hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak kanıtlanmıştır. Dahası, NACA'nın membran geçirgenliğinde NAC'a karşı üstün kalitesi, model sistem olarak insan kırmızı kan hücreleri kullanılarak iyi bir şekilde gösterilmiştir. Çalışma ayrıca, NACA'nın indirgenmiş GSH mekanizması üzerine etkisini öngörmüştür (60).

Hem NAC hem de NACA, tert-bütillhidroksiperoksit (BuOOH) tarafından indüklenen hücre içi oksidasyonu insan kırmızı kan hücrelerinde azaltmıştır. NACA'nın bulunduğu yerde çeşitli ölçülerde NAC'dan beş kat daha güçlü olduğu görülmüştür (60).

N- Asetilsistein amid ile tedavide kırmızı kan hücrelerindeki endojen tiyolün %91'ini restore ettiği görülürken, NAC ile tedavide bu oran sadece %15'e ulaşmıştır. Bu sonuçlar da NACA'nın daha fazla zar geçirgenliği olduğunu düşündürmüştür (60).

Bir başka çalışmada NACA'nın Doksorubisin (DOX, anti-kanser ilacı) kaynaklı oksidatif strese karşı koruyucu etkisi H9c2 kardiomyositleri kullanarak gösterilmiştir. NACA'nın (750 μ M) lipid peroksidasyon ve ROS seviyelerini azaltıp, hem GSH seviyesini hem de GSH/GSSG oranını arttırdığı gösterilmiştir. Katalaz (CAT), Glutasyon peroksidaz (GPx) ve glutasyon redüktaz (GR) de dahil olmak üzere antioksidan enzim aktivitelerini yükselttiği görülmüştür. NACA bir antioksidan olarak etkili olduğu tespit edilmiş olmasına rağmen, DOX kaynaklı hücre ölümüne karşı çok

az koruma sağlamıştır. Bu da DOX kaynaklı H9c2 kardiyomiyositlerinde hücre içi oksidatif stresten bağımsız yol ile hücre ölümü fikrini desteklemektedir (60).

2.10. Toksikolojide *in siliko* Uygulamalar

In siliko toksikoloji, kimyasalların toksisitesini analiz etmek, simüle etmek, görselleştirmek veya tahmin etmek için hesaplamalı yöntemler kullanan bir tür toksisite değerlendirmesidir. *In siliko* toksikoloji, toksisiteyi tahmin etmek, kimyasallara öncelik vermek, toksisite testlerine rehberlik etmek ve ilaç tasarımında geç aşamadaki başarısızlıkları en aza indirmek için mevcut toksisite testlerini tamamlamayı amaçlamaktadır. Toksisitenin uç noktalarını tahmin etmek için modeller oluşturmak adına çeşitli yöntemler vardır ve *in siliko* bunların içinde gelecek vaad eden ve *in vivo* yöntemlere duyulan ihtiyacı azaltması umulan yöntemler arasında gösterilmektedir (61). *In siliko* toksikolojide sıklıkla kullanılan yöntemler arasında nitel yapı etki ilişkisi (QSAR), Uzmanlar Tarafından Oluşturulmuş Kural Bazlı Yöntemler, moleküler kenetleme, moleküler modelleme ve Read- across (Çapraz Okuma) sayılabilir(62).

In Silico toksikolojinin alanları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- Test verilerinin alternatif olarak elde edilmesi
- Safsızlıkların ve bozunma ürünlerinin değerlendirilmesi
- İşçi güvenliği ve iş sağlığının değerlendirilmesi
- Metabolit analizler
- Ekotoksikoloji
- İlaç adaylarının seçilmesi
- Öncelikli test edilmesi gereken kimyasalların seçilimi
- *In vivo* veya *in vitro* çalışma sonuçlarının rasyonelleştirilmesi(62)

2.11. Toksikolojide Metabolomik Uygulamalar

Metabolom, biyolojik bir sistemdeki metabolik yollarda ve hücresel süreçlerde önemli roller oynayan düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerin (<±2000 Da) tam seti olarak tanımlanmaktadır(63). Metabolomik, biyolojik bir numunedeki yüzlerce metabolitin kapsamlı analizidir; herhangi bir anda canlı bir organizmanın, bir

hücrenin veya bir hücre altı kompartımanın fizyolojik durumu hakkında ayrıntılı bilgi sağlamaktadır (64).

Metabolomik, hastalıkların altında yatan mekanizmalarının araştırmalarında güçlü bir araç olup özellikle biyobelirteç keşfinde umut verici bir hale gelmiştir. Biyobelirteçler hastalıkları teşhis etmek, izlemek veya riskleri öngörmek için kullanılabilen biyolojik ölçülebilir okumalar olarak görülmektedir (63). İlgili analitler, hücresel metabolizmanın bir sonucu olarak hücreler tarafından üretilen ve/veya dönüştürülen karbonhidratlar, amino asitler, nükleotidler, fosfolipitler, steroidler veya yağ asitleri ve bunların türevleri gibi küçük endojen moleküllerdir (64).

Metabolom bir hastalık durumunda olduğu gibi organizmadaki bozulmaları; ilaçların veya çevresel faktörlerin, yaşam tarzı ve beslenme gibi etkilerini yansıtmaktadır. Bir diğer deyişle, metabolomik yeni teşhis ve prognostik hastalık biyobelirteçleri ve karmaşık hastalıkların patolojik mekanizmalarının anlaşılmasına yönelik bütüncül bir yaklaşım sunmaktadır (63).

Halihazırda mevcut verilerden, metabolomik bilgilerin hayvan çalışmalarında kullanılan klasik toksikolojik uç noktalarla, örneğin transkriptomik verilere göre daha kolay ilişkilendirilebileceği görülmektedir. Bunun bir nedeni, metabolik profildeki değişikliklerin genellikle genom, transkriptom ve proteom düzeyinde meydana gelen ilk değişikliklerin "aşağı akışı" olması olabilir(63).

Toksikolojik çalışmalar için, hücre dışı metabolitlerin bir şekilde hücre içi durumu yansıttığı gerçeği büyük önem taşımaktadır. Bu da, yalnızca yüksek derecede invaziv (histopatolojik) incelemelerle tanımlanabilecek hedef organ toksisiteleri hakkında bilgi elde etmek için vücut sıvılarından (kan, idrar, vb.) non-invaziv veya minimal invaziv numune almanın ve bu tür numuneler üzerinde metabolomik analizinin temelidir. Yöntemler Vücut sıvılarından (kan, idrar, vb.) non-invaziv veya minimal invaziv yöntemlerle numune almanın, hedef organ toksisitelerine bilgi elde etmek için metabolomik analizle belirlenmesin yalnızca invaziv (histopatolojik) yöntemlerle tanımlanabilecek bilgi eldesini temelidir (64).

İlk pilot çalışmalar, metabolomik yaklaşımların gelecekteki uygulamalarının yüksek verimli kimyasal tarama uygulamaları olduğunu göstermektedir. Son olarak, yeni görüntüleme teknikleri yalnızca biyolojik sistemler içindeki çevresel toksik maddelerin yerini belirleme yeteneğine sahip olmakla kalmaz, aynı zamanda hücreler

içindeki spesifik toksikolojik etkileri tanımlamak için metabolomik yaklaşımlarla birlikte kullanılabilir (64).

Metabolomiklerin in vitro uygulaması, çoğunlukla iki ana faktör tarafından yönlendirilmektedir:

- Tanımlanmış ve kontrol edilebilir bir deneysel sistemde toksik bir aktivitenin neden olduğu biyokimyasal değişikliklerin daha iyi anlaşılması.
- Artan ihtiyaç 3R konseptini (Hayvan testlerinin Azaltılması, Hayvan Refahının İyileştirilmesi ve Hayvan Testlerinin Alternatifleriyle Değiştirilmesi) onaylayan politikalara uygun olarak toksikolojide insanla ilgili hayvan dışı alternatiflerin kullanımına doğru ilerlemek (64).

Avantajlarıyla beraber metabolomiklerin in vitro uygulamasına yönelik özel zorluklar da şu şekilde tespit edilmiştir (64):

- 1) Farklı model gereksinimleri,
- 2) Kalite kriterleri ve kalite kontrol
- 3) Uygulama alanları
- 4) Araştırma stratejileri
- 5) Analizin teknik zorlukları
- 6) *İn vivo* duruma ekstrapolasyon

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

| Kimyasal Maddeler | Firma Adı |
|---|-----------------------|
| Dimetilsülfoksit, DMSO | Sigma Aldrich |
| Dulbecco' Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyeri | Biological Industries |
| Dulbecco's Phosphated Buffer Saline (DBPS) | Biological Industries |
| Föetal Bovin Serum (FBS) | Biological Industries |
| Glutamin | Biological Industries |
| Glutasyon | Sigma |
| Metformin | Sigma Aldrich |
| MTT | Sigma Aldrich |
| N-Asetil Sistein | Sigma |
| N-Asetil Sistein Amid | Sigma |
| Penisilin-Streptomisin | Biological Industries |
| Sodyum hidroksit | Riedel-de-Haën |
| Tripan Mavisi | Sigma Aldrich |
| Tripsin EDTA | Gibco |

3.1.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

| Kullanılan Cihazlar | Firma İsmi ve Modeli |
|--------------------------------|-----------------------|
| 5 ml'lik Dispenser | Eppendorf |
| 5 ml'lik steril plastik pipet | Kirgen |
| 10 ml'lik steril plastik pipet | LP Italiana SPA |
| 15 ml'lik Falkon tüp | Kirgen |
| 25 ml'lik steril plastik pipet | Cellstar |
| 25 cm ² 'lik flask | Corning |
| 6 kuyucuklu mikroplak | Collstar |
| 50 ml'lik Falkon tüp | Kirgen |
| 75 cm ² 'lik flask | Corning |
| 96 kuyucuklu mikroplak | Collstar |
| 10 µl'lik pipet | Socorex |
| 100 µl'lik pipet ucu | Eppendorf |
| 100 µl'lik mikropipet | Socorex |
| 1000 µl'lik pipet ucu | Eppendorf |
| 1000 µl'lik pipet | Socorex |
| Buzdolabı | Arçelik |
| Cam pastör pipeti | İnterlab |
| Deiyonize su cihazı | Barnstead EASYpure UV |

| Kullanılan Cihazlar | Firma İsmi ve Modeli |
|----------------------------|-----------------------------|
| Derin Dondurucu (-20°C) | Arçelik AEG-1350S |
| Derin Dondurucu (-80°C) | Revco |
| Etüv | Dedeoğlu |
| Handystep | Brand |
| Hassas Terazi | Mettler Toledo |
| Hücre Dondurma Tüpü | Kirgen |
| Işık Mikroskobu | Leica |
| İnkübatör | Heraeus |
| Kapaklı tüp (1.5 ml) | Eppendorf |
| Laminar Akımlı Kabin | Holten Laminair |
| Multipipet | Socorex |
| Neubauer Camı | Marienfild |
| Otoklav | Monarch |
| Otomatik Pipetör | Topscien |
| Rezervuar | Isolab |
| Santrifüj | Heraeus, Hettich |
| Su Banyosu | Termal® Laboratory Tools |
| UV Spektrofotometre | Shimadzu |
| Yatay Çalkalayıcı | Edmund Bühler |

3.2. Çözeltilerin Hazırlanması

Hücre Kültüründe Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

Kullanılan hücre hatlarının çoğaltılabilmesi için kullanılacak besiyeri 500 ml Dulbecco' Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisine %10 Fötal Bovin Serum (FBS), %1 Penisilin-Streptomisin ve %1 Glutamin eklenerek hazırlanmıştır.

Eroin Çözeltisinin Hazırlanması

1 mg eroin 1 ml etanol içinde çözülerek 3,3 mM stok çözelti hazırlanmıştır.

N-Asetil Sistein Çözeltisinin Hazırlanması

16,3 mg N-Asetil Sistein 1 ml suda çözülerek 100 mM stok çözelti hazırlanmıştır.

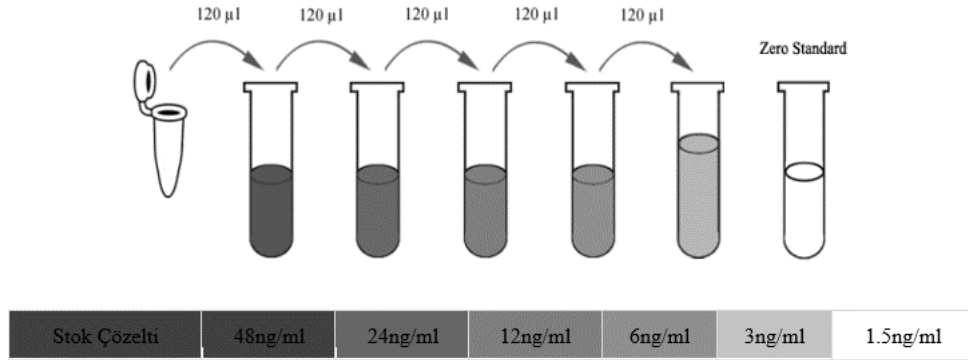
N-Asetil Sistein Amid Çözeltisinin Hazırlanması

1,62 mg N-Asetil Sistein Amid 10 ml suda çözülerek 1 mM stok çözelti hazırlanmıştır.

MTT Çözeltisinin Hazırlanması (10 mg/ml)

MTT çözeltisi hazırlanabilmesi için 10 mg MTT hassas terazide tartılarak 1 ml DPBS içinde çözülerek hazırlanmıştır.

GSH Standartlarının Hazırlanması



Kit içerisinde yer alan 48ng/ml konsantrasyondaki stok çözeltinin 120 µL'si üzerine 120 µL standart çözücü eklenerek 24ng/ml konsantrasyondaki Standart 5 çözeltisi hazırlanmıştır. Benzer şekilde bir öncekinden dilüe edilerek 4 standart çözelti daha hazırlanmıştır. Standart dilüent ise kör olarak kullanılmıştır.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Hücre Kültürü Yöntemi

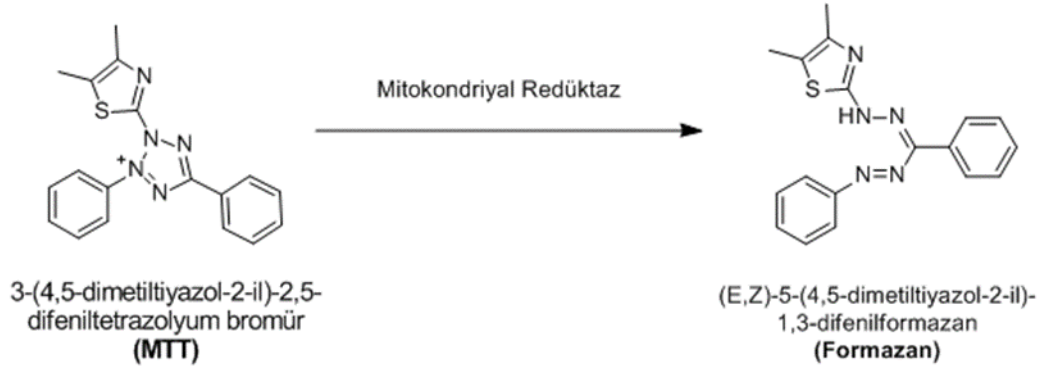
Deneyleerin gerçekleştirilebilmesi için insan nöroblastoma hücre hattı SH-SY5Y kullanılmıştır. Hücreler DMEM-Ham's F12 w/L-Glutamin w/15-mM HEPES, %10 (v/v) fetal sığır serumu (FBS) ilaveli ve %1 penisilin/ streptomisin içeren 75 cm² hücre kültürü plakalarında, 37°C'de %5 CO₂'lik bir inkübatörde yetiştirilmiştir. Hücrelerin ortamı düzenli aralıklarla ve uygun şekilde değiştirilmiştir. Hücreler istenilen düzeyde yoğunluğa (% 80) ulaştıklarında pasajlanmıştır.

3.3.2. 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür (MTT)

Testi

Hücre canlılığı veya çoğalması ölçümü için malzemelere doğrudan veya dolaylı maruz kalımla toksikolojik taramada kullanılan bir dizi metodoloji vardır. 3-

(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) en sık kullanılan yöntemlerdendir ve MTT indirgeme testi sitotoksisite ölçümleri için altın standart olarak kabul edilmektedir(65). MTT'yi baz alan prosedürler memeli hücre hatlarına, bakteri ve mantarlara yaygın olarak uygulanmaktadır(66). Kolorimetrik olarak hücrenin metabolik aktivitesi bu yöntemde değerlendirilmektedir.



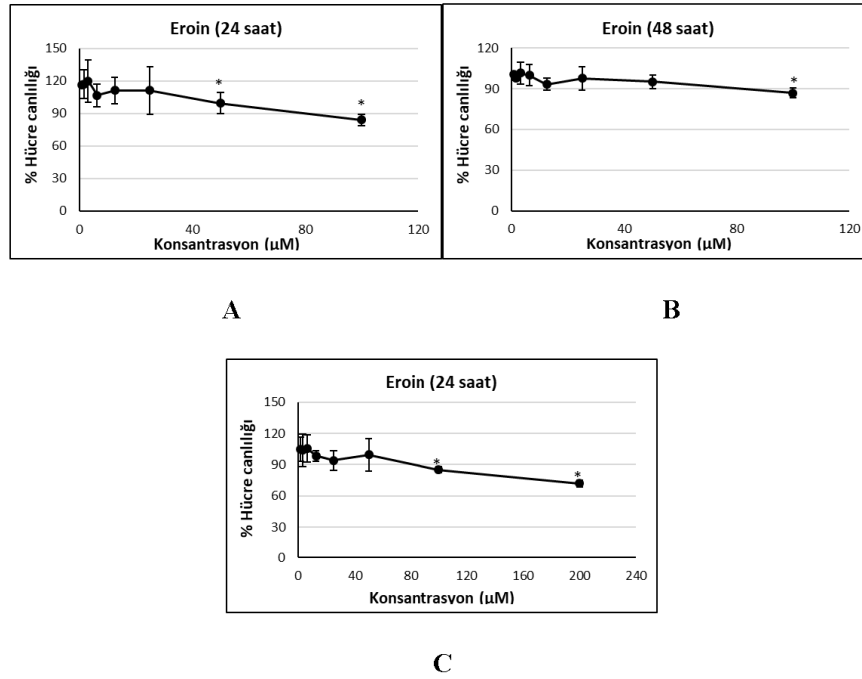
Şekil 3.1. MTT'nin MTT formazana indirgenmesi (67).

MTT methodu Mossman tarafından 1983 yılında geliştirilmiştir ve reaksiyon Şekil 1'de gösterilmektedir (67). MTT testi, 96 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirilmektedir. MTT testinin amacı, çoğalan canlı hücreler tarafından artan dehidrogenaz aktivitesine bağlı olarak mitokondriyal redüktaz enzimi ile tetrazolyumdan oluşan mor renkli formazan kristallerinin absorbansının kolorimetrik olarak spektrofotometrede ölçülmesidir.

Yapılan çalışmada, hem ön deneylerde doz ve süre belirlenmesinde hem de ana deneyde sitotoksisitenin değerlendirilmesinde MTT testi kullanılmıştır. Bu amaçla, 100 µl DPBS içinde çözülmüş olan 10 mg/ml MTT her bir kuyucuğa ilaç çözeltilerinin dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmasını takiben eklenmiş ve 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan formazan kristalleri MTT'nin uzaklaştırılmasını takiben 100 µl DMSO eklenerek çözülmüş, 570 nm' de absorbans değerleri ölçülmüştür. Negatif kontrol olarak kullanılan hücrelerin absorbans değeri %100 kabul edilerek, sitotoksik ilaçların uygulandığı hücrelerin absorbans değerlerine göre hücre canlılık %'leri hesaplanmıştır.

3.3.3. Eroin Uygulama Dozu ve Süresinin Belirlenmesi

Doz ve süre belirlenmesinde bölüm 3.4.'te detayları verilen MTT sitotoksosite testinden yararlanılmıştır. Bu amaçla uygulama öncesi 96 kuyucuklu plaklara 10000 hücre/kuyu hücre ekimi yapılmış, 24 saat inkübe edilerek hücrelerin tutunması sağlanmıştır. Eroin uygulamalarında kullanılacak dozu belirlemek amacıyla literatür verileri ile uyumlu bir doz aralığı belirlenmiştir. 100 μ M-1,56 μ M aralığında 8 farklı konsantrasyonda eroin SHSY5Y hücrelerine uygulanmış, 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. 24 ve 48 saatlik uygulamalarda önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Bununla birlikte, 100 μ M konsantrasyonda 24 ve 48 saat için hücre canlılığı sırasıyla % 84 ve % 86 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular sonucunda uygulama süresi olarak 24 saat ve 48 saat arasında önemli bir fark olmaması nedeniyle 24 saat ile devam edilmesine karar verilmiştir. Ancak, 100 μ M konsantrasyonda istenilen sitotoksik cevabın elde edilememesi nedeniyle 200 μ M konsantrasyondan başlayarak tekrar 24 saatlik bir uygulama gerçekleştirilmiş ve hücre canlılığı % 72 olarak belirlenmiştir. Hücre canlılığına ilişkin denemelerin sonuçları Şekil 3.2.'de gösterilmiştir. Eroin için yapılan uygulamalarda inhibitör konsantrasyon (IC_{50}) değeri belirlenmemiştir. Bu durum eldeki maddenin yetersizliği ve çözünürlük sorunundan kaynaklanmıştır. Ancak, %28 hücre canlılığında düşmeye neden olan ve çalışmalarda kullanılması uygun bulunan sitotoksik cevabı gösteren uygulama dozuna uygulamalar sonunda (200 μ M) ulaşılabilmektedir.

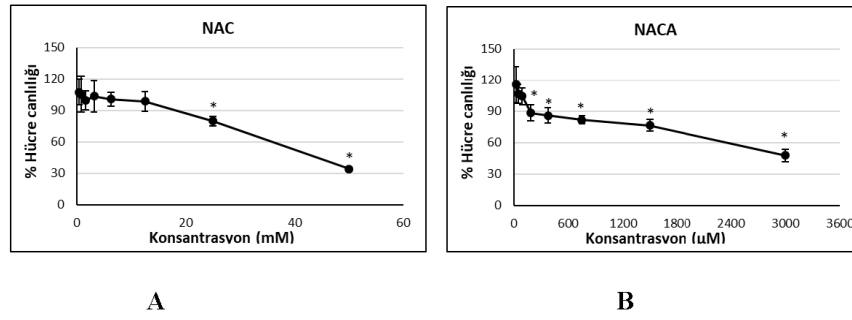


Şekil 3.2. SHSY5Y hücre hattına 24 ve 48 saat süre ile 100 µM-0,78 µM konsantrasyon aralığında ve 20 aralığında eroin uygulaması ile elde edilen sitotoksosite verileri; A: 100 µM-0,78 µM konsantrasyon aralığında 24 saat uygulama, B: 200 µM-1,56 µM konsantrasyon aralığında 48 saat uygulama, C: 100 µM-0,78 µM konsantrasyon aralığında 24 saat uygulama, $p < 0,05$

3.3.4. *N*-Asetil Sistein (NAC) ve *N*-Asetil Sistein Amid (NACA)'nın Uygulama Dozlarının Belirlenmesi

Eroin uygulama dozunun belirlenmesini takiben birlikte uygulanarak karşılaştırılması yapılması planlanan NAC ve NACA için uygulama dozları belirlenmiştir. Bu amaçla 50 mM-0,39 mM aralığında 8 farklı konsantrasyonda NAC ve 3000 µM-23,43 µM aralığında 8 farklı konsantrasyonda NACA, SHSY5Y hücrelerine uygulanmış, 24 saat inkübe edilmiştir. Sitotoksosite verilerinden elde edilen bulgular incelendiğinde NAC için IC50 değeri 41,13 mM ve NACA için ise 2842,38 µM şeklinde belirlenmiştir.

Uygulamada kullanılmak üzere %95 üzerinde hücre canlılığı sağlayan dozlar tercih edilmiştir. Bu doz sınırları NAC için 12,5 mM (%98 hücre canlılığı) ve NACA için 93,75 µM (%104 hücre canlılığı) şeklindedir. Elde edilen sitotoksosite verileri incelendiğinde ve literatür ile karşılaştırıldığında uygulama dozu NAC için 10 mM ve NACA için ise 100 µM olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.3. SHSY5Y hücre hattına 24 saat süre ile 50 mM-0,39 mM aralığında 8 farklı konsantrasyonda NAC ve 3000 µM-23,43 µM aralığında 8 farklı konsantrasyonda NACA uygulaması ile elde edilen sitotoksosite verileri; A:NAC uygulaması, B: NACA uygulaması, $p < 0,05$.

3.3.5. GSH Düzeylerinin Analizi

Sistein, glutamik asit ve glisin kalıntılarını içeren bir tripeptit olan GSH birçok hücrel işlevi etkileyen endojen bir antioksidan görevi görür. GSH ve çeşitli enzimler, organizmalarda reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin (sırasıyla, ROS ve RNS) kullanımında ve düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynayan glutasyon sistemini oluşturmak üzere birleşir. Oksidatif strese bağlı olarak antioksidan savunmadaki değişimlerde kullanılan önemli bir parametredir (68).

GSH düzeylerinin ölçülebilmesi için, 6 kuyulu plakalara 150000 hücre/ kuyucuk olacak şekilde hücreler ekilmiştir. 24 saat inkübasyonla hücrelerin tutunmasının ardından 6 farklı grup oluşturulmuştur. Bu gruplar, kontrol, eroin, NAC, NACA, eroin ve NAC ile eroin ve NACA şeklinde olup, hücrelere sitotoksosite deneyleri ile belirlenen dozlarda eroin (200 µM), NAC (10 mM) ve NACA (100 µM) uygulanmıştır. Toplanan hücreler, analiz gününe kadar -80°C derin dondurucuda saklanmıştır. Ölçüm gününde her bir kuyucuğa 500 µl DPBS eklenmiş, hücreler kazıma işlemi ile yerinden kaldırılıp tüplere aktarılmış ve 3000 rpm'de 15 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant analizlerde kullanılmıştır. Analizlerde, Bioassay Technology Laboratory markalı ticari ELİSA kitleri kullanılmıştır.

Miktar Tayini Prosedürü

- Standart, numune ve kör çift olarak çalışılmıştır.
- Örneklerin uygulanması sırasında kör kuyucuklarına, sadece renk çözeltisi A, B ve durdurma çözeltisi eklenmiştir.

- Standart kuyucuklarına, 50 µL standart ve 50 µL Streptavidin-HRP eklenmiştir. Örnek test kuyucuklarına ise 40 µL numune ile 10 µL hGSH-antikor ve 50 µL Streptavidin-HRP ilave edilmiştir. Sonra kuyucuklar kapatma membranı ile kapatılmış ve yavaşça çalkalandıktan sonra 37°C'de 60 dakika inkübe edilmiştir.
- Distile su ile 30 kat daha dilüe edilerek yıkama çözeltisi hazırlanmış ve 96 kuyucuklu plağa 300 µL uygulanmış ve uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır.
- 50 µL renk çözeltisi A eklenmiş, ardından 50 µL renk çözeltisi B aynı kuyucuğa ilave edilmiş ve nazikçe karıştırılmıştır. Işıktan koruyarak 37°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
- Durdurma reaksiyonu için her kuyucuğa 50 µL durdurma çözeltisi eklenmiştir (Bu işlem sonucunda kuyucuklardaki mavi renkli çözelti hemen sarı renge dönmüştür).
- Durdurma çözeltisi eklendikten sonra 15 dakika içinde 450 nm dalga boyunda OD ile ölçüm gerçekleştirilmiştir.

3.3.6. Eroin için *In silico* Moleküler Modelleme Yöntemi

Eroin, morfin ve çalışmada kullanılan protein yapılarında yer alan ligandlar (GSH ve glutatyon sülfonat (GSF)) ve bu ligandların iyonizasyon durumları ve totomerleri LigPrep (2021-4, Schrödinger LLC, New York, NY) ve MacroModel ile modellenerek OPLS4 (2021-4, Schrödinger LLC, New York, NY) kuvvet alanı parametrelerine göre optimize edilmiştir(69). Çalışmada kullanılan enzimlerin üç boyutlu yapıları (Tablo 1) RCSB protein veri bankasından (www.rcsb.org) indirilerek(70) Maestro Protein Hazırlama Sihirbazı 2021-4, Schrödinger LLC, New York, NY) (71) ile moleküler kenetleme için hazırlanmıştır. Bu aşamada yapılarda bulunan gereksiz moleküller silinerek hidrojen atomları eklenmiş, bağlar ve kısmi yükler atanmış, hidrojen bağları hesaplanarak buna göre belirli rezidülerin iyonizasyon durumları/totomerleri modellenerek su moleküllerinin konformasyonları örneklenmiştir. Yapılar son olarak kısıtlı bir enerji minimizasyonuna tabi tutulmuştur (ağır atomların RMSD sınırı: 0,3 Å). Proteinlerin aktif bölgelerinin merkezi koordinatları için aktif bölgelerinde yer alan GSH ya da GSF moleküllerinin merkezi

alınmış ve 27.000 Å³ hacimli bölge moleküler kenetleme için tanımlanmıştır (Tablo 3.1.). Ligandlar, proteinlerin aktif bölgelerine Glide 2021-4, Schrödinger LLC, New York, NY) ile ekstra kesinlik kipinde 100'er defa kenetlenmiş (72), elde edilen pozlar görsel olarak incelenerek ne iyi pozun kenetleme skoru dikkate alınmıştır.

Tablo 3.1. Moleküler kenetleme çalışmasında kullanılan enzim yapıları

| Enzim ^a | PDB kodu | Çözünürlük (Å) | Kenetleme için merkezi koordinasyonlar |
|--------------------|-----------|----------------|--|
| GSTA1 | 6ATO (73) | 1.55 | 78.06, 28.57, 14.01 |
| GSTA2 | 2WJU (74) | 2.30 | -12.80, 2.96, -1.21 |
| GSTA3 | 1TDI(75) | 2.40 | 13.35, 10.84, 40.23 |
| GSTK1 | 1YZX (76) | 1.93 | 14.95, 66.07, 3.33 |
| GSTM1 | 1XW6(77) | 1.90 | -8.24, 8.14, 74.79 |
| GSTM2 | 1XW5(78) | 1.80 | 20.16, -6.25, 18.45 |
| GSTO1 | 5YVN(79) | 1.33 | 15.04, -9.02, 14.09 |
| GSTO2 | 3Q19(80) | 1.90 | 19.56, -5.00, 21.32 |
| GSTP1 | 5GSS(81) | 1.95 | 11.53, 8.22, 26.71 |
| GSTT2 | 4MPG(82) | 1.95 | 13.46, 69.76, -0.03 |
| GSTZ1 | 2CZ2(83) | 1.40 | -2.14, 25.08, 4.97 |
| MGST2 | 6SSW(84) | 3.00 | 121.20, 161.61, -6.80 |
| GRD | 1GRE(85) | 2.00 | 62.52, 39.75, 21.42 |
| GSS | 2HGS(86) | 2.10 | 43.76, 7.69, 20.08 |

^a GST: glutasyon *S*-transferaz, MGST: mikrozomal GST, GRD: glutasyon redüktaz, GSS: glutasyon sentaz. GSTK1 aktif bölgesinde GSF, diğer enzimler GSH içermektedir.

3.3.7. Metabolomik Analizi Yöntemi

Metabolomdaki küçük moleküllü metabolitlerin spektroskopi, kromatografi gibi yüksek verimli teknolojiler kullanılarak saptanması, miktarının belirlenmesi ve tanımlanmasına metabolomik analiz denilmektedir(87). Organizmanın genetik değişiklik, hastalık ve çevresel değişikliklere verdiği en son yanıt metabolomdaki değişiklikler olduğu için hücrenin veya dokunun fenotipi tanımlanabilmektedir.

Metabolomik çalışmalar bu özelliği ile kişiselleştirilmiş ve öngürülebilir canlı sağlığına olanak sağlamaktadır(8,63).



Şekil 3.4. Metabolomik çalışmaların iş akışı(88).

Metabolomik analizler Şekil 3.4.'te gösterildiği gibi numunenin; toplanması, hazırlanması, analizi ve elde edilen verilerin yorumlanması olmak başlıca basamaklardan oluşmaktadır(88).

Çalışmada araştırılan bileşiklerin fizikokimyasal özellikleri tercih edilecek olan ayırma metodu da belirleyici faktör olacaktır(63).

Metabolomik Analizi İçin Hücre Numunelerinin Hazırlanması

Sitotoksisite çalışmalarında kullanılmasına karar verilen dozlarda uygulamalar yapılmıştır. Metabolomik analizler için 6 kuyucuklu plaklara 150000 hücre/kuyucuk olacak şekilde hücreler ekilmiş ve 24 saat tutunmaya bırakılmıştır. Süreci takiben her bir gruptan 3 adet olmak üzere sadece medyumunu değiştirilen negatif kontrol ve 200 μ M eroin uygulaması yapılan grup 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben medyum uzaklaştırılmış, hücreler DPBS ile yıkandıktan sonra 1 ml metanol-su (9:1) tüm kuyucuklara eklenmiş ve sıvı azot içeren bir kabın içine alınarak metabolomların donması sağlanmıştır. Daha sonra kuyucuklarda kazıma işlemi ile hücreler 2 ml'lik küçük plastik tüplere aktarılmış, kuyucuklara tekrar 1'er ml metanol-su (9:1) eklenerek kuyucuklar yıkanıp, tüplere aktarılmıştır. 15000 rpm'de santrifüjlenmiş, üst fazın 1 ml'si ayrılarak analize kadar -80°C 'de saklanmıştır.

Türevlendirme

Analiz edilmeden önce numunelerdeki çözeltiler azot gazı altında tamamen uçurulduktan sonra *N*-metil-*N*-(trimetilsilil) trifluoroasetamid + %1 Klorotrimetilsilan (MSTFA + %1 TMCS) ile türevlendirme işlemine geçilmiştir.

Numuneler oda sıcaklığına ulaştıktan sonra metoksimasyon reaksiyonu için üzerlerine 20 µl metoksiamin (20 mg /ml piridinde) çözeltisi eklenerek 30°C'lik etüvde 90 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda oda sıcaklığına gelmeleri beklenmiş ve sililasyon reaksiyonu için 80 µl MSTFA + 1% TMCS eklenerek 37°C'lik etüvde 30 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda reaksiyon karışımından alınarak 50 µl analiz için GS-MS viallerine transfer edilmiştir.

GC-MS Parametreleri

Türevlendirme işlemi sonrası numuneler GC-MS-QP2010 cihazıyla analiz edilmiştir. Helium 1 ml/dak taşıyıcı gaz olarak kullanılmıştır. Analizler DB5-MS (95% dimetil / 5% dimetil polisioksan) kolon (30 m uzunluğunda; 0.25 mm i.d.; 0.25 µm film kalınlığında, Agilent) ile fırını sıcaklık programlanması (1 dakika 60 °C'de tutulduktan sonra dakikada 10°C artarak 325 °C'ye yükselmiş ve 10 dakika bu sıcaklıkta kaldıktan sonra 60 °C'ye soğutulmuştur) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cihazın toplam çalışma süresi 37,5 dakikadır. Kütle analizleri tarama modunda gerçekleştirilmiştir. Tarama modu için MS parametreleri: MSD transfer hattı sıcaklığı: 290°C, Elektron impact iyonizasyon 70 eV, Filament sıcaklığı 230 °C, Kuadrupol sıcaklığı 150 °C, tarama aralığı 50-600 dalton ve 2 spektra/s, analizde solvent gecikme zamanı 5.90 dakikadır. GC-MS için çalışma koşulları Tablo 3.2'de ayrıca özetlenmiştir.

Tablo 3.2. GC-MS için çalışma koşulları.

| | |
|---------------------------------------|---|
| Cihaz | Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra |
| Kolon | DB5-MS kolon (30 m +10 m ön kolon; 0,25 mm iç çap ve 0,25 µm film kalınlığı) |
| Fırın sıcaklık programı | 60 °C (1 dk), 10 °C/dk ile 325 °C ulaşılır. 10 dk beklenir ve 60 °C'ye soğutulur. |
| Analiz süresi | 37,5 dk |
| Enjeksiyon hacmi | 1 µl (1:10 bölmeli) |
| Taşıyıcı gaz | Helyum 1 ml/dk |
| MSD transfer bölgesi sıcaklığı | 290°C |
| Çözücü delay süresi | 5,90 dk |
| Kütle aralığı | 50-650 Dalton |

3.3.8. İstatistiksel Değerlendirme

Yapılan analizler sonucunda elde edilen veriler IBM SPSS Statistics Version 23 programında tek yönlü varyans analizi (ANOVA), LSD testi kullanılarak değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu kabul edilmiştir. Sonuçlar ortalama±standart sapma olarak verilmiştir.

Metabolomik veri toplama Shimadzu LabSolution yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen kompleks kromatogramlar MS-DIAL programı ile ayrıştırılmış ve piklerin alıkonma zamanları düzeltilmiş ve veri matrisleri oluşturulmuştur. Elde edilen metabolit pikleri alıkonma indeksli kütüphaneler kullanılarak (Fiehn ve Golm Database kütüphaneleri) aydınlatılmıştır.

GC-MS temelli metabolomik analizler sonucunda elde edilen veri matrisi iç standarta göre normalize edilmiştir. Data verilerindeki eksik değerler, metabolit grubu içindeki en küçük derişimin yarı değeri ile doldurulmuştur. Daha sonra bu veri matrisleri SIMCA-P+ 13 (İsviçre) programına aktararak temel bileşenler analizi (PCA) ve en küçük kareler farklılaştırma analizi (PLS-DA) yöntemleri ile grupların ayrılmasında önemli olan metabolitler ve regresyon katsayıları bulunmuştur.

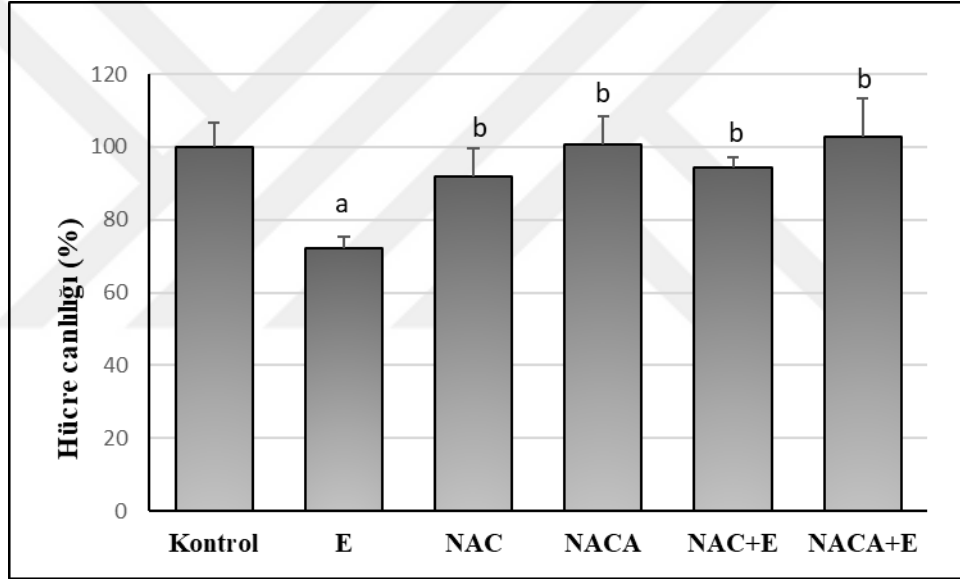
PCA analizler veri setinde herhangi bir sistemik hata ve aykırı bir veri olup olmadığını görselleştirmek için kullanılmıştır. Eğer veride herhangi bir problem yoksa PLS-DA analizlerle veri grupları birbirinden ayrılarak veriler hakkında daha detaylı bilgiler alınmıştır. PLS-DA analizlerindeki farklılaştırmaya neden olan metabolitlerin bulunması için VIP (variable important in project) grafiklerinden yararlanılmıştır. En yüksek VIP değerine sahip metabolit ayırmda en büyük etkiye sahip metabolittir. Dolayısıyla belirlenen gruplar arasında istatistiksel olarak en farklılık gösteren metabolittir ve bu metabolitler belirteç olarak değerlendirilmiştir. VIP grafiklerinden önemli olan metabolitler bulunmasına rağmen hangi grup içinde hangi metabolitin derişiminin arttığı veya azaldığı regresyon analizi sonucunda elde edilen katsayılarla verilmiştir.

Farklı bulunan metabolit konsantrasyonlarının istatistiksel karşılaştırmasında parametrik bağımlı t test kullanılmıştır. Elde edilen metabolitler ile en son olarak Metaboanalyst 3.0 analiz programı kullanılarak yolak analizleri yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Sitotoksosite bulguları

Çalışma gruplarına ilişkin hücre canlılıkları kıyaslandığında eroin uygulanan grubun hücre canlılığı kontrole göre anlamlı şekilde azalttığı görülmüştür. Ayrıca NAC ve NACA uygulamasının da kontrole göre anlamlı bir değişime neden olmadığı, eroin ile uygulandığında ise hücre canlılığını anlamlı şekilde yükselttiği gösterilmiştir. Bununla birlikte eroinin NAC ve NACA ile uygulanmasının hücre canlılığını eroin grubuna göre anlamlı derecede yükselttiği, ancak aralarında bir fark olmadığı belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.1. de özetlenmiştir.



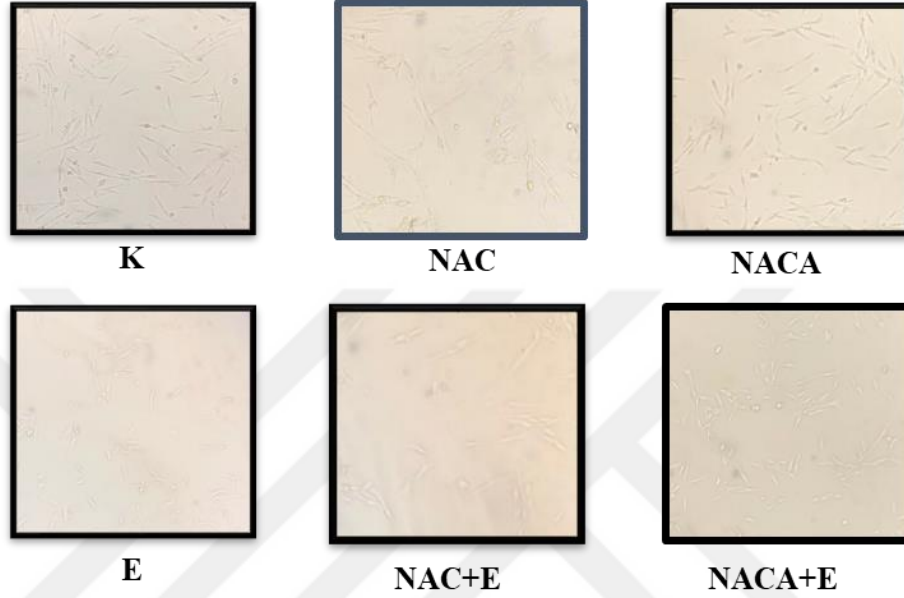
Şekil 4.1. SHSY5Y hücre hattına ait sitotoksosite bulguları, K: Negatif Kontrol, E: Eroin (200 μ M) uygulanan grup, NAC: *N*-Asetil sistein uygulanan grup (10 mM); NACA: *N*-Asetil sistein amid (100 μ M) uygulanan grup; NAC+E: *N*-Asetil sistein (10 mM) ve eroin (200 μ M) uygulanan grup; NACA+E: *N*-Asetil sistein amid (100 μ M) ve eroin (200 μ M) uygulanan grup; a: Kontrolde farklı ($p < 0,05$); b: Eroin grubundan farklı ($p < 0,05$)

4.2. Hücrelerin Işık Mikroskobu Altındaki Görünümlerine İlişkin Bulgular

Mikroskop görüntülerinden de anlaşıldığı gibi 200 μ M eroin uygulaması kontrole kıyasla hücrelerde sitotoksitenin indüklenmesine neden olmuştur. NAC (10 mM) ve NACA (100 μ M) uygulamalarında ise kontrole göre hücre görünümünde

önemli bir değişikliğe rastlanmamış, eroin ile birlikte NAC ve NACA uygulanması sonucunda eroine bağlı sitotoksitenin önlendiği ve hücre canlılığında artış olduğu görülmüştür.

Işık mikroskobu altında alınan hücre görüntüleri şekil 4.2.'de gösterilmiştir.

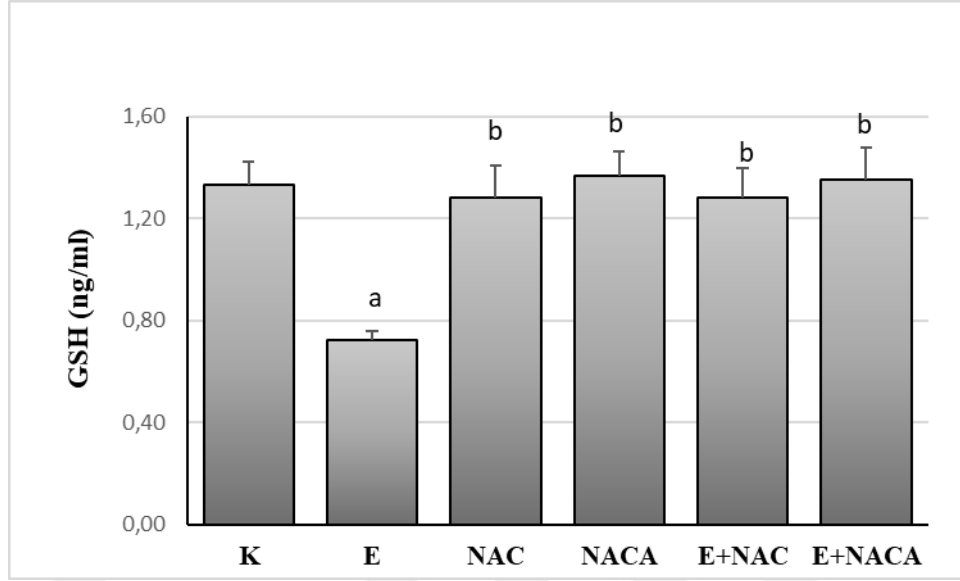


Şekil 4.2. Işık mikroskobu altında çalışma gruplarına ilişkin SHSY5Y hücre hattının görüntüleri, K: Kontrol, E: Eroin (200 μ M) uygulanan grup, NAC: *N*-Asetil sistein uygulanan grup (10 mM); NACA: *N*-Asetil sistein amid (100 μ M) uygulanan grup; NAC+E: *N*-Asetil sistein (10 mM) ve eroin (200 μ M) uygulanan grup; NACA+E: *N*-Asetil sistein amid (100 μ M) ve eroin (200 μ M) uygulanan grup

4.3. GSH Düzeylerine ilişkin bulgular

Hücre hattına madde uygulamaları sonucu ölçülen GSH düzeyleri incelendiğinde, eroin uygulanan grupta GSH düzeylerinin kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü, NAC ve NACA ile eroin beraber uygulandığında ise GSH düzeylerinin anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte yalnız başına NAC ve NACA uygulaması ile GSH düzeylerinde kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

Sonuçlar Şekil 4.3. te özetlenmiştir.



Şekil 4.3. Uygulama gruplarındaki GSH Düzeyleri (ng/ml), K: Negatif Kontrol, E: Eroin (200 μ M) uygulanan grup, NAC: *N*-Asetil sistein uygulanan grup (10 mM); NACA: *N*-Asetil sistein amid (100 μ M) uygulanan grup; NAC+E: *N*-Asetil sistein (10 mM) ve eroin (200 μ M) uygulanan grup; NACA+E: *N*-Asetil sistein amid (100 μ M) ve eroin (200 μ M) uygulanan grup; a: Kontrolde farklı ($p < 0,05$); b: Eroin grubundan farklı ($p < 0,05$)

4.4. *In silico* Moleküler Kenetleme Yöntemine Ait Bulgular

Moleküler kenetleme yöntemi, bir ligandın bir reseptör ile güçlü bir kompleks oluşturmak üzere tercih edilen olası konformasyonunun tahmin edildiği bir *in silico* yöntemdir. Yöntemin bir parçası olan skorlama fonksiyonu ile hesaplanan kenetleme skoru, tahmin edilen bu konformasyonun reseptöre olan afinitesinin bir göstergesidir. Mevcut çalışmada, eroin ve onun ana metaboliti olan morfinin glutatyon *S*-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GRD) ve glutatyon sentaz (GSS) enzimlerinin aktif bölgelerine bağlanma biçimleri ve afiniteleri hesaplanmaya çalışılmıştır. Bu amaçla seçilen 14 kristal yapının ve kullanılan yöntemin güvenilirliğini teyit etmek üzere, öncelikle, bir geri kenetleme çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, belirtilen kristal yapılan aktif bölgelerinde yer alan GSH (veya GSF) molekülleri, buldukları yerden çıkarılarak ve baştan modellenerek enzim aktif bölgelerine tekrar kenetlenmiş ve elde edilen teorik bağlanma biçimleri kristal yapılarıdaki orijinal bağlanma biçimleri karşılaştırılmıştır. Bu amaçla hesaplanan RMSD (*root-mean-square deviation*) değerleri oldukça düşük ($< 2.0 \text{ \AA}$) bulunmuştur (Tablo 4.1.), bu da GSH/GSF için moleküler kenetleme ile öngörülen bağlanma biçimlerinin deneysel olarak belirlenmiş

bağlanma biçimlerine çok benzer olduğu ve yöntemin güvenilir olduğunu göstermektedir. Geri kenetleme ile GSH/GSF için ön görülen bağlanma biçimlerine ait kenetleme skorları da referans olarak kullanılmak üzere Tablo 4.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.1. Geri kenetleme ve eroin ile morfinin moleküler kenetleme sonuçları

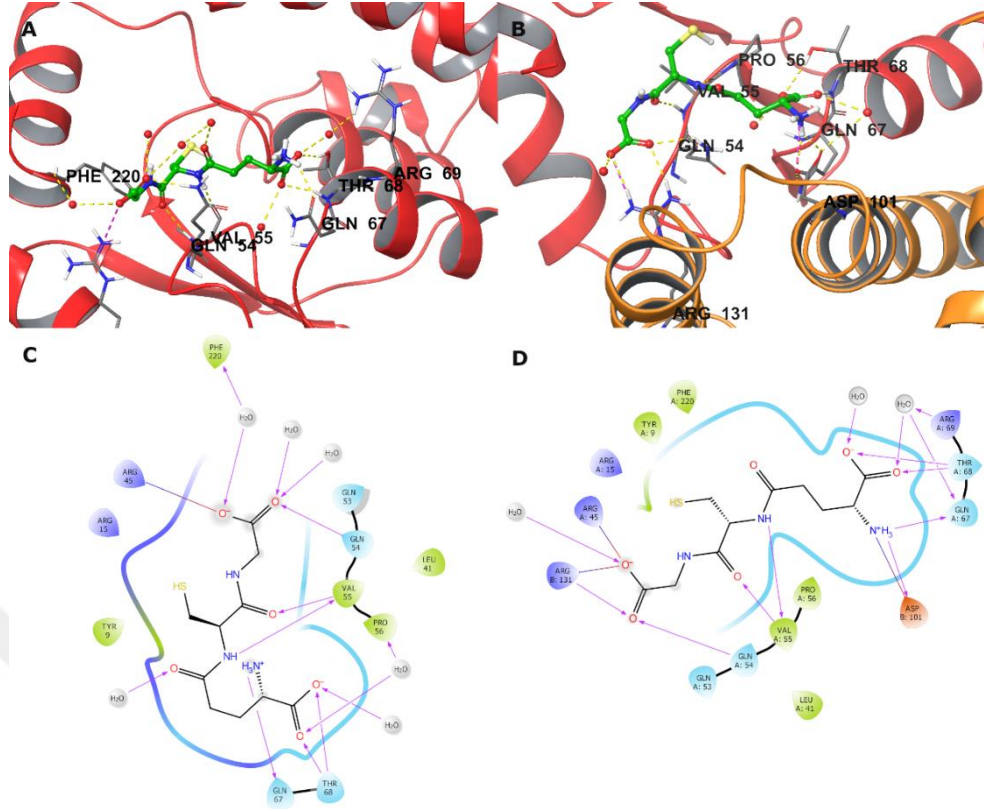
| Enzim | Geri kenetleme | | Kenetleme skoru (kcal/mol) | |
|--------------|----------------|----------------------------|----------------------------|--------|
| | RMSD (Å) | Kenetleme skoru (kcal/mol) | Eroin | Morfin |
| GSTA1 | 1.01 | -6.2 | -2.1 | -5.8 |
| GSTA2 | 0.82 | -7.7 | -4.9 | -6.3 |
| GSTA3 | 0.82 | -7.9 | -4.3 | -5.8 |
| GSTK1 | 1.09 | -6.8 | -3.3 | -5.4 |
| GSTM1 | 1.11 | -9.1 | -4.6 | -5.3 |
| GSTM2 | 0.73 | -11.2 | -3.7 | -4.6 |
| GSTO1 | 0.21 | -11.2 | -1.0 | -6.4 |
| GSTO2 | 0.78 | -6.4 | -3.3 | -5.3 |
| GSTP1 | 0.31 | -7.7 | -5.2 | -5.0 |
| GSTT2 | 0.74 | -10.4 | -1.9 | -6.0 |
| GSTZ1 | 0.21 | -12.6 | -0.8 | -3.4 |
| MGST2 | 1.34 | -8.7 | -4.2 | -4.5 |
| GRD | 0.76 | -7.7 | -4.2 | -4.6 |
| GSS | 0.77 | -13.1 | -2.3 | -4.8 |

Eroin molekülünün kenetleme skorları, GSH/GSF için geri kenetleme ile elde edilen skorlarla karşılaştırıldığında, molekülün, GSTA2 ve GSTP1 gibi birkaç istisna dışında, hedef enzim aktif bölgelerine görece zayıf afinite gösterdiği tahmin edilmektedir (Tablo 4.1.). GSH'nin substrat işlevi gördüğü bu enzimlerin aktif bölgelerinin GSH'ye uygun bir şekilde polar özellikte olduğu dikkate alındığında eroin gibi görece nonpolar yapıdaki bir molekülün bu bölgelere GSH gibi uyum göstermemesi beklenen bir durumdur. Zira GSH yapısındaki polar gruplar sayesinde, bu enzimlerin aktif bölgelerinde ilgili amino asitler ve su molekülleri ile geniş bir polar etkileşme ağı kurmaktadır (Şekil 4.4.). Eroin ise hedef enzimlerle ağırlıklı olarak hidrofobik etkileşmelerde bulunmaktadır.

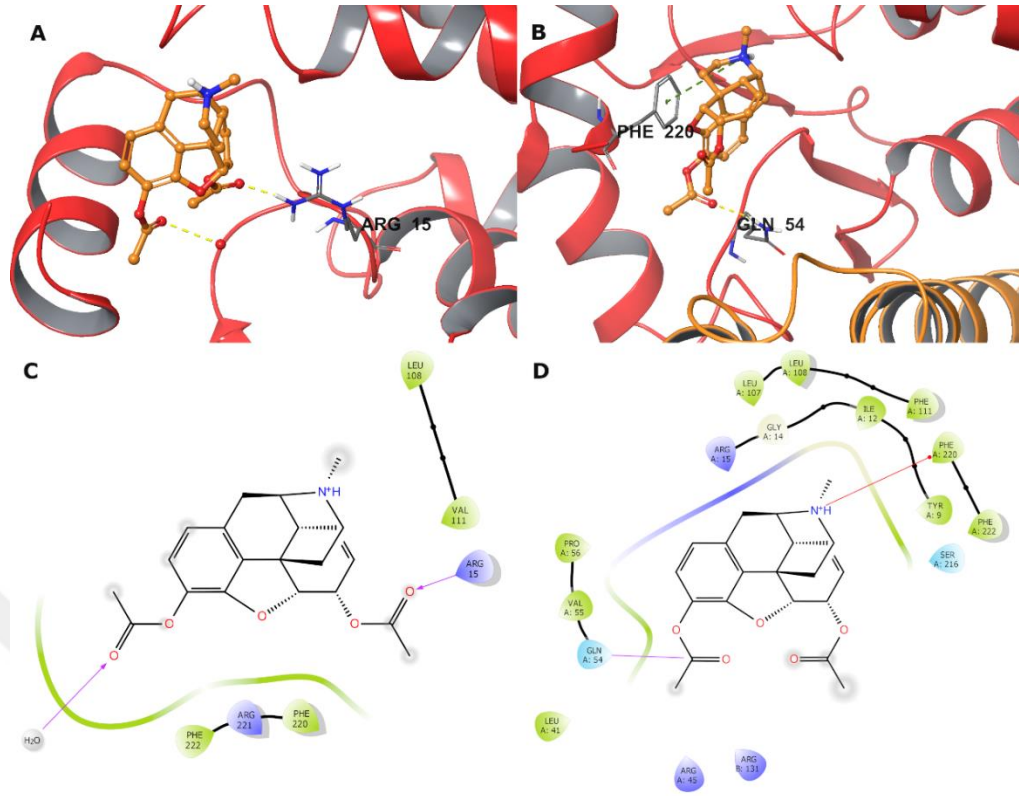
Diğer taraftan eroin molekülünde yer alan asetil gruplarının hidroliziyle oluşan morfin metaboliti serbest kalan hidroksil grupları ile hidrojen bağı gibi kritik polar etkileşmelere daha müsait hale gelmiştir ve bu durum Kenetleme skorlarına

yansımıştır. GSAT1, GSTA2, GSTO1 ve GSTT2 gibi hedeflere olan afinite eroinin metabolizması sonucu oluşan morfin ile kayda değer bir şekilde artmıştır. Özellikle GSTA1 ve GSTA2'ye karşı morfin, GSH'ye yakın kenetleme skorlarına sahip olmuştur. Örneğin eroin, GST'nin α -1 alt tipi olan GSTA1 aktif bölgesindeki teorik bağlanma biçiminde, ester gruplarında biri üzerinden GSH bağlanma yöresindeki (G yöresi) (89) Arg15 amino asidi ile H bağı yaparken pentasiklik gövdesi daha derinde yer alan hidrofobik yöre (H yöresi) (89) ile kısmen etkileşmektedir (Şekil 4.4A ve Şekil 4.4C). Diğer taraftan morfin, serbest hidroksil grupları sayesinde G yöresi ile daha fazla elektrostatik etkileşimler yaparken pentasiklik gövde H yöresine daha iyi sokulmaktadır (Şekil Şekil4.5A ve Şekil4.5C). Benzer durum GSTA1 ile yüksek yapısal benzerlik gösteren α -2 alt tipi (GSTA2) için de gözlenmiştir (Şekil 4.4B, Şekil 4.4D, Şekil4.5B ve Şekil 4.5D).

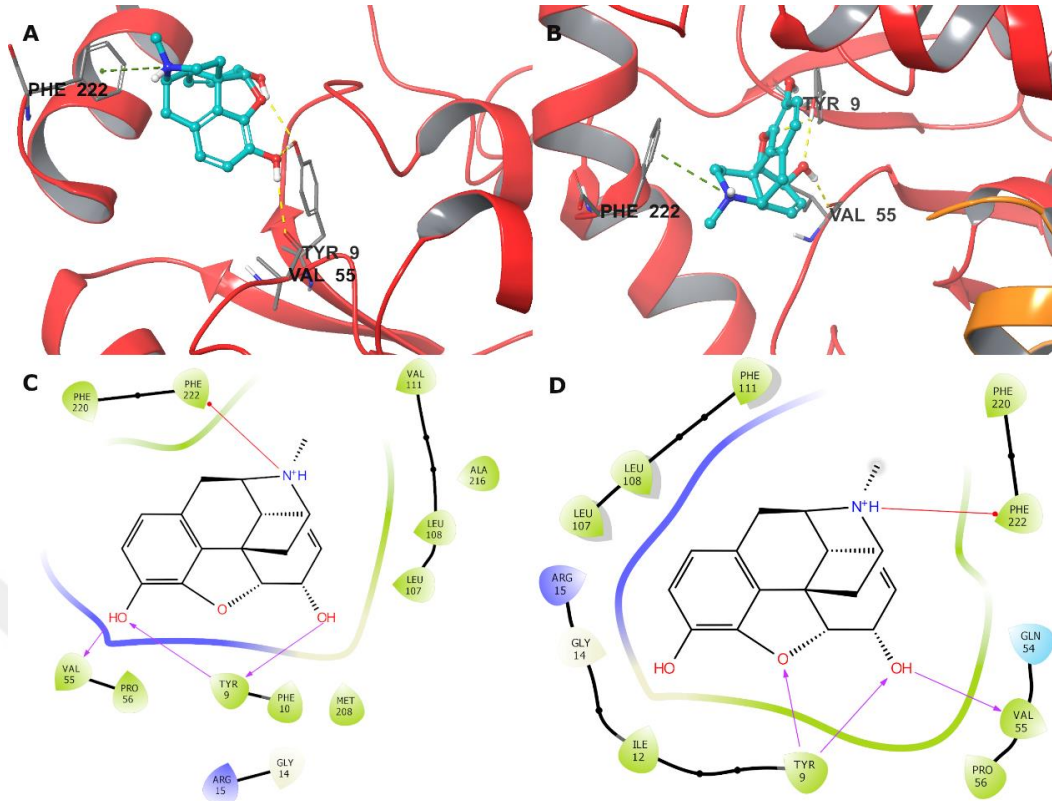
Bu sonuçlar eroinin GSTA2, GSTA3 ve GSTP1 enzimlerine bu enzimlerin aktivitelerini etkileyebilecek afinite gösterdiği ve bazı önemli amino asitlerle etkileştiğini göstermektedir. Örneğin eroin, GSTA2 G bölgesinde, GSTA alt tiplerinde ortak olarak bulunan (korunmuş) ve işlevsel olarak önemli bir amino asit olan Gln54 ile hidrojen bağı kurarken H bölgesi ile yoğun van der Waals etkileşimleri göstermektedir (Şekil 4.4B ve Şekil 4.4D). Morfin ise GSTA1, GSTA2, GSTK1 ve GSTO2'ye, GSH'ye kıyasla, bu enzimleri güçlü bir şekilde inhibe edebilecek kadar yüksek afinite göstermekte ve önemli bağısız etkileşimlerde bulunmaktadır. Örneğin morfin GSTA1 ve GSTA2 aktif bölgesinde üç amino asitle elektrostatik etkileşimler göstermektedir: Tyr9, Val55 ve Phe222 (Şekil 4.5.). Tyr9 katalitik aktivite için önemli bir konformasyonel değişimi tetiklemektedir, Val55 ve Phe222 GSTA alt tiplerinde GSH ile etkileşen önemli aktif bölge amino asitleridir (90,91). Diğer taraftan eroin ve morfinin glutatyon redüktaz ve glutatyon sentaza karşı kayda değer afinite ve inhibisyon göstermesi beklenmemektedir.



Şekil 4.4. GSH'nin GSTA1 (A) ve GSTA2 (B) aktif bölgesine bağlanma biçimi. GSH yeşil küre-çubuk, enzim amino asitleri gri çubuk, su molekülleri kırmızı küre, enzim omurga atomları renkli kurdele ve ligand-reseptör etkileşimleri kesik çizgiler olarak gösterilmiştir. GSH'nin bu enzimlerle gerçekleştirdiği tüm bağımsız etkileşimler iki boyutlu grafik halinde gösterilmiştir (C ve D).



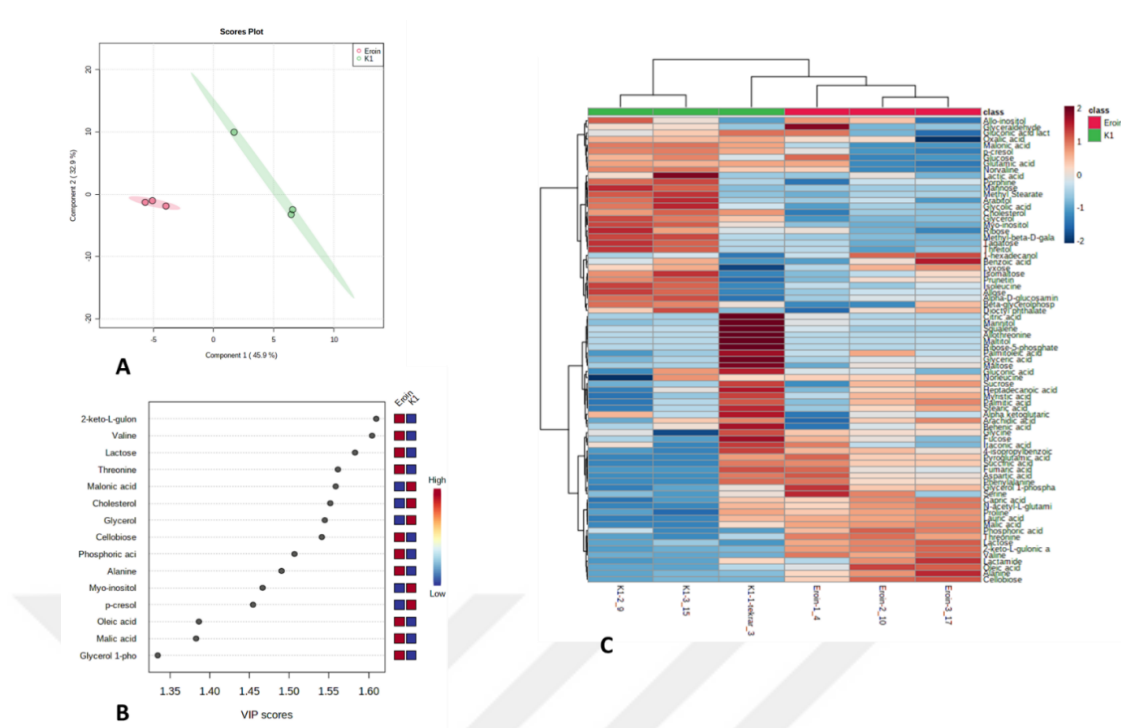
Şekil 4.5. Eroinin GSTA1 (A) ve GSTA2 (B) aktif bölgesinde moleküler modelleme ile tahmin edilen bağlanma biçimi. Eroin turuncu küre-çubuk, enzim amino asitleri gri çubuk, su molekülleri kırmızı küre, enzim omurga atomları renkli kurdele ve ligand-reseptör etkileşimleri kesik çizgiler olarak gösterilmiştir. GSH'nin bu enzimlerle gerçekleştirdiği tüm bağısız etkileşimler iki boyutlu grafik halinde gösterilmiştir (C ve D).



Şekil 4.6. Morfinin GSTA1 (A) ve GSTA2 (B) aktif bölgesinde moleküler modelleme ile tahmin edilen bağlanma biçimi. Morfin turkuaz küre-çubuk, enzim amino asitleri gri çubuk, enzim omurga atomları renkli kurdele ve ligand-reseptör etkileşimleri kesik çizgiler olarak gösterilmiştir. GSH'nin bu enzimlerle gerçekleştirdiği tüm bağımsız etkileşimler iki boyutlu grafik halinde gösterilmiştir (C ve D).

4.5. Metabolomik Bulguları

Eroin maruziyeti (200 μ M) uygulanan hücrelerde gerçekleşen olası metabolomik profillerin değişimleri kontrolle kıyaslanmak amacıyla GC-MS yöntemi ile incelenmiştir. Sonuçta metabolomik veriler birleştirilerek bütünleşik omik (entegre omiks) verisi elde edilmiş ve bu veri matrisi çok değişkenli veri analizleri ile değerlendirilmiştir. PLS-DA analizlerindeki farklılaşmaya neden olan metabolitlerin belirlenmesi için VIP (projede önemli değişken) grafiklerinden yararlanılmıştır (Şekil 4.6. A,B,C). Elde edilen bulgular eroine maruz bırakılan hücrelerde kontrole kıyaslandığında metabolik profillerin değiştiğini ortaya koymuştur. Bunlar arasında, VIP grafiğinde başlıca metabolitler sıralanmıştır. Bunlar arasında glutamat, valin, laktoz, gliseraldehit, glukonik asitin de yer aldığı, GSH yolları ile doğrudan ilişkisi olan önemli proteinlerin de bulunduğu metabolitler bulunmaktadır.



Şekil 4.7. SHSY5Y hücre hattında eroin maruziyetine ait çok değişkenli veri analiz, A) PLS-DA skor grafiği B) Veri analizinde farklılaşmaya neden olan metabolitlere ait VIP grafiği C) Eroin maruziyeti ile artan veya azalan metabolitlerin değişim yönünü gösteren regresyon katsayısı grafiği; PLS-DA: Kısmi En Küçük Kareler Farklılaştırma Analizi, VIP: Projede önemli değişken.

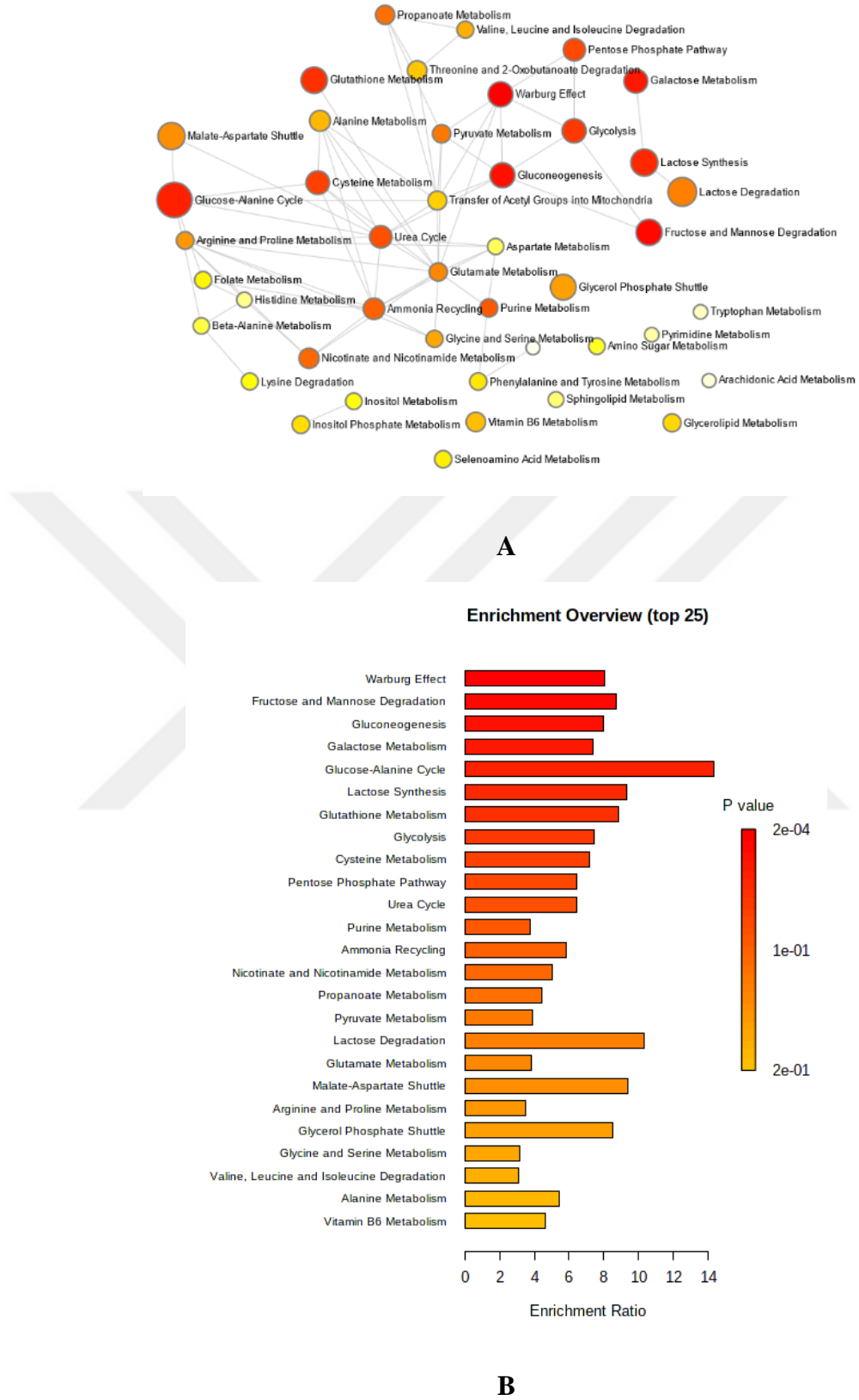
GC-MS yöntemi ile veri tabanında yer alan toplam 76 metabolit tanımlanmıştır. Bu metabolitlerden 18 tanesinin iki grup arasında anlamlı olarak farklı olduğu görülmüştür ($p < 0.05$) (Tablo 4.2.). Bu metabolitler ve p değerleri aşağıda verilmiştir:

Tablo 4.2. Eroin maruziyeti ile hücre hattında anlamlı şekilde değiştiği tanımlanan metabolitler

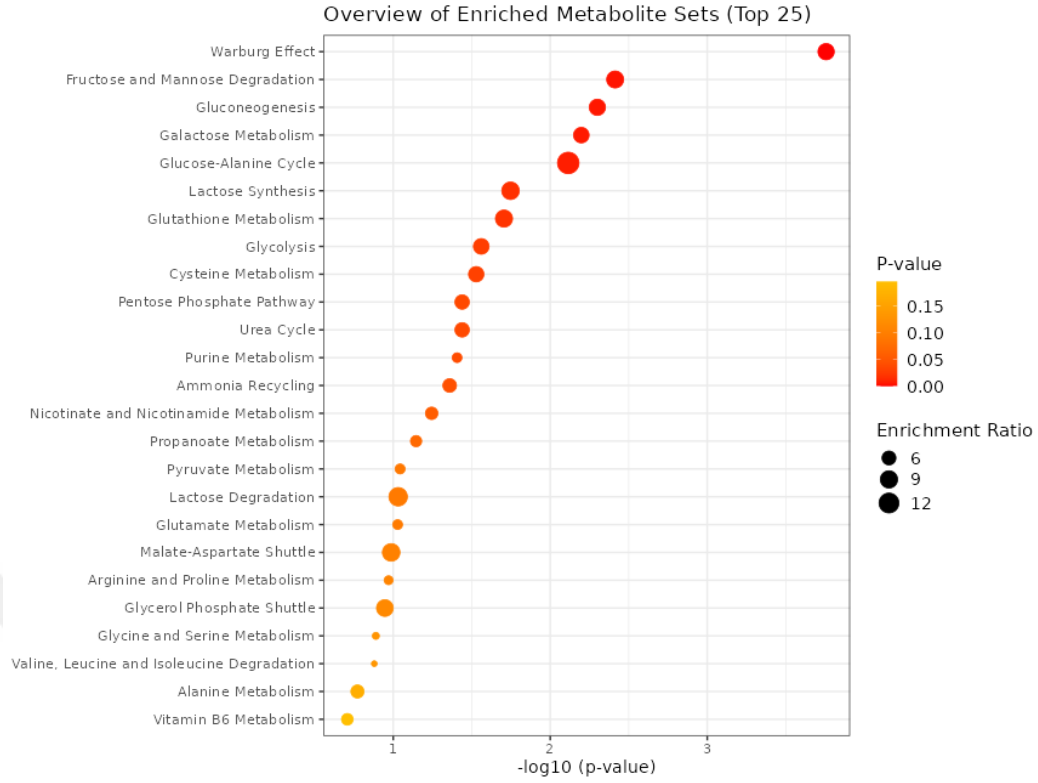
| Sıra | Metabolit | P değeri |
|------|----------------|----------------|
| 1 | Oleik asit | $9,7. 10^{-5}$ |
| 2 | Riboz | $1,9. 10^{-4}$ |
| 3 | Treonin | $2,0. 10^{-4}$ |
| 4 | İzolösin | $1,1. 10^{-3}$ |
| 5 | Maltitol | $2,4. 10^{-3}$ |
| 6 | Fukoz | $2,5. 10^{-3}$ |
| 7 | Fosforik asit | $3,5. 10^{-3}$ |
| 8 | Laktik asit | 3,6E-03 |
| 9 | Glukoz | $5,9. 10^{-3}$ |
| 10 | Prunetin | $9,3. 10^{-3}$ |
| 11 | Gliserol | $1,4. 10^{-3}$ |
| 12 | Mannoz | $1,7. 10^{-3}$ |
| 13 | Liksoz | $3,2. 10^{-3}$ |
| 14 | Riboz-5-fosfat | $3,2. 10^{-3}$ |
| 15 | Treitol | $3,5. 10^{-3}$ |
| 16 | Glukonik asit | $4,0. 10^{-3}$ |
| 17 | Laktoz | $4,1. 10^{-3}$ |
| 18 | Glutamik asit | $4,2. 10^{-3}$ |

4.6. Yolak Analizleri

Eroine maruz bırakılan SHSY5Y hücre hattında kontrole kıyaslanarak yapılan metabolomik analiz istatistiksel olarak karşılaştırılmış (Tablo 4.2.) ve anlamlı değişen metabolitler kullanılarak ($p < 0.05$) yolak analizleri (MetaboAnalyst, Kanada) gerçekleştirilmiştir. Yolak analizlerinin sonuçları Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.'de sunulmuştur.



Şekil 4.8. Eroin maruziyeti ile hücre hattında değişen yollar (A) ve istatistiksel olarak önemli değişen metabolitlerin zenginleştirici yollar analizlerinden elde edilen yollar (B).



Şekil 4.9. Eroin maruziyetine bağlı olarak hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı değişen metabolitlerin yer aldıkları yollar.

Eroin maruziyeti ile istatistiksel olarak anlamlı şekilde etkilenen ($p < 0,05$) yollar arasında Şekil 4.9.'da verildiği şekilde Fruktoz-mannoz degradasyonu, glukoneogenez, galaktoz metabolizması, glutatyon metabolizması, sistein metabolizması, glikoliz, pentoz fosfat yolağı, üre döngüsü ve glutamat metabolizmasının yer aldığı görülmektedir. Bunlardan özellikle glutatyon sentez döngüsü içinde önemli yeri olan, biyolojik fonksiyonları dolayısıyla pek çok farklı molekülün de dâhil olduğu metabolitlerin eroin uygulaması sonrasında kontrole göre anlamlı şekilde değiştiği görülmüştür. Söz konusu yolların içinde glutatyon ve sistein metabolizmasının istatistiksel olarak anlamlı şekilde değiştiği de elde edilen sonuçlar ile ortaya konmuştur ($p < 0,05$).

5.TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında eroin uygulanmasıyla meydana gelebilecek toksisitede glutatyon metabolizmasının rolünün hedefli ve hedefsiz metabolomik çalışmalarla ortaya konulması, toksisitede NAC'ın daha hidrofobik bir türevi olan ve kan beyin bariyerini geçebilen NACA'nın olası koruyucu etkisinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Opioid kullanım bozukluğu, önemli klinik sorunlara neden olan kronik tekrarlayan bir bozukluktur. Sentetik bir opioid türevi olan eroin, doğal olarak oluşan bazı haşhaş bitki çeşitlerinin tohum kabuğundan ekstre edilen, morfinden sentezlenen, yasadışı, oldukça bağımlılık yapıcı bir uyuşturucu maddedir(6).

Opioidler arasında bağımlılık potansiyeli en fazla olan eroin (Diasetil morfin veya 3,6-diasetil morfin) , pek çok hastalık ve sosyal problemlere hatta ölüme sebep olabilen bir maddedir (92).

Eroin, morfinin asetillenmesi ile elde edilir (3).Dolayısıyla morfin, eroin metabolitlerinden en önemlisidir. Oral uygulamasından sonra, ilk geçiş etkisine uğrar. IV uygulandığında karaciğerde hızlı bir şekilde 6-asetilmorfine ve daha sonra daha yavaş olarak morfine dönüşür (93). Morfin de %80 oranında Morfin 3-β Glukronit'e ve düşük bir oranda Morfin 6-β Glukronit'e metabolize olur (94). Metabolize olduktan sonra hızla etkisini gösteren eroinin MSS'i deprese etme özelliği, nitel olarak diğer depresan madde ve ilaçlara (alkol ve benzodiazepinler) benzediği ve başta mu-opioid reseptörleri olmak üzere, GABA, dopamin ve noradrenarjik sistemle ilişkili olduğu belirtilmiştir (95).

Eroin bağımlılığı beyin normal yapısını ve fonksiyonunu değiştirebilmektedir. Kronik eroin istismarı uzun süreli maruziyette MSS'nin bilişsel fonksiyonlarının bozulmasına ve beyin normal fonksiyonlarının değişmesine sebep olmaktadır. Çalışmalar eroinin kronik istismarının beyinde prefrontal kortekste, temporal insulada, talamusta, nükleus akumbenste, amigdalada ve sensorimotor yapısında bozulmalara sebep olduğunu göstermiştir(96).

Opioidlerin sık kullanımı, ROS üretiminin artmasına ve antioksidan kapasitenin de azalmasına neden olmaktadır. Bu durum sinaptik elastikliği modüle etmekte ve sonuçta afyon bağımlılığına katkıda bulunmaktadır. ROS, enflamatuar sitokinlerin sentezini ve matriks metalloproteinaz (MMP) aktivitesini artırır (10).

Çalışmalarda elde edilen bulgular, morfin tedavisinin, morfin toleransının oluşmasına da katkıda bulunabilecek MMP-9 aktivasyonuna yol açtığını göstermektedir. Oksidasyon/redüksiyon durumunun dengede tutulmasının opioid kullanım bozukluğunun zararlı etkileri açısından yararlı olabileceği önerilmektedir (97,98).

Yapılan bir çalışmada, opioid kullanan kişiler ile sigara içen ve içemeyen sağlıklılar arasında oksidatif ve inflamatuvar parametreler karşılaştırılmıştır. Opioid kullanan kişilerde iki karşılaştırma grubuna kıyasla daha düşük SOD ve CAT aktiviteleri ile daha yüksek TNF- α ve MMP-9 seviyeleri gözlemlenmiştir. Opioidler oksidatif dengesizliği şiddetlendirmiş ve sigara içen karşılaştırma grubunda altta yatan oksidatif hasarı ortaya çıkarmıştır. Metadon tedavisinden iki hafta sonra daha düşük MMP-9 ve TNF- α seviyeleri gözlenmiş, daha yüksek SOD ve katalaz aktiviteleri ile tedavi ilişkilendirilmiştir. Genel olarak oksidatif profilde bir iyileşme belirlenmiştir(97).

Dünya çapında milyonlarca insan tarafından suistimal edilen yasa dışı bir uyuşturucu olan eroinin kötüye kullanımının GSH ve ilişkili enzimler üzerindeki etkisinin ortaya konulduğu bir çalışmada, 9 eroin bağımlısı ve 8 kontrol otopsisinden elde edilen insan beyin örnekleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Sonuçlar, eroin bağımlılarının frontal, temporal, parietal ve oksipital korteks, beyin sapı, hipokampus ve beyaz cevherinde GST ve GSHPx aktivitelerinde önemli artış, GSH seviyesinde azalma olduğunu ve Se-GPx aktivitesinin değişmediğini göstermiştir. GST pi ekspresyonu hem mRNA hem de protein seviyelerinde artmış, ancak artış beyin sapında diğer bölgelere göre daha düşük olmuştur. Eroin insan beyninin tüm bölgelerini ve özellikle beyin sapını etkilemektedir. Glutasyon S-transferaz, eroin zehirlenmesi sırasında önemli bir rol oynadığı, ancak koruyucu etkisinin beyin sapında beyin korteksi veya hipokampusa göre daha düşük olduğu ifade edilmiştir (98).

İnsan beyninde morfin ve eroin maruziyeti oksidatif strese de sebep olduğu belirtilmektedir. Morfinin bu dokularda lipid peroksidasyonunu indüklediği ve eroinin de fare beyninde oksidatif DNA hasarına, protein ve lipid oksidasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (93). Sıçanlarda nalokson uygulaması ile önlenen eroin kullanım gerilemesi, antioksidan sistemi deprese etmiş, bu durumun melatonin veya E vitamini ile GPx kofaktörü olan selenyum uygulaması ile önlenebileceği ifade edilmiştir (99).

Eroin kullanımını sonucunda hızla kana geçmekte, nitrik oksit, süper oksit gibi serbest radikaller oluşturmaktadır. Nitrik oksit radikalının fazlası, SOD, CAT, GPx gibi aktif grubu hidrosülfid olan (-SH) enzimlerin tiyol grupları ile birleşerek, bu enzimleri inaktif hale getirir. Antioksidan enzimlerin azalması ROS miktarlarının daha da artmasına neden olur (94). Kronik maruziyeti oksidatif stresi indükleyen eroin , beyin ve nörotoksik hasara neden olabilmektedir. Bazı hayvan çalışmaları, eroin kullanımının beyinde oksidatif stresin bir işareti olan glutatyonun tükenmesine neden olduğunu göstermektedir (100).

Xu B. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada farelere eroin enjeksiyonu uygulanmış ve antioksidan enzim seviyelerindeki değişiklikler gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda SOD, CAT ve GPx seviyelerinde ciddi bir düşüş gözlenmiştir (54). 2004 yılında yapılan bir çalışmada farelere eroin verilmiş ve bağımlılık oluşturulan farelerde antioksidan kapasite izlenmiştir. Farelerde ROS üretiminin arttığı , antioksidan enzim seviyelerinin azaldığı ve oksidatif stres oluştuğu rapor edilmiştir (101).

Zhou JF. ve arkadaşlarının 114 eroin bağımlısı ve 100 sağlıklı gönüllü ile yaptığı bir çalışmada lipit peroksidasyonu ve nitrik oksit düzeylerinin ortalama plazma seviyelerinin eroin bağımlısı bireylerde önemli ölçüde arttığı SOD, CAT ve GSH-Px ortalama eritrosit değerlerinin ise anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir (80).

Eroin uygulamasından sonra farelerin beyaz kan hücrelerinde yüksek ROS üretimi ve lipid ile proteinin oksidatif hasarı beyin ve karaciğerde gözlenmekte iken benzer etkinin kalpte gözlenmediği bildirilmiştir. Eroin bağımlılıklarında prooksidan /oksidan homeostazın bozulduğu belirlenmiştir. İlginç bir şekilde eroinin kendisi gibi eroin yoksunluk sendromununun da oksidatif stresi tetiklediği görülmüştür (102).

Eroin verilen farelerde oksidatif stresin olup olmadığını ve eksojen antioksidanların etkilerini araştırıldığı bir çalışmada, eroine bağımlı fare modeli intraperitoneal enjeksiyon yoluyla yaratılmıştır. DNA, protein ve lipidin oksidatif hasarı, sırasıyla tek hücreli elektroforez, 2,4-dinitrofenilhidrazin yöntemi ve tiyobarbitürik asit yönteminin analizi ile ölçülmüştür. Antioksidan enzimlerin aktiviteleri ve toplam antioksidan kapasite de analiz edilmiştir. Eroin uygulandıktan sonra farelerde, beyinde süperoksit dismutaz, katalaz ve GPx gibi antioksidan enzimler ve serumda toplam antioksidan kapasitede azalma gözlenmesinin yanı sıra DNA,

protein ve lipitte oksidatif hasar oluşmuştur. Öte yandan, ekzojen antioksidanlar, eroin uygulanan farelerde oksidatif stresi sınırlayabilir, hatta yoksunluk sendromunu hafifletebilir. Sonuçlar, ayrıca ROS'un eroinin tüm bağımlılık ve geri çekilme sürecine katkıda bulunabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, oksidatif stresi bloke etme stratejileri, afyon kötüye kullanımı için terapinin geliştirilmesinde faydalı olabileceği ifade edilmiştir. Ayrıca, yapılan çalışmalarda eroinin dopamin seviyesini yükselttiği gösterilmiştir. Dopaminin oksidatif metabolizmasındaki bir artışın, artan ROS oluşumuna yol açtığı iyi bilinmektedir ve bu nedenle, ROS, karbonhidratlara, amino asitlere, fosfolipitlere ve nükleik asitlere verilen hasar nedeniyle sıklıkla nöronal hücre ölümü ile ilişkilendirilmiştir (103).

Ortalama 1,7 yıldır eroin kullanmakta olan 14-16 yaş aralığındaki 20 erkek hasta ve kontrol grubu olarak seçilen 13 sağlıklı gönüllü ile yapılan bir çalışmada kan örnekleri toplanmıştır. Eroin kullanan grupta kontrol grubuna göre ortalama plazma ALT ve LDH aktivitelerinin anlamlı derecede yüksek (sırasıyla 1,7 ve 1,4 kat) olduğu görülmüştür. Ayrıca lipid peroksidasyonunun eroin kullanıcılarında kontrol grubuna kıyasla %20 daha yüksek olduğu saptanmıştır (104).

Türkiye'deki eroin bağımlılarında oksidatif stres enzimlerinin ölçüldüğü bir çalışmada CuZn-Süperoksit Dismutaz antioksidan aktivitelerinin eroin bağımlılarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük olduğu saptanmıştır (105).

Hazman Ö.'ün 2006 yılında yaptığı bir çalışmada, eroin verilen sıçanlarda ROS düzeylerinin arttığı gözlenmiş ve GSH seviyelerinin ise önemli derecede azaldığı rapor edilmiştir (94).

Başka bir çalışmada eroin bağımlılarında tiyol (SH) ve total tiyol (ToSH) düzeylerinin azaldığı ve SH/SS dengesinin disülfid bağı oluşumu yönünde bozulduğu saptanmıştır (106). Tong J. ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı bir çalışmada eroin ve kokain kullanıcılarında otopsi bulguları incelenmiş ve yapılan hayvan çalışmalarının aksine kullanıcılarında glutatyon seviyelerinin normal olduğu rapor edilmiştir (100). Bir başka çalışmada eroinin, doz tekrarına göre glutatyon seviyelerini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Tek doz eroinin, farelerde glutatyon seviyesini % 205 artırdığı görülmüştür ancak tekrarlanan dozun glutatyon seviyelerini değiştirmediği farkedilmiştir (107).

Morfinin SH-SY5Y hücrelerine uygulandığı bir çalışmada, antioksidan enzimlere ait mRNA düzeylerinin düştüğü gözlenmiş ve N-asetilsistein uygulaması sonunda mRNA düzeylerinde yükseldiği belirlenmiştir (108). Opioidlerin sebep olduğu oksidatif stresin tedavisinde antioksidan bir molekül olan GSH'ın prokürsörü olan NAC kullanılmıştır. NAC, doğal olarak oluşan amino asit sisteinin *N*-asetil ön ilacıdır. NAC, intravenöz, oral ve nebulizör formlarında reçete ile temin edilebilmektedir. Asetaminofen zehirlenmesini tedavi etmek için oral veya intravenöz antidottur. Preklinik modellerde yoksunluğu takiben NAC'a bağlı glutamaterjik aktivitenin yenilenmesi, opioidler dahil olmak üzere çeşitli maddelerde gösterilmiştir. Çeşitli suistimal edilen ilaçlar arasındaki tutarlılıklara rağmen, insan katılımcılarda, tek başına bir tedavi olarak veya opioid ikame terapilerine veya davranışsal tedaviye ek olarak, opioid bağımlılığında NAC'ın etkinliğini belirlemek için hiçbir çalışma yapılmamıştır. Ek olarak, bir kemirgen modelinde NAC'ın alkol yoksunluğu ve diğer alkol kaynaklı caydırıcı etkiler üzerindeki etkileri umut verici sonuçlarla araştırılmıştır. Bu ve diğer sonuçlar, NAC'ın suistimal edilen çeşitli maddeler için etkili bir farmakoterapi olabileceğini ve maddeler arasında daha fazla klinik araştırmaya ihtiyaç olduğunu öne süren klinik öncesi kanıtlara katkıda bulunmaktadır(109).

Elde ettiğimiz sonuçlar değerlendirildiğinde, literatür verileri ile uyumlu olarak SHSY5Y nöroblastoma hücrelerinde eroin maruziyeti ile sitotoksisitenin indüklendiği ve GSH düzeylerinin kontrole göre anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir. Bununla birlikte eroin ile NAC ve NACA uygulamasının da hücre canlılığını artırdığı ve GSH depleksiyonunu önlediği belirlenmiştir. NAC hidrofilik karakterinden dolayı kan beyin bariyerini geçemezken, NAC'ın amid formu olan NACA ise NAC'den daha yüksek hücresel membran geçirgenliğe sahiptir ve bu nedenle dikkate değer bir alternatif terapötik ajan olarak kabul edilmektedir. Sonuçlarımız ise etkinlik açısından NAC ve NACA arasında bir fark göstermemektedir. Ayrıca *in siliko* değerlendirmelerde, eroin ve onun majör metaboliti olan morfinin glutatyon S-trasferaz, glutatyon redüktaz (GRD) ve glutatyon sentaz (GSS) enzimlerinin aktif bölgelerine bağlanma biçimleri ve afiniteleri hesaplanmaya çalışılmıştır. Eroinin kendisi GSH yolağındaki enzimlerle zayıf bir bağ kurarken, en önemli metaboliti olan morfinin GST ile güçlü bir bağlanma göstermiştir. Bu durum, eroin metabolizmasının da toksisitesine katkıda bulunduğunu,

GSH düzeylerindeki azalmaya metabolitlerin enzimlerle olan etkileşmesinin de katkı sunabileceğini düşündürmüştür.

Opioid kullanım bozukluğu olan ve olmayan kullanıcılarından ayırmak için objektif biyolojik belirteçler geliştirmeyi amaçlayan bir metabolomik çalışma yapılmıştır. Çalışma, kronik yüksek düzeyde afyon kullanan ağırlıklı olarak Türkmen popülasyonunda opioid kullanım bozukluğunun metabolomik belirteçlerinin düzeyde ortaya koymuştur. Opioid kullanım bozukluğu pozitif olarak teşhis edilen yüksek afyon kullanıcılarının negatif olarak teşhis edilen kullanıcılardan ayırt edilmesi için önemli olan, hedeflenmemiş kütle spektrometresi kullanılarak tespit edilen 712 pik için metabolit tanımlamaları ortaya konmuştur. Bu farklılık, pozitif olanlar için %95 tahmin eden bir belirteç kestirimi olarak değerlendirilmiş, doğruluğu %63 olarak verilmiştir. Bu tanımlamaların hiçbiri, kötüye kullanılan diğer ilaçlardan türetilen bilinen metabolitler değildir. Yolak zenginleştirme analizi, B9 vitamini (folat), B7 vitamini (biyotin), sitokrom P450, pürin ve glikan metabolizmasında ve yağ asitlerinin FAD/FADH2 dönüşümünde genel bir bozulmaya işaret etmiştir. Bu sonuçlar, bir opioid kullanım bozukluğunun pozitif teşhisini tahmin etmek için bir metabolik profilin kullanılabileceği şeklinde değerlendirilmiştir (110). Opioid kullananların idrarları ile yapılan bir hedefsiz metabolomik çalışmada, kullananlar ve kullanmayanları farklılaştıran endojen bileşikler, büyük ölçüde vitaminler ve yardımcı faktörler, nörotransmisyonunda yer alan metabolitler, Krebs döngüsü, pürin metabolizması, merkezi karbon metabolizması, histon modifikasyonu ve asetilasyonu şeklinde tanımlanmıştır (111).

Bizim çalışmamızda da eroin maruziyeti olan hücrelerde gerçekleşen olası metabolomik profillerin değişimleri incelendiğinde eroine maruz bırakılan hücrelerde kontrole kıyasla metabolik profillerin değiştiği ortaya konmuştur. Bunlar arasında GSH yolaklarında önemli olan glutamat, valin, laktoz, gliseraldehit, glukonik asit gibi önemli proteinlerin de bulunduğu metabolitler yer almaktadır. Sonuçlarımız eroin maruziyetinde GSH yolaklarının etkilendiğini doğrulamaktadır. Biyolojik fonksiyonları dolayısıyla pek çok farklı molekülün de dahil olduğu metabolitlerin içerisinde özellikle glutatyon sentez döngüsü içinde önemli yeri olan, eroin uygulaması sonrasında kontrole göre anlamlı şekilde değiştiği görülmüştür. Söz

konusu yolakların içinde glutatyon ve sistein metabolizmasının istatistiksel olarak anlamlı şekilde değiştiği de elde edilen sonuçlar ile ortaya konmuştur.

Çalışmamız, eroin toksisitesinde GSH tüketimini ortaya koymuş, terapötik yaklaşımların geliştirilmesine katkı sunacak veriler elde edilmiştir. Madde bağımlılığına bağlı gelişen oksidatif stresin tedavi stratejisi olarak antioksidanların kullanımını görölmektedir ve yeni tedavi yaklaşımları aranmaktadır. Bu nedenle, madde bağımlılığına neden olan eroin gibi maddelerin toksisite mekanizmasının aydınlatılması, oluşturduğu oksidatif hasarın toksisitedeki ve bağımlılıktaki rolünün ortaya konması hastaların tedavi seğeneklerini, dolayısıyla yaşam kalitelerini artırabilir. Sonuçlarımız, GSH öncü maddeleri olarak NAC ve NACA'nın eroin bağımlılığları için, klinikte önerilebilecek önemli seğenekler olduğunu göstermiştir. Eroin bağımlılığında GSH öncü madde takviyesi ile bir klinik denemenin de olmadığı görölmüştür. Ancak bu etkinin klinik çalışmalar planlanarak gösterilmesine ihtiyaç bulunmaktadır. Ayrıca daha hidrofobik yapıda olan ve kan beyin engelini geçebilen NACA ile daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Çalışmamızda sitotoksisite, hedefli ve hedefsiz metabolomik analizler, *in siliko* veriler ve GSH analizleri bu hastalarda GSH yolağının etkilendiğini ve eroin intoksikasyonunda önemli bir hedef olduğunu göstermiştir.
- Eroine bağlı oluşan sitotoksisite ve GSH tüketiminin önemli GSH öncü maddeleri olan NAC ve NACA uygulaması ile azaldığını ortaya konmuştur.
- Eroine bağlı toksisitede GSH yolağının *in siliko* verilerle desteklenerek metabolomik olarak ortaya konduğu, NAC ve NACA'nın eroin toksisitesinde koruyucu etkisinin karşılaştırıldığı bir başka çalışmaya rastlanmamış olması çalışmamızı özgün kılmaktadır.
- Farklı opiyatlarda NAC takviyesi ile denemeler yapılmış olmakla birlikte eroin bağımlılığında böyle bir klinik denemenin de olmadığı görülmüştür. Daha hidrofobik yapıda olan ve kan beyin engelini geçebilen NACA ile daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.
- Klinikte eroin bağımlılarına GSH öncü maddesi önerilebilmesinin önemli olabileceği, bağımlılarda oluşacak olası toksisiteyi azaltacağı ve planlanacak klinik çalışmaların bu anlamda değerli olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, eroin bağımlılığında oksidatif stresin rolü olması sebebiyle bu kişilere antioksidan takviye yapılması, olası toksisitenin ve bağımlılık yapıcı etkilerinin azalmasına yardımcı olabileceği değerlendirilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Bethesda (MD). National Center for Biotechnology Information PubChem Compound Summary for CID 5462328, Heroin. [Internet]. 2004. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Heroin>
2. Webster LR. Risk Factors for Opioid-Use Disorder and Overdose. 2017;125(5):1741–8.
3. Cemek M, Emin M. The Roles of Melatonin and Vitamin E Plus Selenium in Prevention of Oxidative Stress Induced by Naloxone-Precipitated Withdrawal in Heroin-Addicted Rats. 2011;55–66.
4. Pan J, Zhang Q, Zhang Y, Ouyang Z, Zheng Q, T RZ. Oxidative stress in heroin administered mice and natural antioxidants protection. 2005;77:183–93.
5. Martín SLC. Opioids Pharmacology, Abuse, and Addiction. Cruz SL (Opioids WG, Seminar), editors. Mexico City: Springer;
6. Volkow NDM. NIH National Institute on Drug Abuse. Res Rep Ser [Internet]. 2007; Available from: https://nida.nih.gov/sites/default/files/heroinrrs_11_14.pdf
7. Hernandez AF. In silico toxicology, a robust approach for decision-making in the context of next-generation risk assessment. Toxicol Risk Assess Multi-System Heal Impacts from Expo. 2021 Jan 1;31–50.
8. Eguchi A, Nomiya K, Sakurai K, Kim Trang PT, Viet PH, Takahashi S, et al. Alterations in urinary metabolomic profiles due to lead exposure from a lead-acid battery recycling site. Environ Pollut [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2023 Jan 3];242(Pt A):98–105. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29966840/>
9. Eguchi A, Nomiya K, Sakurai K, Thi P, Trang K. Alterations in urinary metabolomic profiles due to lead exposure from a lead acid battery recycling site *. Environ Pollut [Internet]. 2018;242:98–105. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.071>
10. Yaman Ö. Hekimlikte Metabolomik Çalışmalara Genel Bir Bakış. 2015;3(1):33–46.
11. Mizuno H, Ueda K, Kobayashi Y, Tsuyama N, Todoroki K, Min JZ, et al. The great importance of normalization of LC-MS data for highly-accurate non-targeted metabolomics. Biomed Chromatogr. 2016;
12. Kilic FS. Opioidler , Ağrı , Opioidlerin Suistimali ve Yanlış Kullanımı. :125–9.
13. Bethesda MD (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases). LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. LiverTox [Internet]. 2012; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31643176/>
14. Papaver Somniferum [Internet]. Available from: <https://www.bbc.com/news/world-asia-58308494>

15. Barile FA. *Clinical Toxicology Principles and Mechanisms*. Boca Raton, London, New York, Washington D.C.: CRC PRESS; 2005.
16. Rica C. II. *International Opium Convention*. League Nations, *Treaty Ser Drugs Psychotr Subst*. 1975;8(January 1912):187.
17. Ballas SK. *Opioids and Sickle Cell Disease : From Opium to the Opioid Epidemic*. 2021;
18. Rook EJ, Van Ree JM, Van Den Brink W, Hillebrand MJX, Huitema ADR, Hendriks VM, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of high doses of pharmaceutically prepared heroin, by intravenous or by inhalation route in opioid-dependent patients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006;98(1):86–96.
19. United Nations Office on Drugs and Crime [Internet]. 2021. Available from: <https://www.unodc.org/>
20. Türkiye Uyuşturucu Raporu. 2021.
21. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction [Internet]. 2019. Available from: https://www.emcdda.europa.eu/emcdda-home-page_en
22. American Society of Addiction Medicine [Internet]. Available from: <https://www.asam.org/>
23. Alcohol, Drugs and Addictive Behaviours [Internet]. [cited 2023 Jan 6]. Available from: <https://www.who.int/teams/mental-health-and-substance-use/alcohol-drugs-and-addictive-behaviours/terminology>
24. Angres DH, Angres KB. *The Disease of Addiction : Origins , Treatment , and Recovery*. 2008;(October):696–721.
25. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Dsm-5)*. American Psychiatric Association;
26. Coller J, Christrup LL, Somogyi AA. Role of active metabolites in the use of opioids. 2008;(May 2014).
27. Pathan H, Williams J. *Basic opioid pharmacology : an update*. 2012;
28. Al-Hasani R. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signaling and Behavior. *Anesthesiology*. 2011;23Hosztafi(1):1–7.
29. Frisoni P, Bacchio E, Bilel S, Talarico A, Gaudio RM, Barbieri M, et al. Novel synthetic opioids: The pathologist's point of view. *Brain Sci*. 2018;8(9):1–17.
30. S Hosztafi. [The history of heroin]. *ACTA Pharm HUNGARICA*. 2001;71(2).
31. Agnew J. *Medicine in the Old West: A History, 1850-1900*. North Carolina: McFarland & Company; 2010.
32. Klous MG, Brink W Van Den, Ree JMV, Beijnen JH. Development of pharmaceutical heroin preparations for medical co-prescription to opioid dependent patients. *Drug Alcohol Depend*. 2005 Dec 12;80(3):283–95.
33. International Narcotics Control Boards [Internet]. 2004. Available from: <https://www.incb.org/>

34. British Pharmacopoeia [Internet]. 2004 [cited 2023 Jan 3]. Available from: <https://www.pharmacopoeia.com/>
35. The Merck Index [Internet]. 1996. Available from: <https://www.rsc.org/merck-index>
36. Akhgari M, Etemadi-aleagha A, Jokar F. Street Level Heroin , an Overview on Its Components and Adulterants [Internet]. Vol. 1, Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse Volume 1. Elsevier Inc.; 2016. 863–877 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800213-1.00081-X>
37. Maas A, Maas A, Hess C. Confirmation of recent heroin abuse : Accepting the challenge Confirmation of recent heroin abuse : Accepting the challenge. 2017;(September).
38. Miller PM. Principles Of Addiction. 2013;Volume 1.
39. Jenkins AJ, Keenan RM, Henningfield JE, Cone EJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of smoked heroin. *J Anal Toxicol*. 1994;18(6):317–30.
40. Hendriks VM, Van den Brink W, Blanken P, Bosman IJ, Van Ree JM. Heroin self-administration by means of “chasing the dragon”: Pharmacodynamics and bioavailability of inhaled heroin. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2001;11(3):241–52.
41. Coller JK, Christrup LL, Somogyi AA. Role of active metabolites in the use of opioids. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009;65(2):121–39.
42. The Metabolism of Morphine and Heroin in Man. *Drug Metabolism Reviews*, 4(1), 39–73 | 10.3109/03602537508993748 [Internet]. [cited 2023 Jan 6]. Available from: <https://sci-hub.se/https://doi.org/10.3109/03602537508993748>
43. Smolka M, Schmidt LG. The influence of heroin dose and route of administration on the severity of the opiate withdrawal syndrome. *Addiction*. 1999;94(8):1191–8.
44. Behaviors CA. PRINCIPLES OF. Vol. 1.
45. What are the immediate (short-term) effects of heroin use? | National Institute on Drug Abuse (NIDA) [Internet]. [cited 2023 Jan 3]. Available from: <https://nida.nih.gov/publications/research-reports/heroin/what-are-immediate-short-term-effects-heroin-use>
46. Oelhaf RC, Azadfard M. Heroin Toxicity. StatPearls [Internet]. 2022 May 15 [cited 2023 Jan 3]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430736/>
47. Sporer KA. Acute heroin overdose. *Ann Intern Med*. 1999;130(7):584–90.
48. Angelucci F, Ricci V, Pomponi M, Conte G, Mathé AA, Attilio Tonali P, et al. Chronic heroin and cocaine abuse is associated with decreased serum concentrations of the nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *J Psychopharmacol* [Internet]. 2007 Nov [cited 2023 Jan 3];21(8):820–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17715210/>

49. Jaffe JA, Kimmel PL. Chronic Nephropathies of Cocaine and Heroin Abuse: A Critical Review. *Clin J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2006 Jul 1 [cited 2023 Jan 3];1(4):655–67. Available from: <https://cjasn.asnjournals.org/content/1/4/655>
50. Drugs | FDA [Internet]. [cited 2023 Jan 3]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs>
51. Aldini G, Altomare A, Baron G, Vistoli G, Carini M, Borsani L, et al. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radic Res* [Internet]. 2018;52(7):751–62. Available from: <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1468564>
52. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2013;1830(5):3143–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>
53. van Zandwijk N. N-Acetylcysteine (NAC) and glutathione (GSH): Antioxidant and chemopreventive properties, with special reference to lung cancer. *J Cell Biochem*. 1995;59(22 S):24–32.
54. Xu B, Wang Z, Li G, Li B, Lin H, Zheng R, et al. Heroin-Administered Mice Involved in Oxidative Stress and Exogenous Antioxidant-Alleviated Withdrawal Syndrome. 2006;153–61.
55. S.C. L. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013;
56. Jover R, Ponsoda X, Gómez-Lechón MJ, Castell J V. Potentiation of heroin and methadone hepatotoxicity by ethanol: An in vitro study using cultured human hepatocytes. *Xenobiotica*. 1992;22(4):471–8.
57. Ates B, Abraham L, Ercal N. Antioxidant and free radical scavenging properties of N-acetylcysteine amide (NACA) and comparison with N-acetylcysteine (NAC). *Free Radic Res*. 2008;42(4):372–7.
58. Pedre B, Barayeu U, Ezeriņa D, Dick TP. The mechanism of action of N-acetylcysteine (NAC): The emerging role of H₂S and sulfane sulfur species. *Pharmacol Ther*. 2021 Dec 1;228:107916.
59. Schwaiger T. A Review of the Use of N-Acetyl-Cysteine (NAC) in Clinical Practice. *Nat Med J* [Internet]. 2021;13(10). Available from: https://www.researchgate.net/publication/355685197_Issue_10_A_Review_of_the_Use_of_N-Acetyl-Cysteine_NAC_in_Clinical_Practice
60. Sunitha K, Hemshekhar M, Thushara RM, Santhosh MS, Yariswamy M, Kemparaju K, et al. N-Acetylcysteine amide: a derivative to fulfill the promises of N-Acetylcysteine. *Free Radic Res* [Internet]. 2013 May [cited 2022 Nov 30];47(5):357–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23472882/>
61. Raies AB, Bajic VB. In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2023 Jan 3];6(2):147–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27066112/>

62. Rim KT. In silico prediction of toxicity and its applications for chemicals at work. *Toxicol Environ Health Sci* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2023 Jan 6];12(3):191. Available from: [/pmc/articles/PMC7223298/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37223298/)
63. Segers K, Declerck S, Mangelings D, Heyden Y Vander, Eeckhaut A Van. Analytical techniques for metabolomic studies: A review. *Bioanalysis*. 2019;11(24):2297–318.
64. Ramirez T, Daneshian M, Kamp H, Bois FY, Clench MR, Coen M, et al. T4 Report* Metabolomics in toxicology and preclinical research. *ALTEX*. 2013;30(2):209–25.
65. Pintor AVB, Queiroz LD, Barcelos R, Primo LSG, Maia LC, Alves GG. MTT versus other cell viability assays to evaluate the biocompatibility of root canal filling materials: a systematic review. Vol. 53, *International Endodontic Journal*. 2020. 1348–1373 p.
66. Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria – A review. *Acta Histochem*. 2018;120(4):303–11.
67. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6):469–71.
68. Iskusnykh IY, Zakharova AA, Pathak D. Glutathione in Brain Disorders and Aging. *Molecules*. 2022;27(1):1–13.
69. Lu C, Wu C, Ghoreishi D, Chen W, Wang L, Damm W, et al. OPLS4: Improving force field accuracy on challenging regimes of chemical space. *J Chem Theory Comput* [Internet]. 2021 Jul 13 [cited 2023 Jan 4];17(7):4291–300. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jctc.1c00302>
70. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2000 Jan 1 [cited 2023 Jan 4];28(1):235–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10592235/>
71. Madhavi Sastry G, Adzhigirey M, Day T, Annabhimoju R, Sherman W. Protein and ligand preparation: parameters, protocols, and influence on virtual screening enrichments. *J Comput Aided Mol Des* [Internet]. 2013 [cited 2023 Jan 4];27(3):221–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23579614/>
72. Friesner RA, Murphy RB, Repasky MP, Frye LL, Greenwood JR, Halgren TA, et al. Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J Med Chem* [Internet]. 2006 Oct [cited 2023 Jan 4];49(21):6177–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17034125/>
73. Kumari V, Ji, X. Crystal structure of hGSTA1-1 complexed with GSH and MPD in each subunit. 2017.
74. Tars K, Olin B, Mannervik B. Structural basis for featuring of steroid isomerase activity in alpha class glutathione transferases. *J Mol Biol*. 2010;397(1):332–40.
75. Gu Y, Guo J, Pal A, Pan SS, Zimniak P, Singh SV, et al. Crystal structure of human glutathione S-transferase A3-3 and mechanistic implications for its high steroid isomerase activity. *Biochemistry*. 2004;43(50):15673–9.


76. Li J, Xia Z, Ding J. Thioredoxin-like domain of human kappa class glutathione transferase reveals sequence homology and structure similarity to the theta class enzyme. *Protein Sci.* 2005;14(9):2361-9.
77. Patskovsky YV, Patskovska, L.N., Listowsky, I., Almo, S.C. Human Glutathione S-Transferase M1A-1A Catalyzes Formation of Gsh-Metal Complexes. 2005.
78. Patskovsky Y, Patskovska, L.N., Almo, S.C., Listowsky, I. Structural Perturbation of the Active Site of Human Glutathione-S-Transferase M2-2 Upon Ligand Binding. 2004.
79. Saisawang C, Wongsantichon J, Robinson RC, Ketterman AJ. Glutathione transferase Omega 1-1 (GSTO1-1) modulates Akt and MEK1/2 signaling in human neuroblastoma cell SH-SY5Y. *Proteins.* 2019;87(7):588-95.
80. Zhou H, Brock J, Liu D, Board PG, Oakley AJ. Structural insights into the dehydroascorbate reductase activity of human omega-class glutathione transferases. *J Mol Biol.* 2012;420(3):190-203.
81. Oakley AJ, Lo Bello M, Battistoni A, Ricci G, Rossjohn J, Villar HO, et al. The structures of human glutathione transferase P1-1 in complex with glutathione and various inhibitors at high resolution. *J Mol Biol.* 1997;274(1):84-100.
82. Patskovsky Y, Toro, R., Bhosle, R., Hillerich, B., Seidel, R.D., Washington, E., Scott Glenn, A., Chowdhury, S., Evans, B., Hammonds, J., Imker, H.J., Al Obaidi, N., Stead, M., Love, J., Gerlt, J.A., Armstrong, R.N., Almo, S.C. Crystal Structure of Human .
83. Mizohata E, Morita, S., Kinoshita, Y., Nagano, K., Uda, H., Uchikubo, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S. Crystal structure of glutathione transferase zeta 1-1 (maleylacetoacetate isomerase) from *Mus musculus* (form-1 crystal). 2005.
84. Thulasingam M, Orellana L, Nji E, Ahmad S, Rinaldo-Matthis A, Haeggstrom JZ. Crystal structures of human MGST2 reveal synchronized conformational changes regulating catalysis. *Nat Commun.* 2021;12(1):1728.
85. Karplus PA, Schulz GE. Substrate binding and catalysis by glutathione reductase as derived from refined enzyme: substrate crystal structures at 2 Å resolution. *J Mol Biol.* 1989;210(1):163-80.
86. Polekhina G, Board PG, Gali RR, Rossjohn J, Parker MW. Molecular basis of glutathione synthetase deficiency and a rare gene permutation event. *EMBO J.* 1999;18(12):3204-13.
87. Rinschen MM, Ivanisevic J, Giera M, Siuzdak G. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2023 Jan 6];20(6):353. Available from: [/pmc/articles/PMC6613555/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35313555/)
88. Chetwynd AJ, Dunn WB, Rodriguez-Blanco G. Collection and Preparation of Clinical Samples for Metabolomics. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2023 Jan 6];965:19–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28132175/>

89. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 2001;360(Pt 1):1-16.
90. Le Trong I, Stenkamp RE, Ibarra C, Atkins WM, Adman ET. 1.3-A resolution structure of human glutathione S-transferase with S-hexyl glutathione bound reveals possible extended ligandin binding site. *Proteins.* 2002;48(4):618-27.
91. Nieslanik BS, Atkins WM. The catalytic Tyr-9 of glutathione S-transferase A1-1 controls the dynamics of the C terminus. *J Biol Chem.* 2000;275(23):17447-51.
92. Hutchinson MR, Somogyi AA. Diacetylmorphine degradation to 6-monoacetylmorphine and morphine in cell culture: Implications for in vitro studies. *Eur J Pharmacol.* 2002;453(1):27-32.
93. Morgan JK, Walther SK, Lane ME. Evaluation of a Mobile Application to Decrease Opioid Misuse and Habit-Forming Behaviors Following Prescription: Preliminary Results and Future Directions. *Psychology.* 2019;10(15):2019-25.
94. Cemek M, Büyükkuroğlu ME, Hazman Ö, Konuk M, Bulut S, Birdane YO. The Roles of Melatonin and Vitamin E Plus Selenium in Prevention of Oxidative Stress Induced by Naloxone-Precipitated Withdrawal in Heroin-Addicted Rats. *Biol Trace Elem Res* [Internet]. 2011 [cited 2023 Jan 3];142(1):55-66. Available from: <https://avesis.akdeniz.edu.tr/yayin/8b8e8094-2464-40c6-94bb-5db25cb09883/the-roles-of-melatonin-and-vitamin-e-plus-selenium-in-prevention-of-oxidative-stress-induced-by-naloxone-precipitated-withdrawal-in-heroin-addicted-rats>
95. Evans CJ, Cahill CM. Neurobiology of opioid dependence in creating addiction vulnerability [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research.* 2016;5(0):1-11.
96. Asia S, Asia S, Asia S, Asia S. *Opium/Heroin.* 2009.
97. Salarian A, Kadkhodae M, Zahmatkesh M, Seifi B, Bakhshi E, Akhondzadeh S, et al. Opioid use disorder induces oxidative stress and inflammation: The attenuating effect of methadone maintenance treatment. *Iran J Psychiatry.* 2018;13(1):46-54.
98. Gutowicz M, Kaźmierczak B, Barańczyk-Kuźma A. The influence of heroin abuse on glutathione-dependent enzymes in human brain. *Drug Alcohol Depend.* 2011;113(1):8-12.
99. Cunha-Oliveira T, Rego AC, Oliveira CR. Oxidative Stress and Drugs of Abuse: An Update. 2013;10:0-000.
100. Tong J, Fitzmaurice PS, Moszczynska A, Rathitharan G, Ang LC, Meyer JH, et al. Normal glutathione levels in autopsied brain of chronic users of heroin and of cocaine. *Drug Alcohol Depend* [Internet]. 2018;190:20-8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2018.05.021>

101. Pan X, Song Z, Zhai L, Li X, Zeng X. Oxidative stress in heroin administered mice and natural antioxidants protection. *Life Sci* [Internet]. 2005 [cited 2023 Jan 3];77(2):183–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15862603/>
102. Cunha-oliveira T, Rego AC, Oliveira CR. Oxidative Stress and Drugs of Abuse : An Update. 2013;2.
103. Gómez-Lechón MJ, Ponsoda X, Jover R, Fabra R, Trullenque R, Castell J V. Hepatotoxicity of the opioids morphine, heroin, meperidine, and methadone to cultured human hepatocytes. *Mol Toxicol*. 1987;1(4):453–63.
104. Panchenko LF, Pirozhkov S V., Nadezhdin A V., Baronetz VY, Usmanova NN. [Lipid peroxidation, peroxy radical-scavenging system of plasma and liver and heart pathology in adolescence heroin users]. *Vopr Med Khim*. 1999 Nov 1;45(6):501–6.
105. Soykut B. Oxidative Stress enzyme status and frequency of micronuclei in heroin addicts in Turkey. *Toxicol Mech Methods*. 2013;
106. Kotan VO, Yilmaz FM, Neselioglu S, Erel O, Okay IT, Kiral S, et al. Thiol/disulphide homeostasis in men with heroin addiction. *Dusunen Adam - J Psychiatry Neurol Sci*. 2017;30(2):95–100.
107. Sheweita SA. Narcotic drugs change the expression of cytochrome P450 2E1 and 2C6 and other activities of carcinogen-metabolizing enzymes in the liver of male mice. *Toxicology*. 2003;191(2–3):133–42.
108. Saify K, Saadat I, Saadat M. Down-regulation of antioxidant genes in human SH-SY5Y cells after treatment with morphine. *Life Sci* [Internet]. 2016;144:26–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.11.014>
109. McClure EA, Gipson CD, Malcolm RJ, Kalivas PW, Gray KM. Potential role of N-acetylcysteine in the management of substance use disorders. *CNS Drugs*. 2014;28(2):95–106.
110. Ghanbari R, Li Y, Pathmasiri W, McRitchie S, Etemadi A, Pollock JD, et al. Metabolomics reveals biomarkers of opioid use disorder. *Transl Psychiatry* [Internet]. 2021;11(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-021-01228-7>
111. Li YY, Ghanbari R, Pathmasiri W, McRitchie S, Poustchi H, Shayanrad A, et al. Untargeted Metabolomics: Biochemical Perturbations in Golestan Cohort Study Opium Users Inform Intervention Strategies. *Front Nutr*. 2020;7(December):1–14.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması Orijinallik Raporu



Digital Receipt

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Silan Catak
Assignment title: silan catak yilans
Submission title: silan catak yilans
File name: turnitin_silan_catak.pdf
File size: 2.57M
Page count: 101
Word count: 18,512
Character count: 124,762
Submission date: 11-Jan-2023 04:43PM (UTC+0300)
Submission ID: 1991216247

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ERONİN GLUTATYON METABOLİZMASI ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN METABOLOMİK DÜZEYDE ARASTIRILMASI

Doç. Dr. Silan CATAK

Toksikoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2023

Copyright 2023 Turnitin. All rights reserved.

EK-2: Orijinallik Raporu

silan catak ylisans

ORIGINALITY REPORT

| | | | |
|------------------|------------------|--------------|----------------|
| 5% | 5% | 0% | 3% |
| SIMILARITY INDEX | INTERNET SOURCES | PUBLICATIONS | STUDENT PAPERS |

PRIMARY SOURCES

| | | |
|----------|--------------------------------------|-----------|
| 1 | Submitted to Inonu University | 3% |
| | Student Paper | |
| 2 | narkotik.pol.tr | 2% |
| | Internet Source | |

Exclude quotes On
Exclude bibliography On

Exclude matches < 2%

9. ÖZGEÇMİŞ

