



**4F-MDMB-BUTICA'NIN TERATOJENİK
ETKİLERİNİN VE TOKSİKOGENOMİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Berşan KULLEBİ

Danışman: Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

2025

(Her hakkı saklıdır.)

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI

**4F-MDMB-BUTICA'NIN TERATOJENİK ETKİLERİNİN VE TOKSİKOGENOMİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

(The Investigation of Teratogenic Effects and Toxicogenomic Properties of 4F-MDMB-BUTICA)

Yüksek Lisans Tezi

Berşan KULLEBİ

Danışman: Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN

Erzurum
Eylül, 2025



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Natural and
Applied Sciences

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü
TEZ KABUL VE ONAY TUTANAĞI

**4F-MDMB-BUTICA'NIN TERATOJENİK ETKİLERİNİN VE TOKSİKOGENOMİK
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN danışmanlığında, Berşan KULLEBİ tarafından hazırlanan bu çalışma, 2/09/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (.../...)** ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Doç. Dr. Elanur AYDIN KARATAŞ <i>Erzurum Teknik Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Buket BAKAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı ıslak imzalıdır

Enstitü Yönetim
Kurulunun .../.../....
tarih ve sayılı
kararı.

Bu tezin Atatürk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddelerinde belirtilen şartları yerine getirdiğini onaylarım.

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi bilimsel araştırma projeleri kapsamında desteklenmiştir.

Proje No: FCD-2023-13221

Prof.Dr. Alper NUHOĞLU
Enstitü Müdürü
Aslı ıslak imzalıdır

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek lisans Tezi olarak *Prof. Dr. Turgay Şişman* danışmanlığında sunulan “**4F-MDMB-BUTICA'nın Teratojenik Etkilerinin ve Toksikogenomik Özelliklerinin Araştırılması**” başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	13	30
Kuramsal Temeller	9	30
Materyal ve Metot	11	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	8	20
Sonuçlar	9	20
Tezin Geneli	9	25

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
Berşan KULLEBİ	Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN
02.09.2025	02.09.2025
İmza: Aslı Islak İmzalıdır	İmza: Aslı Islak İmzalıdır

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

☐ Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

☒ Enstitü Yönetim Kurulunun/.../.... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu yüksek lisans tez çalışması, Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Araştırma Laboratuvarı ve Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi ve Histolojisi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiş ve FCD-2023-13221 numaralı BAP projesi kapsamında Atatürk Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

Öncelikle, tez sürecimde bana her zaman rehberlik eden, bilgi ve tecrübesiyle ufkumu genişleten, en zor anlarımda bile anlayışı ve desteğiyle yanımda olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN'a sonsuz teşekkür ediyorum. Kendisi sadece akademik olarak değil, insani yaklaşımı ve yol göstericiliği ile bana ilham verdi.

Araştırmada kullanılan zebra balığı embriyolarının temininde yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN ve Dr. Öğr. Üyesi Ekrem SULUKAN'a, moleküler çalışmalar sırasında desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Özkan AKSAKAL, Doç. Dr. Cihan GÜR ve Arş. Gör. Ömercan ALAT'a da içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu zorlu süreçte yanımda olan, moral ve motivasyon desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tüm arkadaşlarıma gönülden teşekkür ederim.

Son olarak, her zaman yanımda olan, sabır ve sevgisiyle bana her zaman bana destek veren sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Berşan KULLEBİ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

4F-MDMB-BUTICA'NIN TERATOJENİK ETKİLERİNİN VE TOKSİKOGENOMİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Berşan KULLEBİ

Danışman: Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN

Amaç: Sentetik kannabinoidlerin embriyotoksik, teratojenik ve toksikogenomik etkileri hakkında detaylı çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada yeni nesil sentetik kannabinoid olan 4F-MDMB-BUTICA'nın olası embriyotoksik, teratojenik, davranışsal ve moleküler etkileri zebra balığı embriyoları kullanarak değerlendirmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Zebra balığı embriyoları döllenmeden sonraki 3 ile 24 saat (akut), 3 ile 120 saat (subakut) arasında 0,15, 0,30, 0,60, 1,20, 2,40 ve 4,80 mg/L dozlarında 4F-MDMB-BUTICA'ya maruz bırakılmıştır. Çalışmada gelişimsel farklılıklar, morfolojik değişimler, koryondan çıkma, larva hareketliliği ve canlılık gibi parametreler değerlendirilmiştir. Ayrıca apoptoz, davranış ve nörotransmisyonla ilişkili 19 genin transkript düzeyleri qPCR uygulanarak toksikogenomik bir yaklaşımla analiz edilmiştir.

Bulgular: Akut maruziyetten sonra embriyolarda herhangi bir gelişimsel anormallik ve ölüm gözlenmemiştir. Subakut (120 saat) 4F-MDMB-BUTICA maruziyeti sonunda canlılık ve anormallik üzerinden LC_{50} değeri 1,932 ve EC_{50} değeri 0,960 mg/L olarak hesaplanmıştır. Subletal dozlarda 4F-MDMB-BUTICA ayrıca omurga oluşumu, perikardiyal ödem, bozulmuş kan akışı, yumurta kesesi ödemi ve gelişimde gerileme gibi embriyonik deformasyonlara neden olmuştur. Ayrıca canlı kalan larvalarda uyarana yanıt olarak hipoaktivite gözlenmiştir. qPCR analizlerine göre subakut kannabinoid maruziyeti apoptoz (*casp3a*, *casp8*, *ifng1* ve *tp53*), DNA onarımı (*rad51*), dopamin (*dat*, *drd1* ve *drd3*), serotonin (*5ht1aa*, *5ht1a*, *5ht1b* ve *5ht2c*), gama aminobütirik asit (*gabral*, *gat1*, *abat* ve *gad1b*) ve davranışla (*gnrh3*, *gnrhr3* ve *kiss2*) ilişkili genlerin transkripsiyonel ifade seviyelerini değiştirmiştir. Bu bileşiğin belirtilen genlerle ilgili toksikogenomik özellikleri ilk kez bu çalışma ile sunulmuştur.

Sonuç: Bu sonuçlar 4F-MDMB-BUTICA'nın zebra balığı embriyolarında normal gelişim ve nörodavranışsal programlamaya müdahale ettiğini, toksikogenomik etkisini ve erken omurgalı gelişimine yönelik potansiyel bir risk teşkil ettiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: 4F-MDMB-BUTICA, teratojenite, sentetik kannabinoid, zebra balığı, gen ifadesi, toksikogenomik.

Eylül 2025, 103 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

THE INVESTIGATION OF TERATOGENIC EFFECTS AND TOXICOGENOMIC PROPERTIES OF 4F-MDMB-BUTICA

Berşan KULLEBİ

Supervisor: Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN

Purpose: Detailed studies on the embryotoxic, teratogenic, and toxicogenomic effects of synthetic cannabinoids are quite limited. This study aimed to evaluate the potential embryotoxic, teratogenic, behavioral, and molecular effects of a new-generation synthetic cannabinoid, 4F-MDMB-BUTICA, using zebrafish embryos.

Method: Zebrafish embryos were exposed to 4F-MDMB-BUTICA at concentrations of 0.15, 0.30, 0.60, 1.20, 2.40, and 4.80 mg/L during acute (3–24 hours post-fertilization) and subacute (3–120 hours post-fertilization) exposure periods. Developmental alterations, morphological changes, hatching, larval locomotor activity, and viability parameters were assessed. In addition, the transcript levels of 19 genes associated with apoptosis, behavior, and neurotransmission were analyzed via qPCR using a toxicogenomic approach.

Results: No developmental abnormalities or mortality were observed following acute exposure. After subacute exposure to 4F-MDMB-BUTICA (up to 120 hours), the LC₅₀ and EC₅₀ values based on viability and malformations were calculated as 1.932 mg/L and 0.960 mg/L, respectively. Sublethal doses of 4F-MDMB-BUTICA also induced embryonic deformities such as spinal malformation, pericardial edema, impaired blood circulation, yolk sac edema, and developmental delay. Furthermore, surviving larvae exhibited hypoactivity in response to stimuli. According to qPCR analysis, subacute cannabinoid exposure altered the transcriptional expression levels of genes related to apoptosis (*casp3a*, *casp8*, *ifng1*, and *tp53*), DNA repair (*rad51*), dopamine (*dat*, *drd1*, and *drd3*), serotonin (*5ht1aa*, *5ht1a*, *5ht1b*, and *5ht2c*), gamma-aminobutyric acid (*gabra1*, *gat1*, *abat*, and *gad1b*), and behavior (*gnrh3*, *gnrhr3*, and *kiss2*). The toxicogenomic properties of this compound in relation to these genes are reported here for the first time.

Conclusion: These findings indicate that 4F-MDMB-BUTICA interferes with normal development and neurobehavioral programming in zebrafish embryos, exhibits toxicogenomic effects, and poses a potential risk to early vertebrate development.

Keywords: 4F-MDMB-BUTICA, teratogenicity, synthetic cannabinoid, zebrafish, gene expression, toxicogenomic.

September 2025, 103 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	xii
GİRİŞ.....	1
KURUMSAL TEMELLER.....	3
Kannabinoidler	3
Kannabionidlerin tarihçesi	4
Kannabinodlerin kullanım alanları ve toksisitesi	6
Sentetik Kannabinoidler (SK)	10
Sentetik kannabinodlerin tarihçesi	12
Sentetik kannabinoidlerin kullanım alanı ve toksisitesi.....	14
4F-MDMB BUTICA.....	16
Model Organizma Olarak Zebra Balıkları	18
Zebra balıklarının ilaç araştırmalarında kullanımı	21
Zebra balıklarının kannabinoid toksisitesindeki kullanımı	23
Toksikogenomik Analiz İçin Seçilen Zebra Balığı Genleri	25
Apoptoz ile ilgili genler (<i>casp3a</i> , <i>casp8</i> , <i>ifng1</i> , <i>tr53</i>)	25
DNA tamiri ile ilgili gen (<i>rad51</i>).....	28
Dopamin sistemi ile ilgili genler (<i>dat</i> , <i>drd1</i> , <i>drd3</i>)	30
Serotonin ile ilgili genler (<i>5ht1aa</i> , <i>5ht1a</i> , <i>5ht1b</i> , <i>5ht2c</i>).....	31
GABA sistemi ile ilgili genler (<i>gabra1</i> , <i>gat1</i> , <i>abat</i> , <i>gad1b</i>)	34
Davranış ile İlgili Genler (<i>gnrh3</i> , <i>gnrhr3</i> , <i>kiss2</i>)	36
MATERYAL VE METOT	39
Kimyasallar ve Çözeltiler.....	39
Zebra Balığı Kültürü ve Embriyo Toplama	39
Balık Embriyosu Toksisite (FET) Testi	39

Davranışsal Analiz	41
Toksikogenomik Analiz	41
İstatistiksel Analiz	43
ARAŞTIRMA BULGULARI	44
Canlılık.....	44
Koryondan Çıkma Oranları.....	45
Morfometrik Analiz	46
Kalp Atış Hızı	47
Morfolojik Değişiklikler	47
Davranış Analizi.....	53
4F-MDMB-BUTICA'nın Gen Ekspresyon Düzeyleri Üzerindeki Toksikogenomik Etkileri.....	53
TARTIŞMA ve SONUÇ	59
Sonuçlar.....	65
KAYNAKLAR.....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	89

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. qPCR Analizi için Kullanılan Genler ve Tasarlanan Primerler.....	42
Tablo 2. Farklı Maruziyet Sürelerinde 4F-MDMB-BUTICA'nın Koryondan Çıkış Oranı (%) Üzerindeki Etkileri	45
Tablo 3. 4F-MDMB-BUTICA'nın 120 hpf Larvaların Vücut Uzunluğu ile Baş, Göz ve Perikardiyal Alanları Üzerindeki Etkileri.....	46
Tablo 4. 4F-MDMB-BUTICA'ya Maruz Bırakılan 48 ve 120 saatlik larvaların Kalp Atım Hızları (Dakikadaki Atım Sayısı).....	47
Tablo 5. 4F-MDMB-BUTICA Maruziyetinden Sonra 24–120 hpf'de Belirlenen Malformasyon Yüzdeleri.....	52
Tablo 6. 4F-MDMB-BUTICA'ya Maruz Bırakılan Zebra Balığı Embriolarının TER (Dokunmaya Tepki Yanıtı) Değerlendirmesi	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Delta-9 - tetrahidrokannabinol (THC) ve Kannabidiol'un (CBD) kimyasal yapısı (solda THC, sağda CBD)	5
Şekil 2. Anandamid (AEA) ve 2-Araşidonoygliserol (2-AG) moleküllerinin yapısı.....	6
Şekil 3. 4F-MDMB-BUTICA'nın kimyasal yapısı	18
Şekil 4. 4F-MDMB-BUTICA için LC ₅₀ (A) ve EC ₅₀ (B) değerlerinin hesaplanmasında kullanılan doz-yanıt eğrileri (güven aralığı %95)	44
Şekil 5. Farklı 4F-MDMB-BUTICA konsantrasyonlarına akut (A) ve subakut (B) maruz bırakılan zebra balığı larvalarının kümülatif canlılık oranları (%). Veriler ortalama ± standart hata şeklinde sunuldu (n=90). p<0,05 kontrol grubuna kıyasla.....	45
Şekil 6. Kontrol (A–C) ve maruziyet (D–F) gruplarına ait 120 hpf larvalarının morfometrik özellikleri. (A, D) Göz alanı ve perikardiyal alan, (B, E) baş alanı ve (C, F) larva boyu-vücut uzunluğu.....	46
Şekil 7. 48 hpf zebra balığı embriyolarının temsilci görüntüleri. (A) Kontrol grubu. (B) 0,60 mg/L uygulama grubu: zayıf pigmentasyon ve yumurta kesesinde dejenerasyon (ok). (C) 0,60 mg/L uygulama grubu: yumurta kesesi ödemi (ok). (D) 1,20 mg/L uygulama grubu: yumurta kesesinde birikmiş kırmızı kan hücreleri (ok). (E) 2,40 mg/L uygulama grubu: kıvrık kuyruk (ok). (F) 2,40 mg/L uygulama grubu: şiddetli baş deformasyonu (ok)	48
Şekil 8. 72 hpf zebra balığı larvalarının temsilci görüntüleri. (A) Kontrol grubu. (B) 0,60 mg/L uygulama grubu: lordoz (siyah ok), perikardiyal ödem (kırmızı ok) ve yumurta kesesinde konjesyon (birikmiş kırmızı kan hücreleri) (sarı ok). (C) 1,20 mg/L uygulama grubu: göz küçülmesi (kırmızı ok), perikardiyal ödem (siyah ok) ve kısalmış vücut uzunluğu (sarı ok). (D) 1,20 mg/L uygulama grubu: zayıf pigmentasyonlu koryondan çıkmamış larva. (E) 2,40 mg/L uygulama grubu: şiddetli vücut deformasyonu; ödemler, kısa omurga, kıvrık kuyruk (kırmızı ok) ve baş oluşumunun olmaması (siyah ok) gösterilmiştir.....	49
Şekil 9. 96 hpf zebra balığı larvalarının temsilci görüntüleri. (A) Kontrol grubu (yan görünüm). (B) 1,20 mg/L uygulama grubu: kısalmış vücut uzunluğu (sarı ok), yumurta kesesi deformasyonu (siyah ok), göz küçülmesi ve anormal baş oluşumu (kırmızı ok). (C) 0,6 m g/L uygulama grubu: hafif lordoz (ok). (D)	

1,20 mg/L uygulama grubu: şiddetli lordoz (siyah ok), göz küçülmesi (kırmızı ok). (E) 2,40 mg/L uygulama grubu: kısalmış vücut uzunluğu (mavi ok), şiddetli yumurta kesesi ödemi (kırmızı ok) ve perikardiyal ödem (siyah ok). (F) 1,20 mg/L uygulama grubu: hafif lordoz (siyah ok), yumurta kesesi deformasyonu (kırmızı ok) ve şiddetli perikardiyal ödem (mavi ok). (G) 2,40 mg/L uygulama grubu: kısalmış vücut uzunluğu ve omurga deformasyonu (siyah ok), yumurta kesesi deformasyonu (mavi ok), göz deformasyonu (sarı ok) ve göğüs yüzgeci deformasyonu (kırmızı ok) gösterilmiştir 50

Şekil 10. 120 hpf zebra balığı larvalarının temsilci görüntüleri. (A) Kontrol grubu (yan görünüm), şişmiş yüzme kesesi (ok). (B) Kontrol grubu (dorsal görünüm), göğüs yüzgeci (kırmızı ok) ve yüzme kesesi (siyah ok). (C) 1,20 mg/L uygulama grubu: bölünmüş yumurta kesesi (siyah ok) ve şişmemiş yüzme kesesi (mavi ok). (D) 2,40 mg/L uygulama grubu: gelişimsel gerileme, şişmemiş yüzme kesesi (mavi ok), perikardiyal ödem (kırmızı ok) ve ciddi lordoz (siyah ok). (E) 0,60 mg/L uygulama grubu: şişmemiş yüzme kesesi (ok). (F) 1,20 mg/L uygulama grubu: şişmemiş yüzme kesesi (mavi ok) ve hafif eğrilmiş kuyruk (siyah ok). (G) 1,20 mg/L uygulama grubu: gelişimsel gerileme ve yumurtadan çıkmamış larva. (H) 2,40 mg/L uygulama grubu: gelişimsel gerileme, yumurta kesesi ödeme sahip yumurtadan çıkmamış larva (ok) ve zayıf pigmentasyon yer almaktadır 51

Şekil 11. 120 hpf'de zebra balığı larvalarında apoptoz (A) ve DNA onarımı (B) ile ilişkili genlerin ifadesi üzerine 4F-MDMB-BUTICA'nın etkileri. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir (n=25). $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ kontrol grubuna kıyasla aradaki farkın önemli olduğunu göstermektedir 55

Şekil 12. 120 hpf'de zebra balığı larvalarında GABA ile ilişkili genlerin ifadesi üzerine 4F-MDMB-BUTICA'nın etkileri. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir (n=25). $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ kontrol grubuna kıyasla aradaki farkın önemli olduğunu göstermektedir. 56

Şekil 13. 120 hpf'de zebra balığı larvalarında serotonin ile ilişkili genlerin ifadesi üzerine 4F-MDMB-BUTICA'nın etkileri. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir (n=25). $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$ kontrol grubuna kıyasla aradaki farkın önemli olduğunu göstermektedir 57

Şekil 14. 120 hpf'de zebra balığı larvalarında dopamin (A) ve davranış (B) ile ilişkili genlerin ifadesi üzerine 4F-MDMB-BUTICA'nın etkileri. Veriler ortalama $\pm$

standart sapma olarak gösterilmiştir (n=25). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 1
kontrol grubuna kıyasla aradaki farkın önemli olduğunu göstermektedir.....58



KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

2-AG	: 2-araşidonoil-gliserol
5-HT	: 5-hidroksitriptamin (Serotonin)
ACMD	: Uyuşturucu Madde Kötüye Kullanımı Danışma Konseyi
AEA	: N-araşidonoiletanolamin veya Anandiamid
CB1	: Kannabinid reseptörü tip-1
CB2	: Kannabinoid reseptörü tip-2
CBD	: Kannabidiol
ECS	: Endokannabinoid sistem
EUDA	: Avrupa Birliği Uyuşturucular Ajansı
FDA	: Gıda ve İlaç Geliştirme Dairesi
GABA	: Gama amino bütirik asit
hpf	: Döllenmeden sonraki saat (hours post fertilization)
NPS	: Yeni psikoaktif Maddeler (New Psychoactive Substance)
THC	: Delta-9-Tetrahidrokannabinol

GİRİŞ

Yeni psikoaktif maddeler (NPS), esrar, kokain, eroin, LSD, MDMA (ekstazi) veya metamfetamin gibi uluslararası olarak kontrol edilen maddelere benzer etkilere sahiptir. Kasım 2023 itibarıyla, dünyanın tüm bölgelerinden 141 ülke ve bölge tarafından UNODC'ye 1230 NPS bildirilmiştir. NPS'ler, Uluslararası Uyuşturucu Kontrol Sözleşmeleri kapsamında kontrol edilmemektedir ve yasal durumları ülkeden ülkeye önemli ölçüde değişmektedir. 2022 yılına kadar 67 ülke ve bölge, NPS'leri kontrol etmek için yasal müdahalelerde bulunmuştur. Birçok farklı NPS'nin hızla ortaya çıktığı ülkelerde, "kimyasal benzerlik" ilkesi öne sürülmüş ve analog maddeler kontrol altına alınmaya başlanmıştır. Uluslararası düzeyde, Narkotik Uyuşturucular Komisyonu, Mart 2023'e kadar 78 NPS'yi uluslararası denetime tabi tutma kararı almıştır (Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi, UNODC 2024). NPS'lerin ana gruplarından biri sentetik kannabinoidlerdir (SK). SK'lerin bilinen en önemli özellikleri, delta-9-tetrahidrokannabinol (THC) gibi etki göstermeleri ve endokannabinoid reseptörlerini uyarmalarıdır (Seely *et al.* 2012). Bu bileşiklerin toksik etkilerinin oldukça farklı olmasının nedeni, dört alt birimden (halka, bağlayıcı, çekirdek ve kuyruk) oluşmaları ve çok farklı kombinasyonlara sahip olmalarıdır (EUDA 2017). Özellikle akut ve kronik maruziyetin etkileri bilim camiası tarafından sıklıkla incelenmektedir. SK'ler için bildirilen başlıca yan etkiler psikoz, ajitasyon, sinirlilik, paranoya, konfüzyon, anksiyete, halüsinasyonlar, sanrılar, deliryum, kendine zarar verme, taşikardi, hipertansiyon, aritmi, göğüs ağrısı, taşipne, gastrointestinal sıkıntı, akut böbrek hasarı, bulantı, kusma, ateş, hiperglisemi, hipokalemi ve ölümdür (Cohen and Weinstein 2018; Gurney *et al.* 2014; Logan *et al.* 2017). Yeni nesil sentetik kannabinoidlerin toksisitesi yeterince araştırılmamıştır ve büyük ölçüde bilinmemektedir (Morales-Noé *et al.* 2022).

4F-MDMB-BUTICA (4F-MDMB-BICA, 4F-MDMB-2201, 4FBC veya 4FBCA), EUDA (2020) tarafından resmi olarak bir NPS olarak bildirilmiştir. Bu sentetik kannabinoid, bitkisel karışımlarda ve buharlaştırma solüsyonlarında tespit edilmiş ve kğıda enjekte edilmiştir (EUDA 2020). 4F-MDMB-BICA, bitki materyaline püskürtüldükten sonra sigara olarak veya buharlaştırılarak tüketilir (WHO 2021). 4FMDMB-BICA, sigara olarak kullanılmak üzere tasarlanmış bitkisel karışımlar, buharlaştırma için formüle edilmiş sıvılar ve kimyasal olarak enjekte edilmiş kağıt gibi materyallerde tespit edilmiştir. 4F-MDMB-BICA, Avrupa uyuşturucu pazarında ilk olarak Mart 2020'de Belçika yetkilileri (Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi, EMCDDA ve Europol 2020) tarafından ele geçirildiğinde ortaya

çıkmiştir. Mayıs 2020'de Amerika Birleşik Devletleri'nde de tespit edilen madde, toksikoloji trend raporlarına dahil edildi (Adli Bilimler Araştırma ve Eğitim Merkezi, CFSRE 2021). Zehirlenme için gereken doz belirsizdir. Kannabinoidin bağımlılık potansiyeli, kötüye kullanım potansiyeli ve klinik öncesi değerlendirmesi insanlarda ve hayvanlarda incelenmemiştir (WHO 2021). 4F-MDMB-BICA'nın akut ve kronik toksisitesi hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır. Mevcut bilgiler, bu bileşiğin sağlık risklerinin diğer SK'lerde gözlemlenenlere benzer olabileceğini düşündürmektedir. Diğer yandan, 4F-MDMB-BICA'nın aşırı dozundan kaynaklanan yan etkiler arasında gastrointestinal, nörolojik, şiddetli merkezi sinir sistemi depresyonu, kardiyovasküler ve renal klinik özellikler ve solunum depresyonu sayılabilir (EUDA 2020). 4F-MDMB-BICA'nın embriyotoksik etkileri henüz araştırılmamıştır.

SK'lerin embriyotoksik etkileri üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır. SK'lerin toksik etkileri, zebra balığı hariç diğer omurgalı hayvan modelleri kullanılarak araştırılmıştır. (Gustafsson and Jacobsson 2019; Markin *et al.* 2021; Psychoyos *et al.* 2008). Zebra balığı (*Danio rerio*), bu tür çalışmalar için ideal bir model organizmadır. Zebra balıkları yüksek doğurganlığa, şeffaf embriyolara ve küçük boyutlara sahiptir ve bakımı kolaydır. Ayrıca, opioidler (Basnet *et al.* 2019) ve bağımlılık yapan maddeler (Cassar *et al.* 2020) gibi nöroaktif ilaç maruziyetinin davranışsal etkileri üzerine yapılan çalışmalarda da kullanılmıştır. Zebra balıkları önemli genetik, genomik ve gelişimsel biyoloji kaynaklarına sahiptir. Zebra balıkları, insan genomundaki genlerle %70'ten fazla ortak gen paylaşır ve bilinen insan hastalık genlerinin %80'inden fazlasının zebra balıklarında ortak genleri vardır (Howe *et al.* 2013). Ayrıca, zebra balığı embriyo gelişimi insan gelişimine benzerdir (Lieschke and Currie 2007) ve zebra balığı, tüm hayvanın davranışsal tepkisini ölçmek için yararlı bir araçtır (Audira *et al.* 2020). Gen ifadesi düzeyindeki moleküler değişiklikler, kimyasalların etki mekanizmasını belirlemek için kullanılabilir (Nilén *et al.* 2024).

Son yıllarda, gen ekspresyon profillerini olumsuz fenotipik sonuçlarla ilişkilendiren toksikogenomik yaklaşımlar, gelişim sürecinde kimyasal toksisitenin mekanistik olarak değerlendirilmesinde önem kazanmıştır (Meier *et al.* 2025). Transkriptomik verileri klasik toksikolojik parametrelerle entegre eden toksikogenomik analizler, sentetik kannabinoidler gibi maddelerin biyolojik yolları moleküler düzeyde nasıl bozduğunu açıklamaya yardımcı olur. Bu nedenle, sentetik kannabinoidin gelişim üzerindeki olası olumsuz etkileri zebra balığı embriyoları kullanılarak araştırılması oldukça yeni ve güncel bir araştırma stratejisidir. Bu tez kapsamında, 4F-MDMB-BUTICA'nın farklı konsantrasyonlarına kısa ve uzun süreli maruziyetin zebra balığı embriyo gelişimi, larva davranışı ve belirli olumsuz sonuçlarla ilişkili 19 gen üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

KURUMSAL TEMELLER

Kannabinoidler

Yapısı ve kökeni ne olursa olsun vücut ve beyinde bulunan “Kannabinoid reseptörleri” olarak bilinen reseptörlere bağlanarak, *Cannabis sativa* bitkisinin kullanımıyla gözlemlenen etkilerin aynısı veya benzer biyolojik etkileri gösteren maddelerin hepsine “Kannabinoid” denir (Alves, 2020). Kannabinoid reseptörleri tip-1 (CB1) ve tip-2 (CB2) olmak üzere iki G-proteini bağlı reseptörlerdir (Marzo and Piscitelli, 2015). Hint kenevir (*Cannabis sativa*) bitkisinin yapraklarının işlenerek tüketilen kannabis maddesi dünyada en çok tüketilen uyuşturucu maddedir (Tellioğlu and Tellioğlu, 2012). Kannabis toplum arasında esrar ve marujana olarak bilinir. Kannabinoidler genellikle benzopiran iskeletine sahip, aromatik halkalara bağlı yan zincir içeren ve 21 karbon atomu bulunduran trisiklik bileşiklerdir. Polar olmayan yapıda olup lipofilik özellik gösterirler (Laaboudi, *et al.* 2024).

Kannabinoidler yapısı ve kökenine göre temelde üç gruba ayrılabilir. Bunlar; fitokannabinoidler, sentetik kannabinoidler ve endokannabinoidlerdir (Schurman *et al.* 2020), *Cannabis* türü bitkilerde (*Cannabis sativa*, *cannabis indica* ve *cannabis rudelasis*) 100'den fazla kannabinoid izole edilmiştir. Bu kannabinoidlerin en önemli ve bilineni; Delta-9-Tetrahidrokannabinol (THC) ve Kannabidiol (CBD) dir (Blebea *et al.* 2024). TCH ve sentetik kannabinoidler gibi psikoaktif bileşikler kannabinoid reseptörleri aracılığıyla ödül sistemiyle etkileşime girerek bağımlılık yapıcı özellik gösterirler (Spanagel, 2020). N-araşidonoiletanolamin (Anandamid, AEA) ve 2-araşidonoil-gliserol (2-AG) bilinen endokannabinoidlerdir ve kannabinoid reseptörlerinin endojen ligandlarıdır. (Lachowicz *et al.* 2023). Endokannabinodler lipid yapıda olup bireylerin fizyolojik süreçlerinde ve davranışları üzerinde etkileri vardır (Behl *et al.* 2022).

Sentetik kannabinoidler ise özellikle THC'nin yapısı ve işlevini taklit ederek kannabinoid reseptörlerine daha fazla afinite gösteren ve düşük sentez maliyetine sahip maddelerdir (Wu *et al.* 2025). Sentetik kannabinoidler yeni psikoaktif bileşikler (NPS) grubunda olup endokannabinoid sistemini hedef alarak esrarın neden olduğu etkilerin benzerini daha yoğun bir şekilde gösterirler (Roque-Bravo *et al.* 2023).

Kannabionidlerin tarihçesi

Kannabioidler yüzlerce yıldır özellikle psikoaktif özellikleri sayesinde ön plana çıkan maddelerdir. Kannabinoidlerin bulunduğu *Cannabis* türü bitkiler ise psikoaktif özelliklerine ek olarak gıda olarak tüketilmekte, günlük kullanılan lif, kâğıt gibi araçların üretiminde ve tıbbi özellik barındırmaları sayesinde uzun yıllar boyunca farklı bölgelerde kullanılmışlardır. Bu çok yönlü kullanımına ek olarak ekonomik ve tıbbi önemi ile yüzyıllar boyunca kullanıldığı gibi günümüzde kullanılmakta ve büyük olasılıkla gelecekte de kullanılmaya devam etmesi beklenmektedir.

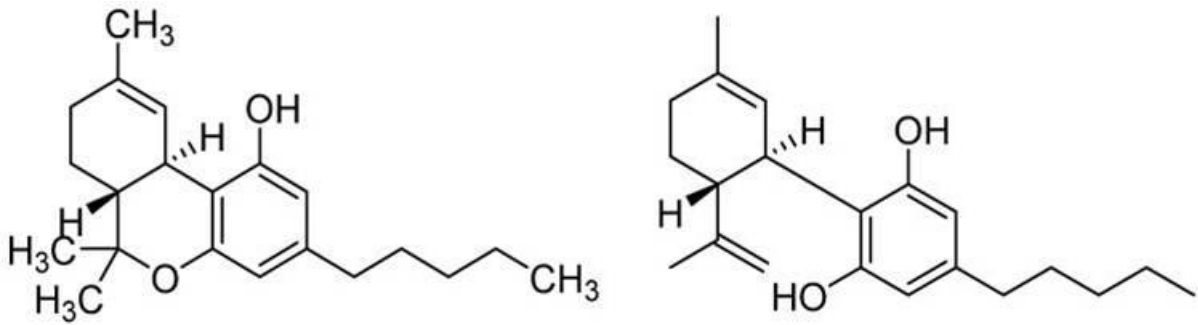
Fitokannabioidlerden olan kenevir bitkisinin varlığı Orta Asya'daki Altay Dağları yakınlarında 12.000 yıl öncesinde dayanmaktadır ve göçebe toplumların hareketliliğiyle birlikte dünyanın farklı bölgelerine yayılmıştır (Crocq, 2020). Kenevir bitkisi insanlar tarafından evcilleştirilmesi ve birçok iklime uyum göstermesi ile dünyaya yayılmıştır (Schurman *et al.* 2020). *Cannabis* yüzyıllardır lif, gıda, yağ, ilaç gibi günlük kullanımlarına ek olarak eğlence, dini ritüeller ve törenler gibi amaçlarla da kullanılmaktadır (Bonini *et al.* 2018). M.Ö. 4000 'de Çin'de bulunduğu bilinen *Cannabis*'in daha sonraki tarihlerde ilaç, tekstil ürünü, yiyecek gibi çeşitli amaçlar için kullanıldığı bilinmektedir. Daha sonraki zamanlarda orta ve batı Asya'ya ve özellikle Hindistan'a yayılmasıyla dini törenler ve eğlence verici amaçlar için kullanılmaya başlanmıştır (Zuardi, 2006). Hindistan'da bitkiye karşı kutsallık atfedilmesiyle kullanımı hızla yayılmış ve mutluluk kaynağı olarak kabul görmüştür (Pisanti and Bifulco, 2019). Bu sayede kenevir duyguları değiştiren, dini bir araç ve şifa verici bir bitkiye dönüşmüştür.

M.Ö. 1800 yıllarında Sümer ve Akad yazıtlarında kenevirin çeşitli rahatsızlık tedavisinde kullanıldığına dair ifadeler geçerken aynı dönemde Antik Mısır papirüslerinde ise ağrı kesici etkileri, enfeksiyonlar ve vajinal kasılmalar dahil olmak üzere çok sayıda durum için kullanıldığı geçmektedir (Friedman and Sirven, 2017). Mezopotamya'da *Cannabis* Asur ve Babil tabletlerinde ilaç olarak tanımlanmış, Antik Yunan ve Roma'da ise bu gelenek devam etmiştir. Orta çağ İslam dünyasında özellikle İbni Sina tarafından yazılan El-kanun fi't-Tıbb eserinde *Cannabis*'in gut, göz iltihabı ve jinekolojik rahatsızlıklar için tavsiye edildiği bilinmektedir (Pisanti and Bifulco, 2019).

Cannabis daha ileri dönemlerde Afrika'ya girmiştir. 13. yüzyılda Kenya ve Etiyopya'ya, 15. yüzyılda ise Güney Afrika'ya yayılarak yılan ısırığı, doğum, sıtma, ateş, dizanteri gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Daha sonra 1600'lerin başında kuzey Amerika'ya geçmiş ve psikoaktif özellikleri ve tedavilerdeki kullanımı sayesinde endüstriyel bir önem de kazanmıştır (Laaboudi *et al.* 2024).

19. yüzyılda William Brooke O'Shaughnessy *Cannabis* ile insanlar ve hayvanlar üzerinde deneyler yaparak bitkinin özellikle analjezik, kas gevşetici ve antikonvülsan etkilerini belgeleyerek tıbbi potansiyelini göstermiştir. Daha sonra bu özelliklerini Avrupa'ya tanıtmıştır. Aynı dönemde Fransız psikiyatrist Jacques-Joseph Moreau kenevirin psikoaktif etkilerini bilimsel yöntemler ile incelemiş ve bu sayede modern psikofarmakolojinin öncüsü kabul edilmiştir. Fransız psikiyatrist yaptığı bu çalışmalarla *Cannabis*'in hem sağlıklı bireyler hem de akıl hastaları üzerindeki etkilerini deneysel olarak analiz etmiş, özellikle iştah, uyku ve sakinleştirici etkilerini vurgulamıştır (Pisanti and Bifulco, 2019; Zuardi, 2006).

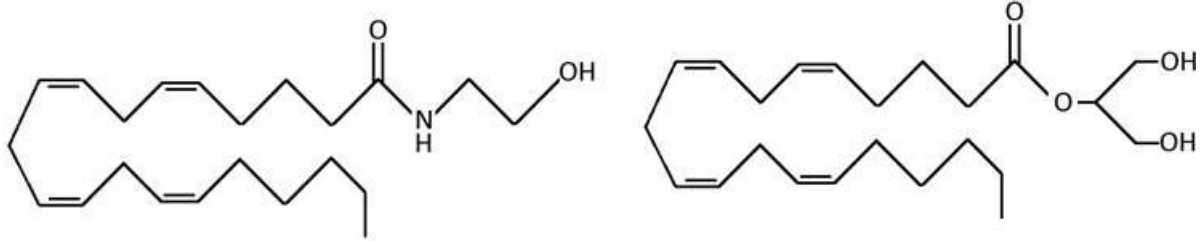
Fitokannabinoidlerin kimyasal yapısı ilk kez 1930-1940'lı yıllarda karakterize edilmiştir. Bu fitokannabinoidlerin en önemlilerinden biri olan THC'nin kimyasal yapısı ise 1964'te tanımlanmış ve sentezlenmiştir (Grotenhermen, 2003). 1963 yılında Profesör Raphael Mechoulam ve arkadaşları tarafından bir diğer önemli kannabinoid olan CBD'nin kimyasal yapısı tanımlanmıştır. Mechoulam bu keşiflerinden sonra esrar içerisindeki bileşikleri kullanarak maymunlar üzerinde deneyler yapmış ve bu maddeleri psikoaktif olarak tanımlamıştır. Daha sonra insanlara esrar bulunduran kekler oral yolla kullanılarak gerçekleştirilen deneyler ile gülme krizleri, panik ataklar ve tartışma hali gibi durumlar gözlemlenmiştir (Crocq, 2020). 1970'lerin başında yapılan çalışmalarla CBD'nin THC gibi psikoaktif özelliklerinin bulunmadığı anlaşılmış ve bu dönemde diğer kannabinoidlerin etkileri üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Crippa *et al.* 2018). Bu çalışmalar kannabinoidlerin dikkat çekmesine ve üzerinde daha fazla araştırmalar yapılmasına olanak sağlamıştır.



Şekil 1. Delta-9 - tetrahidrokannabinol (THC) ve Kannabidiol'un (CBD) kimyasal yapısı (solda THC, sağda CBD) (Jones and Vlachou, 2020).

İlk kannabinoid reseptörlerine dair bulgular 1984 yılında Howlett ve Flemming tarafından ortaya konmuştur (Hudson and Ramsey, 2011). Kannabinoid reseptörleri olan CB1 1988'de CB2 ise 1993 yılında keşfedilmiştir. (Johnson and Colby, 2023). Kannabinoidlerin etki ettiği bu spesifik reseptörler kannabinoidlerle etkileşime girerek etkilerini gösterdiği bulunmuştur. Bu keşif ile kannabinoid reseptörlerini aktive eden endojen ligandların araştırılmasına sebep olmuş ve bu moleküllere endokannabinoidler veya endojen

kannabinoidler olarak adlandırılmışlardır (Fraguas-Sánchez and Torres-Suárez, 2018). Endokannabinoidlerin yapısı THC ve CBD'nin kimyasal yapılarının keşfinden çok daha sonra gerçekleşmiştir. 1992 yılında ilk olarak anandamid (N-araşidonoiletanolamin, AEA) domuz beyninden izole edilmiştir. İkinci endokannabinoid olan 2-araşidonoil-gliserol (2-AG) ise köpek bağırsaklarından elde edilmiştir (Boisselier *et al.* 2017).



Şekil 2. Anandamid (AEA) ve 2-Araşidonoygliserol (2-AG) moleküllerinin yapısı (Barrie, *et al.* 2017)

Kannabinoidlerin yasal durumu uzun yıllar boyunca kültürel, politik ve bilimsel faktörlerden etkilenecek önemli değişiklikler geçirmiştir. 1930'lu yıllarda Amerika Birleşik Devletleri'nde yürütülen kampanyalar ile 1937 tarihli Marihuana Vergi Yasası ile bu esrarın kullanımına yönelik baskılar artmıştır (Martin, 2016). Bu yaklaşım, 1961 yılında Birleşmiş Milletler'in Tek Sözleşmesi ile küresel düzeyde pekişmiş ve *Cannabis*, yüksek kötüye kullanım potansiyeline sahip, tıbbi faydası sınırlı bir madde olarak sınıflandırılmıştır (United Nations, 1961). Tarihsel olarak THC ve CBD gibi kannabinoidlerin farmakolojik özelliklerinin bilimsel olarak daha iyi anlaşılmasıyla birlikte, pek çok ülke tıbbi kullanıma yönelik kısıtlamaları esnetme yoluna girmiştir (Kumar, *et al.* 2021). Örneğin, Kanada, Uruguay, bazı Avrupa ve ABD eyaletleri hem tıbbi hem de eğlence amaçlı kullanımı yasallaştırılmıştır (Abuhasira *et al.* 2018; Caulkins and Kilborn, 2019). Almanya, İtalya, İsviçre ve Çekya gibi Avrupa ülkeleri tıbbi kullanıma sınırlı da olsa izin verirken, Asya ülkelerinde genel olarak daha katı yasal yaklaşımlar benimsenmiştir. Bazı ülkelere ise son yıllarda tıbbi özellikleri ile esneklik sağlanmaya başlamıştır (Aguilar, 2018). Özellikle psikoaktif olmayan CBD gibi bileşikler THC'ye kıyasla daha fazla yasal olarak görülmektedir. Buna rağmen, global çapta kannabinoidlerin yasal statüsü hâlâ oldukça değişkendir ve ülkelere göre ciddi farklılıklar göstermektedir.

Kannabinodlerin kullanım alanları ve toksisitesi

Kannabinoidler endolannabinoid sistem üzerindeki etkileşimleriyle ve çeşitli farmakolojik etkileri sayesinde terapötik ve toksikolojik sonuçlar doğurabilirler. Bu çift yönlü etkileri, kullanım şekline ve dozuna bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Etkilerinin detaylıca araştırılması ve kontrollü bir şekilde yönlendirilmesi bu bileşiklerin potansiyellerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayarak önemli bir araştırma konusu haline gelmesini sağlayabilir.

En iyi bilinen ve üzerinde araştırılmalar yapılan fitokannabinoidler THC ve CBD'dir. Bu fitokannabinoidler etkilerini endokannabinoid sistemi (ECS) aracılığıyla gerçekleştirirler. ECS oluşturan endokannabinoidler, bunların metabolik enzimleri ve kannabinoid reseptörleri hafıza, ruh hali, açlık, ağrı ve nörogenez gibi birçok fizyolojik süreçte rol alırlar. Kannabinoidler yanıtları tetiklemek ve ECS aracılığıyla sinyal göndermek için kannabinoid reseptörleriyle etkileşime girerek dopamin, serotonin, gama-aminobütirik asit (GABA), asetilkolin, noradrenalin ve endojen opioidler gibi nörotransmitterlerin salınımını düzenlerler (Leinen *et al.* 2023). Kannabinoid reseptörleri G-protein bağlı reseptörlerdir. Endokannabinoidlerin CB1 reseptörlerine bağlanması adenil siklazın inhibisyonuna, kalsiyum kanallarının kapanmasına, potasyum kanallarının açılmasına ve protein kinazların uyarılmasına yol açar. CB2 reseptörlerinin endokannabinoidlerle etkileşimi ise nöromodöletör etkilere yol açar (Lachowicz *et al.* 2023). CB1 reseptörlerinin aktivasyonu dopamin nöronlarının ateşlenmesini GABA salınımını tetikleyerek artırırken, CB2 reseptörlerinin aktivasyonu bu ateşlemeyi azaltır. Bu nedenle CB2 reseptörleri psikiyatrik ve nörolojik bozukluklarla bağlantılı ve nöroprotektif etkilere sahip olabilir (Chen *et al.* 2017).

CB1 reseptörleri merkezi sinir sisteminde en bol miktarda bulunan G-proteinine bağlı reseptörlerdendir. Özellikle hipokampus, neokorteks, bazal gangliyonlar, serebellum ve beyin sapında yüksek miktarda bulunurlar. Ayrıca damar endotel hücreleri, göz, testis ve dalak gibi periferik dokularda da bulunabilirler (Kendall and Yudowski, 2017). Hücre yüzeyine ek olarak hücre içi bölgelerde de yer alabilirler (Brailoiu, *et al.* 2011; Garcia *et al.* 2016).

CB2 reseptörleri genellikle timüs, B lenfositleri, T lenfositleri, doğal öldürücü (NK) hücreler, polimorfonükleer hücreler, makrofajlar ve monositler gibi bağışıklık sistemi ile alakalı hücre ve dokularda yoğun miktarda bulunmaktadır. Ayrıca CB2 reseptörleri merkezi sinir sistemi içerisinde de ifade edilirler (Cabral and Griffin-Thomas, 2009). CB2 reseptörleri beyinde düşük seviyelerde bulunur ancak bağımlılık, iltihap ve anksiyete gibi patolojik durumlar nedeniyle artış gösterebilir. CB2 reseptörleri genellikle beyinde postsinaptik bölgede bulunurlar ve CB1 reseptörlerinden farklı etkiler gösterirler (Chen *et al.* 2017).

Kannabinoidler reseptörlere bağlandıktan sonra, sinyal iletimini üç farklı yolla modüle edebilirler:

- 1) Reseptörleri aktive ederek (kısmi veya tam agonist),
- 2) Reseptör aktivitesini değiştirmeden diğer ligandların bağlanmasını engelleyerek (nötr antagonist)

3) Reseptörün temel aktivitesini azaltarak (ters agonist). Fito ve sentetik kannabinoidler kannabinoid reseptörlerine kısmi ya da tam agonist olarak bağlanarak etkilerini gösterirler (Brents and Prather, 2014).

Endokannabinoidlerin üretimi ve yıkılması hücre içerisinde oldukça kontrollü bir şekilde denetlenir. Hücre zarında ve veziküllerde hazır bir şekilde beklemeyen ve ihtiyaç talep halinde hücre zarında bulunan öncü moleküllerden sentezlenirler (Mackie, 2008). AEA, CB1 reseptörüne yüksek afinite gösterirken kısmi agonisttir, CB2 reseptörüne nerdeyse aktivite göstermemektedir. 2-AG ise orta ve düşük afiniteye ve her iki kannabinoid reseptörüne agonist etki gösterir (Zou and Kumar, 2018). Endokannabinoidlerden AEA, iştah, ağrı ve duygu durum üzerinde etkili olurken, daha güçlü bir agonist olan 2-AG sinaptik düzeyde daha yaygın baskılayıcı etki gösterir ve ağrı modülasyonu ile nöroprotektif mekanizmalarda kritik rol oynar (Cristino *et al.* 2020).

THC gibi kannabinoidlerin kannabinoid reseptörlerine bağlanması cAMP (siklik adenozin monofosfat) düzeyini düşürerek potasyum kanallarının açılmasıyla sinyal iletiminin azalmasına ve kalsiyum kanallarının kapanmasına neden olur. Bu da presinaptik inhibisyona ve uyarıcı ve inhibitör nörotransmitterlerin salınımının azalmasına yol açar (Teixeira, 2025).

Kannabinoidlerin etki mekanizmaları sayesinde tıbbi ve eğlence amaçlı kullanımları bulunmaktadır. *C. sativa* bitkisinde bulunan kannabinoidlerin terapötik etkileri bulunmaktadır (Pagano *et al.* 2022). Kannabinoidler, terapötik potansiyelleri sayesinde pek çok hastalık grubunda araştırılmakta ve bazı endikasyonlarda tıbbi kullanım onayı almaktadırlar. Bu terapötik etkilerin multipl skleroz, dravet sendromu, epilepsi, fibromiyalji, anksiyete, şizofreni, kanser ve kronik ağrı gibi birçok hastalık ve bozukluk üzerinde etkileri vardır (Licitra *et al.* 2022). Kenevir içeren ürünler terapötik amaçlar için rektal, dermal, sublingual ve göz damlası olarak farklı uygulama yöntemlerine sahiptir. Bunlara ek olarak sigaranın sebep olabileceği zararlardan kaçınmak amacıyla aerosoller ve buharlaştırıcılar vb. soluma yöntemleri ile kullanılabilirler (Grotenhermen, 2003).

CBD'nin anksiyete bozuklukları tedavisinde de potansiyeli bulunmaktadır. Preklinik çalışmalara göre CBD özellikle serotonin reseptörlerinde etki ederek anksiyete bozukluklarında, panik bozukluklarda ve özellikle travma sonrası stres bozukluğu gibi anksiyete bozukluğu spektrumlarında etkili olduğunu göstermiştir (Blessing *et al.* 2015).

Kannabinoidlerin kanser üzerindeki etkileri son yıllarda dikkat çekmektedir. Özellikle THC ve CBD'nin çeşitli kanser hücre hatlarında antiproliferatif (hücre çoğalmasını engelleyici) etkiler göstererek genellikle apoptoz mekanizmalarını uyarak bu etkilerini gösterir. Ayrıca kannabinoidler anjiyogenezini baskılayarak yeni damar oluşumunu engeller ve bu sayede

tümörlerin besin ve oksijen kaynağına erişimini sınırlar. Bununla birlikte, metastatik süreçlerde önemli olan hücre göçü de kannabinoid tedavisi ile baskılanabilir. CBD gibi bileşikler oksidatif stres oluşturmak mitokondriyal hasar ve hücre ölümünü tetikler. Bazı bulgular, kannabinoidlerin kemoterapötik ilaçlarla kombine kullanıldığında sinerjik etkiler oluşturabileceğini ve kemoterapiye bağlı advers etkilerin hafifletilmesine katkı sağlayabileceğini göstermektedir (Dariš *et al.* 2019; Mangal *et al.* 2021)

2018 yılında FDA (Gıda ve İlaç Geliştirme Dairesi) İngiltere merkezli GW Pharmaceuticals tarafından geliştirilen CBD türevi Epidiolex isimli ilacı onaylamıştır. Epidiolex yüksek saflıkta (%98) CBD ve %0,15 oranını geçmeyen THC bulunduran oral bir solüsyondur. (Finley *et al.* 2022). Epidiolex nadir görülen ve şiddetli etkileri olan Lennox-Gastaut Sendromu ve Dravet Sendromu gibi epilepsi türlerinin tedavisi gibi birçok hastalığın tedavisinde değerlendirilmektedir (Hilderbrand, 2018).

Bir diğer kannabinoid içeren ilaç Sativex (nabiximols) adlı oromukozal (ağız içine sıkılarak mukoza tabakasıyla emilen) spreydir. Sativex 1:1 oranında THC ve CBD içerir ve endokannabinoid sistemi modülatörü olarak etki eder (Vermersch, 2011). Sativex özellikle multipl skleroz (MS) kaynaklı spastisite (kas tonusunda artış, kas seğirmesi) ve nöropatik ağrı tedavisi için üretilmiştir. Kanada'da (Barnes, 2006) ve birçok Avrupa ülkesinde (Dyukukha *et al.* 2022) MS'e bağlı nöropatik ağrıların tedavisi için onay almıştır.

Kannabinoidlerin hastalıklar için kullanımına olan ilgi artmaktadır ancak reçete dışı kullanılan kenevir özütlerinin kullanımı patolojik ve davranışsal toksisiteye sebep olmaktadır (Lucas *et al.* 2018). Akut ve kronik esrar kullanımı anksiyete, panik ataklar, psikotik ataklar gibi semptomlarla ilişkilendirilir (Cohen *et al.* 2019). Gençlerde ve yetişkinlerde esrarın akut toksik etkileri taşikardi ve hipertansiyon gibi kardiyovasküler rahatsızlıklar, konjonktival enjeksiyon ve nistagmus (göz titremesi) gibi görme kusurları, hızlı veya aşırı yavaş nefes alma gibi solunum rahatsızlıkları, uyku hali, uyuşukluk, ataksi ve peltek konuşma gibi nörolojik rahatsızlıklar ve ağız kuruluğu ve iştah artışı gibi değişen çeşitli semptomlara sebep olur (Wong and Baum, 2019). THC ve CBD kan-beyin bariyerini geçebilir (Calapai *et al.* 2020). Özellikle THC lipofik bir yapıya sahiptir ve bu sebeple beyin ve nöronlarda birikebilme eğiliminde olduğu için çeşitli nörotoksik ve nörodejeneratif etkiler oluşturabilir (Lafzi *et al.* 2024).

Esrar yoksunluk sendromu genellikle hafif seyirlidir. Bu sendromda anksiyete, depresyon, uykusuzluk, mide-bağırsak rahatsızlıkları gibi belirtiler gözlemlenir ve etkisi 48–72 saat sürebilir. Tıbbi amaçla kullanılan esrarda bağımlılık riski daha düşüktür çünkü kullanım amacı sarhoşluk değildir. THC bağımlılık yapabilirken, CBD'nin bağımlılık yapıcı etkisi yoktur

(Arnold, 2021). THC'nin yoğunluğu esrarın bağımlılığını etikler. Yüksek THC yoğunluğuna sahip esrar düşük yoğunluğa sahip esrardan daha fazla bağımlılığa yol açar (Lucas *et al.* 2018).

Kronik esrar kullanımı kalıcı nöropsikolojik bozukluğa neden olabilir. Uzun süreli yoksunluktan sonra bile nöropsikolojik bozukluk devam edebilir. Bu bozukluğun şiddeti ve kalıcılığı esrarın kullanım miktarı, süresi, başlangıç yaşı, kullanım sıklığı gibi faktörlere bağlıdır (Meier *et al.* 2012). Kronik esrar kullanımının sosyolojik etkileri özellikle genç yaşıta başlandığında sosyal işlev bozukluğuyla ilişkilendirilmiştir. Bu bozukluklar arasında sosyal hayatta zorluk, yaşamdan daha az zevk alma ve daha yüksek işsizlik gibi etkiler gözlemlenebilmektedir (Schrot and Hubbard, 2016).

Sentetik Kannabinoidler (SK)

Sentetik kannabinoidler (SK) THC'nin psikoaktif etkilerini taklit etmek amacıyla üretilen ancak THC'ye kıyasla kannabinoid reseptörlerine daha fazla bağlanma afinitesi gösteren bileşiklerdir (Alzu'bi *et al.* 2024; Walsh and Andersen, 2020). CB1 ve CB2 reseptörlerinin ikisine birden bağlanma eğilimindedirler (Tai and Fantegrossi, 2017). Sentetik kannabinoidler kannabinoid reseptörlerini hedef aldıkları için (özellikle CB1) kannabinoid reseptör agonisteleri olarak da adlandırılırlar (Hudson and Ramsey, 2011). Yeni Psikoaktif Maddelerin (NPS) en geniş ve en yaygın grubunu oluştururlar (Martinotti *et al.* 2017). THC'nin etkilerini taklit etmesinin yanı sıra daha yoğun, daha kalıcı ve daha toksik etkilere sahip olduklarından kenevirin doğrudan bir sentetik versiyonu olarak kabul edilmezler (Zanda and Fattore, 2018). Genellikle lipofik, polar olmayan ve uçucu özellik gösterirler. Yaklaşık olarak 22 ile 26 karbon atomundan oluşurlar ve 4 ile 9 arasında değişen farklı doymuş yan zincirler içerirler (Alves, 2020).

SK aseton, metanol ve etanol gibi çözücülerde çözündürüldükten sonra doğal veya yapay tatlandırıcı eklenmiş bitkisel bir materyalin üzerine eklenip kurutma işlemine alınarak tüketilecek hale getirilirler. Bazı durumlarda ana bileşiğin yanı sıra özensizlikten dolayı farklı sentetik kannabinoid kalıntıları da tespit edilebilir (Brents and Prather, 2014; Tettey *et al.* 2021). Bu yöntemler ile üretilen uyuşturucu maddeler Türkiye'de Bonzai, Jamaica (İbiloğlu *et al.* 2017), ABD'de K2, Avrupa'da ise Spice (Oliveira *et al.* 2023) olarak bilinirler. Sentetik kannabinoid içeren maddeler pazarda veya internet üzerinden 'bitkisel ürün', 'tütsü' veya 'insan kullanımı için uygun değildir' ibareleri içeren ambalajlar içerisinde doğal ve güvenilir algısı yaratılarak satılırlar (Vandrey *et al.* 2012).

SK metabolitlerinin belirlenmesine yönelik araştırmalar hala devam ettiğinden, uyuşturucuların tespitinde kullanılan standart kan ve idrar testleri uyuşturucu kullanımının

izlenmesinde yetersiz kalmaktadır (Camp, 2011; Winstock and Barratt, 2013). Ayrıca sürekli değişen kimyasal yapıları bu durumu zorlaştırmaktadır. Sentetik kannabinoidlerin en yaygın kullanımı inhalasyon ile sigara, nargile, bong veya pipo kullanımı ile gerçekleştirilir. İnhalasyon ile tüketimine ek olarak oral veya rektal yöntemi uygulamaları da bulunmaktadır (Castaneto *et al.* 2014). Ayrıca son zamanlarda tütün bırakmaya yardımcı olmak amacıyla geliştirilen elektronik sigaraların (e-sigaralar) sentetik kannabinoid içeren e-sıvılar bulunduran kartuşlar kullanılarak tüketildiği görülmektedir. Bu durum yeni bir trend olmakla beraber aynı zamanda daha gizli, fark edilmeden yapılan bir tüketim yolu olarak karşımıza çıkmaktadır (Debruyne and Boisselier, 2015).

SK üretim tarihine ve kimyasal yapılarına göre dört ayrı nesille bilinir. Öncü olan ilk nesil THC'den daha yüksek afiniteye ve dopamin uyarıcı etkilere sahiptir. Örnek olarak JWH-018, CP-47,497 ve HU-210 serileri verilebilir. İkinci nesil AM-2201 ve diğer JWH serilerini içerir ve yalnızca kimyasal yapılarıyla birinci nesilden ayrılır (Zawilska and Andrzejczak, 2015). Diğer iki nesillere kıyasla daha yüksek CB reseptörlerine afinite gösteren üçüncü nesilde AB-CHMINACA ve MDMB-CHMICA bulunur. Son olarak, dördüncü nesil sentetik kannabinoidler bir indol veya indazol çekirdeği, bir ester, amid veya keton bağlayıcı, kinolinil, naftil, adamantil, tetrametilsiklopropil veya diğer kısım halkası ve indol veya indazol çekirdeğinin azot atomuna bağlı bir hidroforik yan zincir içerir. Bu nesil sentetik kannabinoidlere örnek olarak 4F-MDMB-BINACA ve 4F-ABINACA verilebilir (Oliveira *et al.* 2023).

SK kimyasal olarak çok çeşitli yapılar gösterirler ve zaman geçtikçe bu çeşitlilik artmaya devam eder. İlk nesil sentetik kannabinoidler genellikle akademik amaçlı üretildiği için üreticinin veya üretildiği kurumun isimleriyle adlandırılırlar. Örneğin JWH serisi (John W. Huffman), HU-XXX serisi (Hebrew University), CP-XX, XXX serisi (Charles Pfizer), AM-XXXX serileri (Alexandros Makriyannis) gibi adlandırılırlar (Debruyne and Boisselier, 2015). İkinci nesil sentetik kannabinoidlere daha çok pazarlama amacıyla isimler verilir. Örneğin XLR-11 (Amerikan roketine gönderme), SGT-13 gibi (Stargate International'a atıfta bulunan) adlandırılmalar kullanılır. Daha sonraki zamanlarda adlandırılma sorununu çözmek amacıyla EMCDDA kimyasal yapıya dayalı, sistematik bir adlandırma modeli geliştirmiş ve bunu standardize etmiştir (Andrews *et al.* 2023). Sentetik kannabinoidlerin kimyasal yapısı 4 gruptan oluşmaktadır. Bu gruplar çekirdek (core), kuyruk (tail substituent), bağlantı grubu (tether), ve bağlanan veya halka (linker) gruplarıdır (Potts *et al.* 2020). EMCDDA sentetik kannabinoidlerin artan kimyasal çeşitliliği karşısında tutarlı bir sınıflandırma sağlamak amacıyla bir isimlendirme sistemi geliştirmiştir. Bu isimlendirme sisteminde bileşiğin dört

temel yapısal yapı taşı esas alınır: kuyruk kısmı, bağlantı grubu çekirdek ve bağlayıcı. İsimlendirme, molekülün uç kısmındaki ikame ile başlar ve belirli bir sıraya göre devam eder. Her bir yapı taşı, önceden tanımlanmış kısaltmalarla temsil edilir ve yapı bloğunda gerçekleşen kimyasal değişiklikler örnekler veya eklemelerle tanımlanır (Pulver *et al.* 2023).

Kimyasal içeriğine göre SK 6 gruba ayrılabilirler (Hudson and Ramsey, 2011; Meydan, 2022; Shevyrin *et al.* 2016)

1. Klasik kannabinoidler: Dibenzopiran türevi olan THC'nin izomerlerini ve yapısal olarak benzer sentetik analoglarını içerir. Örneğin; HU-210.
2. Klasik olmayan kannabinoidler: Sikloheksilfenol (veya 3-arilsikloheksanolün) türevi sentetik bileşiklerdir. Örneğin, CP 47.497 ve CP 55.940
3. Hibrit kannabinoidler: Bu sınıfa hem klasik hem de klasik olmayan kannabinoidlerin yapısal özelliklerini birleştirmek üzere modellenen bazı bileşikler yer alabilir. Örneğin; AM -4030
4. Aminoalkilindoller: Bu sınıf, WIN55,212-2 bileşiğini de içeren geniş bir bileşik grubudur. Aminoalkilindol kimyasal sınıfı aşağıdaki alt gruplara ayrılabilir:
 - (A) Naftoilindoller. Örnek: JWH-018, JWH-398, JWH-073
 - (B) Fenilasetilindoller. Örnek: JWH-250, JWH-253
 - (C) Benzoilindoller. Örnek: AM-694
 - (D) Naftilmetilindoller. Örnek: JWH-184
5. Eikosanoidler: *N*- araşidonoleitolamin (anandamid; AEA) veya 2-araşidonilgliserol (2-AG) gibi endokannabinoidler ve sentetik analoglarını içerir.
6. Diğer kannabinoidler: Hazırlanan az sayıda bileşik veya aktivitenin yetersiz anlaşılması nedeniyle belirli bir sınıfa dahil edilemeyen heterosiklik bileşikler sınıfıdır. Bu sınıfın örnekleri arasında diarilpirazoller (örneğin SR141716A ve SR144528) ve 3-naftoilpiroller yer alır.

Tüm bu sınıflandırmalar, sentetik kannabinoidlerin hem yapısal çeşitliliğini hem de farmakolojik karmaşıklığını ortaya koymaktadır. Her bir kimyasal grubun farklı biyolojik etkiler oluşturma potansiyeli, bu maddelerin toksikolojik profillerinin detaylı biçimde incelenmesini zorunlu kılmaktadır. Günümüzde sentetik kannabinoidlerin hızlıca evrilmesi hem bilimsel hem de yasal takibi oldukça güçleştirmektedir.

Sentetik kannabinoidlerin tarihçesi

Sentetik kannabinoidler (SK), THC'nin yapısının keşfedilmesinin ardından ortaya çıkmıştır. Geliştirilmelerinin amacı, endokannabinoid sisteminin ve homeostaz, hafıza, bilişsel

işlevler, motor kontrol, ağrı hissi ve iştah gibi çeşitli fizyolojik süreçlerdeki rollerinin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktır. Ayrıca, SK'ler tıbbi araştırmaları ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini kolaylaştırmak için de kullanılmaktadır (Ozturk *et al.* 2019). 1970'lerde Pfizer ilaç firması tarafından kannabinoid reseptör agonisti olan CP 55,940 isimli sentetik kannabinoid üretilmiştir (Debruyne and Boisselier, 2015). 1988 yılında Hebrew Üniversitesi'nde Raphael Mechoulam ve arkadaşları tarafından HU-210, aynı yıllarda ABD'de Sterling-Winthrop ilaç firması tarafından WIN 55212-2 üretilmiştir (Luca and Fattore, 2018). 1995 yılında ise Clemson Üniversitesindeki Profesör John W. Huffman tarafından JWH serisi sentetik kannabinoidler beyin üzerindeki etkilerin ilaç geliştirme potansiyelini anlamak amacıyla geliştirilmiştir (Vera *et al.* 2020). Bu geliştirilen JWH serisi SK olan JWH-018, JWH-122 ve JWH-210 maddeleri sırasıyla 5, 60 ve 82 kat afinite bakımından THC'den daha güçlüdür (Oliveira *et al.* 2023).

2000'li yılların başlarında gizli laboratuvarlarda üretilen sentetik kannabinoidler, 2004 yılında “yasal esrar” ibaresiyle kafelerde, marketlerde ve internet üzerinden satışa sunulan Spice adlı ürünlerle eğlence amaçlı kullanılmaya başlanmış ve bu maddelerin kötüye kullanımı hızla yaygınlaşmıştır. Spice adı verilen bu maddeler renkli, cezbedici paketler içerisinde tütsü, bitkisel karışım gibi dikkat çekmeyen ve doğal algısı yaratacak şekilde satışa sunulmuştur (Castaneto *et al.* 2014; Debruyne and Boisselier, 2015). Bu paketler üzerinde yalnızca bitkisel ürünlerin isimleri listelenmekte ancak içerdiği SK'lere dair bir bilgi bulunmamaktadır (Spaderna *et al.* 2013). Spice adı altında satılan ürünler içerisinde yaklaşık 15 farklı bitkisel ürünün bulunduğu tahmin edilmektedir. Bu bitkilerin bazılarının da psikoaktif etkisi bulunmaktadır ve bu sebeple ilaç-ilaç etkileşimleri ile daha yüksek etkiler meydana getirirler (Fattore and Fratta, 2011).

2008 yılında bir Alman şirketi tarafından yapılan analizlerle spice adı verilen bitkisel karışımların içerisinde JWH-018, CP 47,494, C6, C7 ve C8 bileşiklerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Bu tespit SK'lerin kötüye kullanımına dair ilk raporun yayınlanmasına neden olmuştur (Boisselier *et al.* 2017). 2009 yılında bazı Avrupa ülkelerinde sentetik kannabinoid içeren tüm ürünler Narkotik Yasasına tabi tutulmuş bu sayede satışının kolaylığı engellenmiştir. Aynı yıl Uyuşturucu Madde Kötüye Kullanımı Danışma Konseyi'nin (ACMD) ve Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi'nin (EMCDDA) tavsiyesiyle 1971 tarihli Uyuşturucu Madde Kötüye Kullanımı Yasası değişikliğiyle sentetik kannabinoidler Birleşik Krallıkta kontrollü maddeler olarak sınıflandırıldı (Fattore and Fratta, 2011). Türkiye'de üzerinde bonzai yazan paketler içerisinde JWH-018 türü bulunan uyuşturucu maddelerin satışı bulunmaktaydı. 7 Ocak 2011'de Bakanlar Kurulu kararıyla sentetik kannabinoidler 2011/1310 sayılı yasasıyla yasaklı hale gelene kadar yaygın bir şekilde

kullanılmıştır (Seyit *et al.* 2016). Aralık 2013 yılına gelindiğinde EMCDDA 102 farklı sentetik kannabinoid varlığını bildirmiştir (Ergül *et al.* 2015). 2016 yılında tespit edilen 739 yeni psikoaktif maddelerin (NPS) %32'sini sentetik kannabinoidler oluşturmaktaydı (Alves, 2020). 2019 yılında, Avrupa Birliği Erken Uyarı Sistemi'ne 18.700'ün üzerinde sentetik kannabinoid yakalanması rapor edilmiştir. Bu yakalanmaların yaklaşık %65'i Türkiye'de gerçekleşti. (EMCDDA, 2021).

Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi'nin (UNODC) "Küresel sentetik uyuşturucu değerlendirmesi 2020" raporuna göre, 1 Ağustos 2020 itibariyle 125 ülke 1000'den fazla NPS bildirilmiş olup sentetik kannabinoidler yaklaşık %30 oranı ile en yaygın ikinci madde grubunu oluşturmuştur (Morales-Noé *et al.* 2022). 2021 yılının sonunda EMCDDA toplam 224 farklı sentetik kannabinoid izleme listesindeydi. 2022 yılının başından temmuz ayına kadar bu sentetik kannabinoidlere 13 tanesi daha eklendi (Andrews *et al.* 2023). Tüm bu tarihsel süreç, sentetik kannabinoidlerin yalnızca bilimsel bir merak unsuru olmaktan çıkıp zamanla ciddi bir halk sağlığı problemi haline geldiğini açıkça ortaya koymaktadır. Hem kimyasal yapılarının çeşitlenmesi hem de tespit edilmelerinin zorlaşması, bu maddelerin izlenmesini ve kontrol altına alınmasını giderek zorlaştırmaktadır. Özellikle düşük maliyetle kolay erişilebilir olmaları, yasa dışı pazarın büyümesini hızlandırmış ve düzenleyici sistemleri zorlamıştır. Dolayısıyla sentetik kannabinoidlerin toksikolojik etkilerini anlamak ve bu maddelere karşı etkili politika ve tedavi stratejileri geliştirmek, günümüz dünyası için öncelikli hedeflerden biri haline gelmiştir.

Sentetik kannabinoidlerin kullanım alanı ve toksisitesi

Sentetik kannabinoidler, endokannabinoid sistem üzerine etkileri araştırılmak üzere başlangıçta bilimsel ve farmasötik amaçlarla geliştirilmiş bileşiklerdir. Özellikle ağrı, bulantı, iştah kaybı, kas spazmları ve bazı nörolojik hastalıklar gibi çeşitli klinik durumlarda potansiyel terapötik etkileri nedeniyle ilgi görmüşlerdir. Bununla birlikte, güçlü psikoaktif özellikleri ve THC'ye kıyasla daha yüksek reseptör afinite ve etkinlikleri, bu bileşiklerin terapötik kullanımı istenmeyen bir şekilde kötüye kullanım riskini de beraberinde getirmiştir. Günümüzde sentetik kannabinoidler hem kontrollü tıbbi uygulamalarda hem de yasa dışı eğlence amaçlı kullanımlarda rol oynamakta; bu da toksikolojik etkilerinin ve güvenlik sınırlarının detaylı şekilde araştırılmasını önemli kılmaktadır.

Bazı ilaç şirketleri potansiyel ilaç olarak çeşitli sentetik kannabinoidler geliştirdiler. THC'ye yapısal olarak benzeyen Nabilon (ticari adı Casamet) FDA tarafından onaylı kemoterapiye bağlı mide bulantısı ve kusmanın tedavisi olarak geliştirilmiştir (Schurman *et al.* 2020). Nabilon CB1 ve CB2 reseptör agonistidir. Ayrıca nabilon esrar bağımlılığı ve yoksunluk

belirtilerinin tedavi edilmesi için kullanılabilir (Hill *et al.* 2017). Nabilon sentetik bir THC analogudur. ABD’de kötüye kullanım potansiyeli olama ihtimali olarak sınıflandırılmıştır. Bununla birlikte kötüye kullanımı azdır (Schrot and Hubbard, 2016). Yan etkileri görece azdır. Genellikle ortostatik hipotansiyon, ağız kuruluğu, nefes darlığı, öfori, uyuşukluk ve baş dönmesi gibi etkiler gösterebilir. Nadir fakat ciddi yan etkisi arasında psikoz bulunabilir (Legare *et al.* 2022).

Rimonabant (SR141716) bir CB1 reseptörü ters agonistidir. İlk olarak obezite karşıtı ilaç olarak geliştirilmiştir ancak depresyon, anksiyete ve intihar düşüncesi gibi yan etkilere neden olur. (An *et al.* 2020). Rimonabant iştahı azaltması için CB1 antagonisti olarak geliştirilmiştir. Ancak yan etkileri nedeniyle 2009 yılında kullanımdan kaldırıldı (Schrot and Hubbard, 2016).

Dronabinol (Marinol) FDA onaylı THC'nin sentetik bir varyasyonudur. CB1 ve CB2 reseptörlerine agonisttir. AIDS ve kemoterapi kaynaklı mide bulantısını hafifletmek ve iştah artırarak kilo kaybını engellemek amacıyla üretilmiştir (Calik and Carley, 2016). Aventis ilaç şirketi tarafından geliştirilen rimonabant 2006 yılında kullanımı Avrupa'da onaylandı (Luca and Fattore, 2018). Dronabinol ayrıca esrar kullanan bireyler üzerinde farklı dozlarda esrarın akut etkileri, yoksunluk belirtileri ve esrarı belirli süre kullanmadıktan sonra tekrar başlama isteklerinin üzerindeki etkileri de incelenmektedir (Vandrey *et al.* 2013).

Sentetik kannabinoidlerin kötüye kullanım potansiyelinin bulunması tıbbi alanda kullanımını sınırlamaktadır (Hudson and Ramsey, 2011). Sentetik kannabinoidlerin eğlence amacıyla kullanımı sonucu algıda değişiklik, sakinlik, rahatlama, neşe, özgüven hissi gibi etkiler gözlemlenir (Debruyne and Boisselier, 2015). Sentetik kannabinoidlerin eğlence amaçlı kullanımının olumsuz etkileri kannabinoid reseptörleri ve kannabinoid reseptörleri dışındaki reseptörlerin ligand bağlanma bölgeleriyle kurduğu daha yüksek ve güçlü etkileşimleri sayesinde meydana gelir (Schurman *et al.* 2020). Sentetik kannabinoidlerin reseptörlere olan afinitesinin daha yüksek olması toksisitesinin artmasını sağlayarak beklenen yan etkilerinin artmasını sağlayabilir (Oliveira *et al.* 2023). Sentetik kannabinoidlere bağlı zehirlenmeler, tutarlı ya da birbirine benzer toksik etkiler göstermeyebilir ve bu nedenle semptomlar, diğer eğlence amaçlı kullanılan maddelerinkinden ayırt edilemeyebilir (Thomsen *et al.* 2024). Sentetik kannabinoid kullanıldıktan sonra en çok gözlemlenen semptomlar halüsinasyonlar, ajitasyon, mide bulantısı, anksiyete, panik ataklar ve taşikardidir (Fattore and Fratta, 2011).

Sentetik kannabinoidler var olan psikiyatrik veya nörolojik bozuklukların denge halini bozarak semptomların ağırlaşmasına ya da hastalığın şiddetlenmesine ve klinik tablonun bozulmasına neden olabilir (Oliveira *et al.* 2023). Örneğin hali hazırda şizofreni tanısı bulunan

4 kişinin gizlice sentetik kannabinoid AM-2201 kullanması sonucu mevcut psikotik etkilerden bağımsız yeni psikotik etkilerin ortaya çıktığı ve diğer belirtilerin ise beklenmedik bir artış gösterdiği belirlenmiştir (Celofiga *et al.* 2014).

Sentetik kannabinoidlere akut maruziyet sonucu nöbetler, psikoz, kardiyovasküler rahatsızlıklar, nefrotoksisite, hepatoksisite ve ciddi beyin kanamaları gibi olumsuz etkiler meydana getirebilir (Sholler *et al.* 2020). Sentetik kannabinoidler ayrıca lökositoz, respiratuar-metabolik asidoz, glukoz seviyesinde yükselme ve potasyum düşüklüğü gibi ciddi metabolik etkilerde meydana getirebilir (İbiloğlu *et al.* 2017). Sentetik kannabinoidlerin kullanımından sonra görülen etkiler yaklaşık %61 oranında nörolojik, %43 oranında ise kardiyovasküler etkilerdir (Debruyne and Boisselier, 2015). SK kullanım sonrası intihara meyil, aşırı doz veya advers etkiler sayesinde ölümler meydana gelebilir (Alves, 2020). Sentetik kannabinoidlerin ölümcül doz eşiği bilinmemektedir. Bunun sebebi ölüm sonrası örneklerde bulunan geniş aralıktaki sentetik kannabinoid konsantrasyonlarıdır (Thomsen *et al.* 2024).

Kronik SK kullanımı bilişsel bozukluk, bilinç kaybı, ajitasyon, tepkisizlik ve nöbetlere sebep olabilir (Fattore and Fratta, 2011). Ayrıca kronik SK özellikle hassas gruplar (örneğin ergenler ve genç yetişkinler) tarafından kullanımı, normal nörogenezi bozarak veya epigenetik değişiklikler meydana getirerek uzun vadede nörogelişimsel ya da nöropsikiyatrik bozuklukların (örneğin psikoz veya otizm spektrum bozukluğu) ortaya çıkmasını teşvik edebilir. (Roque-Bravo *et al.* 2023).

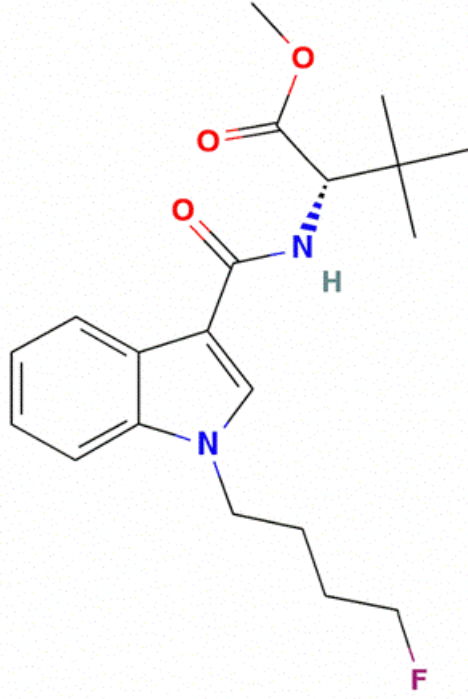
SK (örneğin spice gold) kullanımını bıraktıktan sonra yoksunluk döneminde teleme, huzursuzluk, baş ağrısı, vücutta seğirmeler, uyuşukluk hissi , aşırı ilaç isteği ve gastrointestinal sistem rahatsızlıkları (bulantı, kusma, ishal) görülebilir (Zimmermann *et al.* 2009). Nadir olarak sentetik kannabinoid yoksunluğu belirtileri; işitsel/görsel halüsinasyonlar, rabdomiyoliz (ani kas bozulmaları) ve deliryumdur (Sharma and Weinstein, 2025). Tüm bu veriler, sentetik kannabinoidlerin hem terapötik potansiyel taşıdığını hem de ciddi sağlık riskleri barındırdığını göstermektedir. Etki mekanizmalarının kompleksliği, bireyler arası yanıt farkları ve hızlı kimyasal değişimleri göz önünde bulundurulduğunda, bu maddelerin tıbbi kullanımının dikkatle değerlendirilmesi ve kötüye kullanımının önlenmesine yönelik stratejilerin geliştirilmesi ve güçlendirilmesi gerekmektedir.

4F-MDMB BUTICA

4F-MDMB-BUTICA, metil (S)-2-(1-(4-florobütil)-1H-indol-3-karboksamido)-3,3-dimetilbütanoat, (diğer adlarıyla 4F-MDMB-BICA, 4F-MDMB-2201, 4FBCA veya 4FBC). 4F-MDMB-BUTICA, ilk olarak 2020 yılında Avrupa Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı

İzleme Merkezi (EMCDDA) tarafından yeni psikoaktif maddeler (NPS) grubuna dahil edilerek rapor edilmiştir. (EUDA, 2020). 4F-MDMB-BUTICA yapısal olarak bir indol çekirdeği, bir karboksamid bağ grubundan, bir dimetil metil bütanoat bağlı gruptan ve 4-florobutil gruplarından meydana gelir (Yue *et al.* 2021). 4F-MDMB-BUTICA, THC ile benzer psikoaktif özellikler gösteren sentetik kannabinoid sınıfı bir bileşiktir (CFSRE, 2020). 4F-MDMB BUTICA üzerinde yeterli çalışma bulunmamakta ancak, sınırlı bilgiler bu bileşiğin güçlü bir CB1 reseptör agonisti olduğunu gösterir (EUDA, 2020). Bu bileşik, sigara içerisinde bitkisel karışımlar, buharlaştırma solüsyonlarında ve blotter adı verilen emdirilmiş kâğıt parçalarında tespit edilmiştir (EUDA, 2020). 4F-MDMB-BUTICA, genellikle bitki materyaline sprey yoluyla uygulanarak sigara şeklinde içilmekte ya da bong gibi araçlarla buharlaştırılarak tüketilmektedir (WHO, 2021). Bu madde ilk kez Mart 2020'de Belçika'da, Mayıs 2020'de Amerika Birleşik Devletleri'nde de tespit edilerek toksikoloji eğilim raporlarına dâhil edilmiştir (EUDA ve Europol, 2020; CFSRE, 2021).

4F-MDMB-BUTICA kullanımı Macaristan'da 21 ölüm vakasının yanı sıra Almanya, ABD ve diğer bazı ülkelerde sayısı kesin olarak belirlenemeyen ölümlerle ilişkilendirilmiştir. (WHO, 2021). 4F-MDMB-BUTICA'nın akut ve kronik toksisite bilgileri sınırlıdır (EUDA, 2020). Aşırı doz kullanımına bağlı olarak görülebilecek olumsuz yan etkiler arasında; gastrointestinal etkiler, (bulantı, kusma, hiperemesis), nörolojik etkiler, (nöbet, ajitasyon, halüsinasyon, konvülsiyon, anksiyete, paranoya, bilinç bulanıklığı, katatoni, letarji, psikotik epizotlar, santral sinir sistemi depresyonu ve koma), kardiyovasküler komplikasyonlar, (hipertansiyon, taşikardi, akut miyokard enfarktüsü ve ani kardiyak ölüm), böbrek üzerine etkiler,, (akut böbrek yetmezliği) ve solunum stresleri yer almaktadır (EUDA, 2020). Mevcut literatürde 4F-MDMB-BUTICA'nın faz I metabolitlerinin belirlenmesi ile ilgili kapsamlı çalışmalar sınırlıdır. Ancak yapılan bir çalışmada 4F-MDMB-BUTICA'nın 13'ü kanda, 20'si idrarda olmak üzere 33 metaboliti tespit edilmiştir (Körmöcz, *et al.* 2021). Bu durum 4F-MDMB-BUTICA kullanan kişilerin tespitini kolaylaştırmak için öncü görevi görmektedir.



Şekil 3. 4F-MDMB-BUTICA'nın kimyasal yapısı (Cayman Chemical, Product No: 31075).

Model Organizma Olarak Zebra Balıkları

Model organizmalar; biyolojik süreçlerin araştırılması, hastalıkların anlaşılması, yeni tedavi yollarının bulunması, ilaçların hedef hücre, doku ve organ üzerindeki etkilerini araştırmak ve geliştirmek için uzun zamandır kullanılmaktadırlar. Model organizmalar insanlar üzerinde yapılması tehlikeli sonuçlar doğurabilecek olan olayların önüne geçebilir ve insan doğasının yanında getireceği kontrolsüz ortam şartlarını kontrol altında tutulabilirler. Bu sebeple de insanlı çalışmaların yerini almışlar, bilginin ve çalışmanın nesnelliğini olumlu yönde etkilemişlerdir. Bu nedenle model organizmalarla yapılan çalışmalardan elde edilebilecek çıkarımların teyit edilebilirliği adına büyük öneme sahiptirler.

George Streisinger tarafından 1982'de karsinojenlerin meydana getirdiği mutasyonların incelenmesi için kullanımını önerdiği günden beri zebra balıkları (*Danio rerio*) model organizma olarak sıkça kullanılan omurgalı bir balık türüdür (Bambino and Chu, 2017; Rosa *et al.* 2022). Zebra balıklarının doğal yaşam alanı Hindistan, Bangladeş ve Nepal'deki pirinç tarlaları, göletler ve akarsulardır. Bulundukları alanların değişkenlerine kolayca uyum sağlayabilirler (Lee *et al.* 2022).

Akvaryumlarda süs balığı olarak tercih edilirler. Genellikle suyun üst kısımlarında yüzmeyi seven, saldırgan olmayan bir balık türü olup sürüler halinde dolaşmayı tercih ederler. Vücutları genellikle gümüş rengindedir. Vücutta boydan boya 7-9 tane mavi çizgi ile karakterize edilirler. Bu çizgiler kuyrukta da devam eder. Zebra balıklarında renklenme ile ilgili melenoforlar, ksantoforlar ve iridoforlar olmak üzere üç pigment bulunur. Melenoforlar

yalnızca koyu renkten sorumluyken, ksentoforlar sarı, iridoforlar gümüş renkten sorumludur ve vücut hücrelerinde dağınık halde bulunurlar (Nüsslein-Volhard and Singh, 2017). Zebra balığı omurgalı bir balık için küçüktür, yetişkinler 3 cm veya daha fazla uzunluğa kadar büyür (Deo and MacRae, 2011). Bu durum kemirgen modellerine nazaran daha fazla avantaj sağlar (Bailey *et al.* 2013).

Cinsiyet tayinleri gözle veya mikroskop yardımı ile kolayca ayırt edilebilir. Cinsiyet tayini 3 şekilde gerçekleştirilebilir. Birincisi dişi zebra balıklarının karın bölgesi daha şişkin gözükmetedir. Bu sebeple daha büyük gözükürler. İkinci olarak erkek zebra balıkları daha fazla ksentofor bulundurduğundan ışık altında daha belirli sarı görünüme sahiptirler. Üçüncü ve en önemli ayırt etme yolu anal yüzgeçlerinin hemen önünde anüs açıklığının arkasında bulunan genital gözenektir. Dişi balıklarda genital gözenek vücuttan dışarı doğru çıkıntı yaparken erkeklerde çıktı gözlemlenmemektedir (Kossack and Draper, 2019).

Zebra balıklarının laboratuvar ortamında aşamalı 14 saat aydınlık 10 saat karanlık döngüde bulunması uygun görülmüştür. 28°C sabit sıcaklık gelişimleri için uygundur ve bulundukları tankın boyutunun ihtiyaçlarını giderecek boyutta olması yeterlidir (Lee *et al.* 2022). Laboratuvar ortamında zebra balıklarının sağlıklı gelişimi için çevresel faktörlerin kontrolü önemlidir.

Dişi zebra balıkları 2-3 günde bir yumurtlayabilir, dış döllenme-dış gelişim gözlenir. Bu durum embriyoların tüm gelişim aşamalarında manipülasyon kolaylığı sağlar (López-Olmeda and Sánchez-Vázquez, 2011). Zebra balıklarında embriyonik dönem 3 gün sürer, 5. Günden sonra ekzojen beslenmeye başlar (Sant and Timme-Laragy, 2018). Döllenmeden sonraki ilk 24 saatte (hpf) birincil nöronlar gelişir (Rosa *et al.* 2022)., 24 hpf'den sonra embriyonik kalp kasılmaya başlar (Brown *et al.* 2016). Mikroskop yardımı ile kan basıncı gözlemlenebilir. Tüm vücut sistemleri 72 hpf'de oluşur (Horzmann and Freeman, 2018). Nörolojik sistem ise 72 ila 120 hpf arasında oluşumu tamamlanır (Rosa *et al.* 2022).,

Zebra balıklarının modern in vivo deney hayvan modeli olarak global anlamda kabul görmesi her geçen gün artmaktadır. Bu hayvan modelinin hem yetişkin bireylerinde hem de embriyolarında biyomedikal ve toksikolojik araştırmalar yapmak giderek popüler hale gelmektedir (Chakraborty *et al.* 2016). Zebra balığı bakım kolaylığı (Horzmann and Freeman, 2018; Şişman, 2011), küçük boyutu (Lai *et al.* 2021; Şişman, 2011) yüksek doğurganlığı, (Gore *et al.* 2018; Park *et al.* 2021), hızlı gelişimi (Balik-Meisner *et al.* 2018; Lai *et al.* 2021; Şişman, 2011), şeffaf embriyoya sahip olması nedeni ile gelişiminin kolay gözlemlenmesi (Bailey *et al.* 2013; Rosa *et al.* 2022) ve iyi karakterize edilmiş genomu (Freeman *et al.* 2007; Lai *et al.* 2021; Sola and Gornung, 2001) ile etkili ve oldukça tercih edilen bir model organizmadır.

Zebra balığının en önemli model organizma olarak sınıflandırılmasının bir diğer ve en önemli nedeni Avrupa Birliği (AB) hayvan refahı direktifine (AB 2010/63/EU) göre üzerinde döllenen sonraki 120 saat içerisinde araştırmalar yapmak uygundur ve 3R (reduction, replacement, refinement) kuralına uymaktadır (Rosa *et al.* 2022). Bu direktife göre zebra balıkları döllenen sonraki 120 saate kadar (5 gün) hayvan olarak kabul edilmezler ve AB’de etik onay gerektirmez (Morales-Noé *et al.* 2022).

Zebra balıkları insanlardakine benzer; yara iyileşmesi/yenilenmesi, gastrointestinal hastalıklar, patojen-konak ilişkisi, genetik hastalıklar ve ilaç geliştirmeleri gibi patolojik alanların çalışılmasına olanak tanır (Goldsmith and Jobin, 2012). Zebra balıkları gelişim biyolojisi çalışmalarında sadece mikroskop gibi kolay gözlemlenme yöntemleri kullanılması ve saydam embriyosu sayesinde sıklıkla tercih edilirler (Horzmann and Freeman, 2018; Park *et al.* 2021). Zebra balığı embriyoları ksenobiyotiklere maruziyetinin kolaylığı (Horzmann and Freeman, 2018) ve hızlı embriyo gelişimi sayesinde (Ceylan *et al.* 2016) teratojenite çalışmalarında değerli bir model organizma olarak kullanılmaktadır.

Zebra balıkları 200’e yakın karmaşık davranış modelini sergileyebilirler ve bu davranışlar kemirgenler de dahil olmak üzere memelilerde oldukça korunmuştur (Morbiato *et al.* 2020). Zebra balıkları hastalıkların genetik, nörolojik ve davranış gibi temel parametrelerin incelenmesinde ve tedavi yollarının araştırılması, yeni stratejilerin oluşturulmasında akıllara gelen ilk model organizmadır (Khalili and Rezai, 2019). Zebra balığı iyi dizilenmiş (Menke *et al.* 2011; Parichy, 2015), 25 çift kromozoma ($2n=50$) sahiptir (Freeman *et al.* 2007; Sola and Gornung, 2001). Cinsiyeti vahşi tipte ZZ/ZW cinsiyet kromozom tayiniyle belirlenir (Kossack and Draper, 2019). Zebra balığı insan genomuyla yaklaşık %70 benzerlik gösterir (Howe *et al.* 2013; Park *et al.* 2021). Zebra balığı genomunda insan hastalıklarına neden olan proteinlerin %82’sine ve bilinen insan ilaç hedef gen bölgelerinin %85’inin gen ortologlarını ifade ettiği bilinmektedir (Tombari *et al.* 2023).

Zebra balığı genetik çalışmaları kolaylaştırmak için bir dizi ileri ve geri genetik teknikle manipüle edilebilir (Gibert *et al.* 2013). Zebra balığı embriyolarında transgenik hatlar elde etmek mümkündür (Cassar *et al.* 2020; Gore *et al.* 2018). Bu kolaylıklar zebra balıklarını genetik çalışmalar, gen terapisi, karyotip analizler ve -omik çalışmalar gibi alanlarda ön plana çıkarır (Horzmann and Freeman, 2018). Zebra balıklarının sahip olduğu fizyolojik, genetik, memelilere benzer doku-organ sistemleri sayesinde ekotoksikoloji olmak üzere birçok toksikolojik testler için uygundur (Cooman *et al.* 2022; Hammond-Weinberger and ZeRuth, 2022).

Zebra balıklarının ilaç araştırmalarında kullanımı

İlaç keşfi, hastalıkların tedavi edilmesini sağlamak amacıyla yeni maddelerin bulunması ve geliştirmesini kapsayan bir süreçtir. Modern ilaç keşfi moleküler biyoloji, genetik, farmakoloji ve biyoinformatik gibi çeşitli bilim dallarının multidisipliner entegrasyonu ile gerçekleşir.

İlaç geliştirme süreci; keşif, klinik öncesi geliştirme ve klinik denemeler olarak üç ana gruba ayrılabilir (Steinmetz and Spack, 2009). Muhtemel tedaviler için üretilecek yeni ilaç adaylarının belirlenmesi, sentezlenmesi, karakterizasyonu, etkinlik testlerinin yapılması gibi aşamalar önemli ve dikkat edilmesi gereken bir süreçtir (Deore *et al.* 2019). Uygun sonuç elde edilen moleküller klinik deneyler öncesinde ilaç araştırma ve geliştirme sürecine girerler. Bu süreç oldukça maliyetlidir ve yaklaşık 10 ile 15 yıl arası süre gerektirir (Hughes *et al.* 2011; Singh and Seed, 2021). Potansiyeli olan ilaç adaylarını belirlemek için kullanılan klinik öncesi yöntemler arasında; hedef spesifik etkileşimlerin incelenmesi, fenotipik taramalar, doğal maddelerin modifikasyonu ve biyolojik temelli yaklaşımlar yer alır (Swinney and Anthony, 2011).

Klinik öncesi araştırmalar model organizmalar ile hayvan çalışmalarını kapsar. İlacın insan ile maruziyetinin eş değer doz güvenliği, farmakodinamiği ve farmakokinetiği hayvan çalışmalarıyla sağlanır (Umscheid *et al.* 2011). Ayrıca model organizmalar hastalıkların patofizyolojisini anlamak, ilacın hedefinin belirlenmesi, yeni terapötik ajanların toksisitesini ve güvenliğini değerlendirmek içinde kullanılır (Singh and Seed, 2021). Klinik çalışmalarda yürütülen işlemler dört aşama altında toplanabilir;

Faz I: Klinik öncesi verilerin incelenmesinin ardından, sağlıklı bireylerde farklı dozlarda ilacın tolere edilebilirliği, güvenliği ve farmakokinetiği test edilir.

Faz II: Faz I'de belirlenen doz aralığı temelinde, hasta bireylerde ilacın etkinliği ve tolere edilebilirliği plasebo ile karşılaştırılarak değerlendirilir.

Faz III: Faz II'de seçilen dozla, çok sayıda hastada ilacın etkinliği ve tolere edilebilirliği plasebo veya benzer ilaçlarla karşılaştırılarak incelenir. Bu fazın sonuçları, ilacın lisans alıp almayacağını belirler.

Faz IV: İlaç lisanslandıktan sonra başlar ve pazarlama süreci boyunca devam eder. Burada amaç, ilacın uzun dönem etkilerini izlemek, kullanım deneyimlerini artırmak ve pazardaki konumunu güçlendirmektir (Jones, 2001).

Klinik denemeler ve daha sonrasındaki adımlar ilaç keşfi ve geliştirmenin diğer aşamaları ise; yeni hedefleri belirlemek, hedef-hastalık ilişkileri için daha güçlü kanıtlar

sağlamak , küçük moleküllerden oluşan bileşiklerin tasarımını ve optimizasyonunu artırmak, hastalıklara neden olan mekanizmalarının anlaşılmasını sağlamak, hastalığı ve hastalığı etkileyen dış etkenlerin fenotiplerin anlaşılmasını artırmak ve hastalığın seyrini ve tedavi sonuçlarının öngörüsü, ilerleme ve ilaç etkinliği için yeni biyobelirteçler geliştirmektir (Vamathevan *et al.* 2019). İlaçların insan için kullanımı ve pazara sunulması Amerika Birleşik Devletleri temelli Gıda ve İlaç Geliştirme Dairesi (FDA) tarafından onaylanması ile gerçekleşir (Singh and Seed, 2021). İlaç keşfinin insan tedavisinde kullanmak için model organizmalar üzerinde yapılan klinik öncesi çalışmalar ile elde edilen veriler büyük öneme sahiptir (Bissig *et al.* 2018).

Tüm laboratuvar yöntemlerinde olduğu gibi ilaç araştırmalarında da doğru model organizma seçimi çok önemlidir. Zebra balıkları ilaç keşfi için verimli taramalara, yeni bileşiklerin keşfine, yeni ve tanınmayan hedeflerin tanımlanmasında kullanılan verimli bir model organizmadır (Horzmann and Freeman, 2018). İlaç geliştirmenin doğasında bulunan zaman çizelgesini azaltmak ve memeli çalışmaları için gereksiz maliyeti azaltmak için zebra balıkları üzerinde yapılan ilaç tarama analizleri giderek daha dikkat çekici ve popüler hale gelmektedir (McGrath and Li, 2008). Zebra balığı farmasötik araştırmalarda ve ilaç geliştirmelerinde kullanılmasının önemli adımları; öncü bileşiklerin taranması, hedef tanımlama, hedef doğrulama fizyolojik tabanlı ilaç keşfi, kantitatif yapı-aktivite ilişkisi (QSAR), yapı-aktivite testi (SAR) çalışması ve ilaç toksisite çalışmalarıdır (Chakraborty *et al.* 2009) Ayrıca zebra balıkları boyutlarının küçük olması nedeniyle az miktarda ilaç kullanılarak ilaç araştırmaları gerçekleştirilebilir (McGrath and Li, 2008). Zebra balıkları ilaç keşfi için verimli taramalara, yeni bileşiklerin keşfine, yeni ve tanınmayan hedeflerin tanımlanmasında kullanılan verimli bir model organizmadır (Horzmann and Freeman, 2018).

Zebra balıkları; insanlardakine benzer karaciğer, böbrek, kan-beyin ve kan-retina bariyerleri, ilaç metabolize eden enzimleri ve metabolik hızlarının yanı sıra, ağrı, sedasyon, metastaz, vasküler kasılma ve bağırsak hareketliliği gibi fizyolojik özellikleri sayesinde farmakolojik araştırmalarda öne çıkan bir model organizmadır (Rosa *et al.* 2022).

Zebra balığı bir balık türü olmasına rağmen, memelilerin gelişimsel sürecindeki toksisite testlerinde elde edilen bulguların yaklaşık %86 sına benzerlik gösterir ve teratojenik indeks hesaplaması yapılabilir (Cassar *et al.* 2020). Bu özellik, gelişimi etkilemesi düşünülen ilaçların zebra balığı üzerinde klinik öncesi çalışmalarla test edilmesini mümkün kılar. Örnek olarak, 60'lı yıllarda hamile kadınların mide bulantısı için reçetelenen ve doğan çocuklarda uzuv kaybı ile büyük bir faciaya yol açan talidomid ilacı, fareler üzerinde benzer etkiler oluşturmazken zebra balık modelinde benzer uzuv kaybına neden olmuştur (Patton *et al.* 2021).

Araştırılacak bileşiklerin emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımı (ADME) toksisitesi hakkındaki farmakokinetiği zebra balıkları üzerinde uygulanabilir (Patton *et al.* 2021; Rosa *et al.* 2022).

Zebra balıkları; gama-aminobutirik asit (GABA), glutamat, dopamin, serotonin, norepinefrin, histamin ve asetilkolin gibi yüksek omurgalılarınkiyle aynı nörotransmitter sisteme sahiptirler (Basnet *et al.* 2019). Zebra balığı modeli otizm gibi nörogelişimsel bozukluklara, depresyon ve anksiyete gibi nöropsikiyatrik bozukluklara ve Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıkların çalışılmasına olanak tanır (Cassar *et al.* 2020). Zebra balığının sahip olduğu bu nörolojik çalışma spektrumunun genişliği bu alandaki ilaç geliştirmelerine büyük katkı sağlar.

Çok sayıda ilaç retina ya da belirli görme yolları üzerinde toksik etki yapabilir. Bu nedenle gelişim aşamasındaki ilaç adaylarının retina toksisitesi nedeni ile üretimi süreçleri durdurulabilmektedir (Richards *et al.* 2008). Kemirgenler nokturnal canlılardır ve dolayısıyla retinaları Rod (çubuk) hücre yoğunluğuna sahiptir. Bu sebeple fare modellerinin en büyük dezavantajı düşük renk duyarlılığına sahip olmasıdır. Bahsedilen bu dezavantaja rağmen zebra balığı retinası insan retinasına özellikle koni fotoreseptör baskınlığı ile daha çok benzerlik gösterir (Goldsmith and Harris, 2003). Zebra balığı görme testlerinden elde edilen sonuçlar ile insanların ilaçlara verdiği oküler reaksiyonlar arasında uyum olduğu belirlenmiştir (Cassar *et al.* 2020). Sonuç olarak zebra balıkları ilaçların oküler toksisite özelliğini araştırmak için ön plana çıkan model organizmadır.

İnsanlarda glikoz homeostasini düzenleyen ilaçlar, hematopezi ve anemiye etkileyen ilaçlar ve kardiyovasküler ilaçların zebra balığı üzerindeki etkileri benzerdir. Ayrıca hematopoietik sistem üzerindeki etkileriyle Prohema, BMP sinyallemesini inhibe eden Dorsomorfin ve ototoksisiteyi azaltma potansiyeline sahip PROTO-1 gibi küçük moleküllerin farmakolojik özelliklerinin araştırmalarına ek olarak mevcut ilaçların yeni kullanım alanlarının araştırılması zebra balıkları üzerinde test edilebilir (MacRae and Peterson, 2015).

Zebra balıklarının kannabinoid toksisitesindeki kullanımı

Zebra balıkları nörolojik ve toksikoloji alanında güncel olarak kullanılan önemli bir model organizmadır. Kannabinoidlerin de yoğun toksik etkileri olduğu bilinmesine ek olarak sinir sistemini üzerinde etkiler meydana getirmesi zebra balığının kannabinoid toksisitesine çalışılması için ön plana çıkarmaktadır.

Uyuşturucuların kötüye kullanım potansiyeli ilaç geliştirme rol oynayan kritik bir faktördür. Zebra balığının bu alandaki ön plana çıkma sebebi fare ve primat modellerindeki

pahalılık ve zaman parametrelerini ortadan kaldırmasıdır (Cassar *et al.* 2020). Zebra balıkları uyuşturucu ve bağımlılık yapan maddelere duyarlıdır ve biyolojik etkilerini incelemek için kullanılmaktadır (Bian *et al.* 2022; Markin *et al.* 2021). Literatürde zebra balıklarının bağımlılık yapıcı maddelere karşı duyarlılığı son zamanlarda artış gösterir (Cachat *et al.* 2010). Zebra balığının insaninkine benzer metabolik enzimleri ve biyotransformasyonu gerçekleştiren sitokrom P450 enzimlerine sahip olmasından dolayı sentetik kannabinoidlerin metabolizmasını anlamak için kullanılırlar (Morales-Noé *et al.* 2022).

Endokannabinoid sistemin (ECS) zebra balıkları ve memeliler arasında büyük bir oranda korunmaktadır (Oltrabella *et al.* 2017) Zebra balığında CB1 ve CB2 reseptörlerine ek olarak endokannabinoid sistem ile ilgili genler ifade edilir (Chatzimitakos *et al.* 2022). Kannabinoid reseptörleri zebra balığının erken embriyonik döneminde tespit edilebilir (Amin *et al.* 2022; Licitra *et al.* 2021). Zebra balığı CB1 ve CB2 reseptörlerinin sırasıyla %66–75 ve %39 oranında memelilere benzerlik gösterir (Lachowicz *et al.* 2023). Zebra balığında CB1 reseptörünü bir gen kodlarken CB2 reseptörü iki gen tarafından kodlanan iki CB2 reseptörü vardır (Demin *et al.* 2018; Rodriguez-Martin *et al.* 2007). Zebra balığında bulunan bu ECS bağımlılık, anksiyete, gelişim, enerji homeostazı, öğrenme, gıda alımı, hafıza ve bağışıklık sistemi fonksiyonu ile ilişkilendirilmiştir (Chatzimitakos *et al.* 2022). Kannabinoid reseptörleri bazı süreçlerde kritik rol oynar, bu roller; hareketlilik, kalp atımı, uyarılara cevap verme, erken gelişim sürecinde hayatta kalma, motor nöron gelişimi gibi süreçlerdir. Embriyogenez sırasında kannabinoid reseptörlerinin inhibe olması yapısal ve lokomotor bozukluklara neden olur ve bu durum organizmayı ciddi sonuçlar doğurabilecek şekilde etkiler (Lachowicz *et al.* 2023).

Zebra balığında *cnr1* (kannabinoid reseptörü 1) geninin mRNA ekspresyonu döllenmeden yaklaşık 11 saat sonra tespit edilmeye başlar ve 15. güne kadar artış gösterir. *cnr1* ekspresyonu embriyonun döllenmeden sonraki 1. gününde preoptik alanda 2. günde ise serebrum, hipotalamus tegmentum ve ön ile arka beyin boyunca yayılır. Bu ifade parametreleri yetişkinlik döneminde devam eder ve memelilerinkine benzerlik gösterir. *cnr1* ayrıca merkezi sinir sistemi dışında karaciğer ve yumurtalıklarda da gözlemlenmiştir (Krug and Karl, 2015). *cnr2* (kannabinoid reseptörü 2) ekspresyonu 6 ve 24 hpf aralığında yüksek olarak gerçekleşir, ilerleyen dönemlerde ekspresyon gözlemlenmez (Son and Ali, 2022) Zebra balığında *cnr2* mRNA ekspresyonu beyin, kalp, retina, bağırsak, solungaç, kas, dalak ve hipofiz gibi çeşitli dokularda tespit edilmiştir (Krug and Karl, 2015).

Zebra balığı modeli kullanılarak yapılan bir araştırmada, embriyonik dönemde THC ve CBD'ye maruz kalan grupların (F0) ve onların sonraki kuşaklarında (F1) moleküler, davranışlar ve üreme parametreleri incelenmiştir. Maruziyet, morfolojik anormallik oluşturmazken, çeşitli

genlerinin ekspresyonunda değişikliklere yol açar. THC, F0 kuşaaında motor aktiviteyi azaltmış, F1 kuşaaında ise artırmıştır. CBD'nin F0 kuşaaı üzerinde etkisi gözlenmezken, F1 kuşaaında aktiviteyi azaltmıştır. Ayrıca, en yüksek THC dozuna maruz kalan F1 gruplarında anksiyete benzeri davranışlar ortaya çıkmıştır. Bu bilgilere dayanarak, zebra balığında kannabinoid maruziyetinin kuşaklar arası nörotoksik etkiler yapabileceği gözlemlenmektedir (Carty *et al.* 2019).

Başka bir çalışmada; farklı dozlarda *C. sativa* özütleri zebra balığı embriyo gelişimi, larva davranışı, sağ kalım ve mRNA ekspresyonu üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Yüksek doz *C. sativa* özütü kullanılan larva grubunda hareket kabiliyeti artmış ve *cnr1* ile *cnr2* kannabinoid reseptörlerinde aşırı ekspresyonu belirtilmiştir ama toksik etki belirlenmemiştir (Licitra *et al.* 2021).

Sentetik kannabinoid olan MDA-19'un zebra balığı embriyolarında davranış, oksidaif stres, nörogelişimsel ve metabolik etkileri araştırılmıştır. Düşük dozlarda MDA-19, embriyoların yumurtadan çıkmasını hızlandırmış, malformasyon ve ölüm olmadan vücut uzunluğunu azaltmıştır. Tüm dozlarda yüzme davranışı ve aktif süre azalmış spinal motor nöron gelişimi bozulmuştur. Yüksek dozlarda ise reaktif oksijen türleri (ROS) artmış, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktivitesi yükselmiştir. MDA-19 ayrıca enerji metabolizmasıyla ilgili birçok biyolojik yolu etkilemiştir (Xu *et al.* 2025). Tüm bu bulgular, zebra balığının kannabinoidlerin nörotoksik etkilerini değerlendirmek adına güçlü ve duyarlı bir model organizma olduğunu ortaya koymaktadır. Hem doğal hem de sentetik kannabinoidlerin gelişim dönemine bağlı olarak davranışsal, moleküler ve fizyolojik düzeyde çeşitli etkiler oluşturduğu görülmektedir. Bu nedenle, zebra balığı modeli üzerinden gerçekleştirilecek yeni çalışmalar; toksisite profillerinin, gen ekspresyon dinamiklerinin ve nörogelişimsel süreçlerin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Toksikogenomik Analiz İçin Seçilen Zebra Balığı Genleri

Apoptoz ile ilgili genler (*casp3a*, *casp8*, *ifng1*, *tr53*)

Çok hücreli canlılarda hücre ölümü organizmanın gelişimi, homeostasi ve doku bütünlüğünde önemli rol oynar (Jan and Chaudhry, 2019). Vücuttaki hücrelerin çoğalması ve ölümü denge içerisinde olmalıdır. Hücrelerin ölümü kontrollü bir şekilde gerçekleşmesine ek olarak travma sonucu istemsiz bir şekilde hücre ölüm gerçekleşir. Yetişkin bir insanda günde ortalama 1011 hücre apoptozis kontrollü programlanmış hücre ölümüne uğrar bu da bir yılda vücut ağırlığına denk gelecek kadar hücrenin öldüğün anlamına gelebilir (Newton *et al.* 2024).

Apoptoz en iyi bilinen ve gerçekleşme yolakları anlaşılmış kontrollü hücre ölümdür. Nekroz ise travma ve akut dış hasarlara tepki sonucu hücrenin zarar görerek ölmesi ile sonuçlanır (Xu *et al.* 2019). Nekroz pasif bir süreçtir ve hücrenin şişmesi hücreyel organellerin gerilmesi, DNA'nın kümelenmesi ve rastgele parçalanması, hücre membranının ekzositozu ve otofaji ile sonuçlanır (Syntichaki and Tavernarakis, 2002). Nekroz sonucunda inflamatuvar etki gözlemlenir.

Programlanmış hücre ölümü, hücrelerde genetik olarak kontrol edilen, moleküler mekanizmalar tarafından düzenlenerek bir şekilde hücrelerin ölmesini sağlayan karmaşık bir süreçtir ve hem sağlıklı yaşam sürdürölmesinde hem de hastalıkların gelişiminde kritik rolleri vardır (Yuan and Ofengeim, 2024). Apoptozis hücrelerin kendi ölümünde aktif bir şekilde rol oynadığı hücre ölümü mekanizmasıdır (Bredesen, 1995). Apoptozis en temelde programlanmış-kontrollü hücre ölümü olarak tanımlanabilir. Ancak apoptozis hücrelerde gerçekleşen tek kontrollü hücre ölümü değildir. Nekroptoz, piroptoz, otofajik hücre ölümü, mitoptoz, paraptosis, NETosis, ferroptosis, otozis, lizozomal hücre ölümü, immüyonik hücre ölümü, alkaloptosis gibi hücre öölmleri de kontrollü bir şekilde gerçekleşen programlanmış hücre ölüm tipleri olarak tanımlanır (Park *et al.* 2023).

Apoptoziste hücre büzölmesi, nükleer DNA'nın parçalanması ve membranın kabarması gibi tipik morfolojik ve biyokimyasal süreçler gerçekleşir (Debatin, 2004). Apoptozis morfolojik bir süreç olduğundan ışık veya elektron mikroskopy ile gözlemlenebilir. Apoptoz sonucunda inflamatuvar etkiye yol açmadan fagositoz ile temizlenebilen apoptotik cisimler meydana gelir (Reed, 2000). Apoptoz fetüste parmakların ayrılması (D'Arcy, 2019), DNA hasarı ve genotoksik stres (Pistritto *et al.* 2016), normal hücre dönüşümü, bağışıklık sisteminin gelişimi ve işleyişi, hormona bağlı atrofi (Elmore, 2007) ve patojenlere karşı hücre savunması (Ampomah and Lim, 2020) gibi süreçlerde önemli rol oynar. Apoptoz sırasında meydana gelen kusurlar kanser, restenoz, inme, kalp yetmezliği, nörodejenerasyon ve AIDS gibi birçok hastalığın ilerlemesi ve gerçekleşmesine katkıda bulunur (Reed, 2000).

Apoptotik hücreler kaspaz olarak adlandırılan sistein proteaz ailesi enzimlerinin düzenlediği, özğün morfolojik ve biyokimyasal değişiklerle hücre ölümü yoluna girerler. Bu süreçte çeşitli hücre içi ve hücre dışı sinyallerin etkisiyle kaspazların aktivasyonu ile apoptotik hücre ölümüne giden yol başlar (Zimmermann and Green, 2001). Kaspazlar katalitik olarak zimogen olarak üretilir (Martin and Elkon, 2004). Hücre hasarı tespit edildiğinde prokaspaz formunda bulunan başlatıcı kaspazlar uygun sinyal yolakları (DISC veya apoptosom) aracılığıyla aktif edilir. Aktif olan başlatıcı kaspazlar infazcı kaspazları aktif hale getirir. İnfazcı kaspazların aktivasyonu nükleer proteinlerin ve sitoskeletonun yıkımı, DNA parçalanması ve

apoptotik cisim oluşumu gibi süreçlerin başlamasına yol açan bir dizi olayın başlamasını sağlar (D'Arcy, 2019).

Apoptozda iki ana yol vardır.; dışsal ve içsel. Dışsal yol hücre zarında bulunan ölüm reseptörlerinin TNF (tümör nekroz faktörü) ve Fas ligandları ile etkileşime girerek tetiklenir (Xu *et al.* 2019). Hücre dışı ligandlar ölüm reseptörlerin bağlandıktan sonra ölüm indükleyen sinyal kompleksleri (DISC) oluşur ve kaspaz-8, kaspaz-10 gibi başlatıcı kaspazları aktive eder. Başlatıcı kaspazlar kaspaz-3, -6, -7 gibi efektör kaspazları aktive eder (Park *et al.* 2023).

İçsel yol mitokondri aracılığıyla gerçekleşir. Mitokondriyal yol Bcl-2 proteinleri tarafından kontrol edilir bu protein ailesi proapoptotik ve antiapoptotik aktiviteye sahip üyeler içerir. Proapoptotik proteinler aktif edildiğinde mitokondride tutulan proteinlerin mitokondri membran geçirgenliğini artırarak intermembran boşluğa salınmasını sağlar. Bu proteinleri en önemlisi sitokrom-c dahil Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, endonükleaz G ve AIF'dir (Antonsson, 2004). Sitokrom c apoptozu oluşturmak için APAF-1 ve kaspaz-9 ile ilişki kurarak kaspaz-9'un aktivasyonunu sağlayarak kaspaz-3, -6 ve -7'nin aktifleşmesini sağlar. Böylece apoptoz tetiklenir (Voss and Strasser, 2020).

Hücre döngüsü bileşenlerindeki düzensizlik, mitotik süreci bozarak apoptoza yol açabilir (King and Cidlowski, 1995). Hücre döngüsünün ilerlemesinden sorumlu birçok onkogen aynı zamanda apoptozu tetikler (Evan *et al.* 1995). Tümör baskılayıcı olan p53 proteinini DNA hasarı, hipoksi ve belirli onkogenlerin ekspresyonu gibi uyarılar ile apoptozu başlatır. p53 ekspresyonuyla antiapoptotik faktörleri (örn. Bcl-2) baskılarken proapoptotik faktörleri (örn. Bax) aktive ederek apoptoza giden yolu açar (Xu *et al.* 2019). p53 proteini kodlayan *tp53* geninde meydana gelen mutasyonlar p53 proteinin tümör baskılama özelliğini kaybetmesine ve yeni onkojenik özellikler kazanmasına neden olur (Mao and Peng, 2023). Bu olaylar sonucu hücre apoptoza uğramaz ve daha kötüsü kanser meydana gelebilir. Bu çalışmada kullanılan sentetik kannabinoidin gelişim süreci boyunca hücre düzeyinde apoptoz mekanizmalarını etkileyebileceği düşünüldüğünden, apoptoz ile ilişkili belirli genlerin ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. Bu analiz davranış değişikliklerinin ve nörogelişimsel bozuklukların altında yatan sebeplerin anlaşılmasına katkı sağlayabilir.

casp3a

casp3a geni zebra balıklarının 1.kromozomu üzerinde yer alır (Ensembl, 2024). Zebra balıklarında insan *CSAP3* geninin iki ortoloğu (*casp3a*, *casp3b*) bulunmaktadır. *casp3a* geni tarafından üretilen enzim insan *CASP3* geninde üretilen enzimle %61,8 oranında benzerlik gösterir. Zebra balığı *casp3a* enziminin substrata bağlanmasının birkaç istisnasına rağmen

CASP3 enzimiyle benzerlik gösterir (Tucker *et al.* 2016). Zebra balığı embriyosunun 24 hpf'de *casp3a* koku plakodunda, diensefalonda, orta ve arka beyinde güçlü bir şekilde ifade edilir. 48, 72 ve 96 hpf'de beyin ve retinada fazla yoğun ifade edilmesine ek olarak 96, saatte karaciğer ve rektal ampulde güçlü bir şekilde ifade edilir (Spead *et al.* 2018).

casp8

Zebra balığı *casp8* geni memeli *casp8* genlerine benzer bir genomik organizasyona sahip olup 10 ekzondan meydana gelir. Zebra balığının *casp8* geni insanların 2.kromozomun uzun koluna ortolog olan bağlantı grubu (LG) 6'da (6.kromozoma denk gelen bölge) bulunmaktadır. Ayrıca zebra balığı *casp8* geni memelilerin *CASP8* ortologlarına benzer yapı ve işlevleri bulunmaktadır (Sakata *et al.* 2007).

ifng1

İnterferonlar (IFN) virüslerin gelişimini engelleyen sitokinlerdir. Yüksek omurgalılarda IFN ailesi üyeleri genetik olarak üç farklı alt tipe ayrılır bunlar tip I, II, III'dür. Her farklı IFN tipi farklı bir ligand konformasyonundan ve reseptör kompleksinden oluşur (Shibasaki *et al.* 2024). *ifng* edinilmiş bağışıklık ve doğuştan gelen bağışıklık tepkilerinde rol oynar. Memelilerde *ifng* geni tip II IFN grubunun tek üyesiyken balıklarda iki tür *ifng* bulunur. Bunlar *ifn1* ve *ifng2*'dir. Balıklardaki *ifng* geni 4 ekzon ve 3 introndan oluşur. Balık *ifng* genleri düşük amino asit sayısı ve memelilerin *ifng* amino asit özdeşliği/benzerliği düşüktür. Balıklardaki her iki *ifng* baş böbrek (bağışıklık, kan hücresi üreten organ), dalak, bağırsak ve bağışıklık hücrelerin de ifade edilir. *ifng2* geni *ifng1* geninden daha çok ifade edilir (López-Muñoz *et al.* 2011). *ifng1* geni zebra balığının 4. Kromozomunda yer alır (Ensembl, 2024).

tp53

Çok hücreli organizmalarda tümör baskılayıcı gen (*tp53*) çeşitli hücrel streslere yanıt vererek hücre döngüsünün durmasına veya apoptozun tetiklenmesinde rol oynar. Zebra balığında yüksek derecede korunmuş *tp53* geninin DNA bağlanma bölgesi 97 ile 292. kodonlar arasında bulunur ve 4 ile 8. ekzonlar içinde kodlanır. Bu durum insanlarınkilerle aynıdır (Berghmans *et al.* 2005). Zebra balığının *tp53* geni 5. Kromozomda bulunur ve 20 ekzon bölgesi içerir (UniProt, 2025).

DNA tamiri ile ilgili gen (*rad51*)

Hücreler DNA'ya zarar verebilecek ve genomik kararsızlığa yol açabilecek endojen ve eksojen ajanların saldırılarına sürekli olarak maruz kalır. Bu lezyonlar DNA'da yapısal hasara sebep olup DNA replikasyonu veya transkripsiyon gibi hücrel süreçlerin değişmesine veya ortadan kalkmasına sebep olabilir (Dexheimer, 2013). Hücreler bu hasarlara karşı DNA onarım

yanıtları ve hedeflenen onarımların sonuçlarının düzenlemesini sağlayan birbirine bağlı DNA onarımından sorumlu karmaşık bir sisteme sahiptir (Minten and Yu, 2019). DNA'da meydana gelen hasara karşılık olarak hücre döngüsü geçici olarak durdurulur; bu durum bölünme ve replikasyon öncesinde onarım süreçlerinin gerçekleşmesi için hücreye kritik bir süre kazandırır. Ancak hasarın boyutu onarımı aşacak düzeydeyse hücre, ağır hasarlı ve işlevsiz hücrelerin çoğalmasını engellemek için apoptozis sürecini devreye sokabilir (Schärer, 2003).

DNA onarımı 5 ana yola ayrılabilir. Bunlar uyumsuzluk onarımı (MMR), homolog rekombinasyon onarımı (HRR), homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ), nükleotid çıkarma onarımı (NER) ve baz çıkarma onarımıdır (BER) (Bernstein *et al.* 2002). Bu onarım yollarından BER ve NER genellikle tek zincir hasarlarında görev alırken HRR ve NHEJ yolları çift zincir kırıkları onarımında görev alır. Çift zincirli DNA kırıkları (DSB'ler), genom bütünlüğünü tehdit eden ciddi hasarlardır ve omurgalı hücrelerde her replikasyon turunda az da olsa kendiliğinden oluşabilir. Bu hasarlar genellikle homolog rekombinasyon (HR) ile onarılır ve HR mekanizması bozulduğunda hücre yaşamını sürdüremez. Özellikle tümör hücrelerinde, HR eksikliği genomda düzensizliklere neden olur. DSB onarımı genellikle HRR ve NHEJ yollarının bir kombinasyonu ile gerçekleşir. Ayrıca, bakterilerden insanlara kadar pek çok canlıda HRR süreci, RecA/Rad51/Dmc1 rekombinaz protein ailesi tarafından yönlendirilir (Haber, 2018).

Zebra balığı memelilerin sahip olduğu tüm DNA onarım genlerinin ortologlarına sahiptir (Canedo and Rocha, 2021). Zebra balığı genomunda bulunan uyumsuzluk onarımı, nükleotid çıkarma onarımı, homolog olmayan uç birleşimi, homolog rekombinasyon, baz çıkarma onarımı ve geri dönüş mekanizması gibi farklı DNA onarım yollarında yer alan birçok gen örnek verilebilir (Pei and Strauss, 2013). Embriyonik gelişim sürecinde meydana gelen DNA hasarlarının davranışsal ve morfolojik anomalilere yol açabileceği bilindiğinden, DNA onarımında görev alan genlerin ekspresyonları da çalışmaya dahil edilmiştir. Bu durum, maruz kalınan bileşiğin hücresel düzeydeki etkilerini anlamaya yardımcı olması hedeflenmiştir.

rad51

HR yoluyla DNA onarımında önemli bir adım olan homolog iplik değişiminde rol oynar. Homoloji arama ve iplik değişimi için gerekli olan nükleoprotein oluşturmak üzere ATP bağımlı bir şekilde tek iplikli DNA'ya (ssDNA) bağlanır. Homolog DNA çiftleri arasında homolojinin tanınması ve iplik değişimini katalize ederek işlenmiş DNA kopyası ile onarım şablonu arasında ortak bir molekül oluşturur. Replikasyon hatası sırasında oluşmuş replikasyon çatalını çözmek için ve ayrıca iplikler arasında çapraz bağ onarımında görev alır (UniProt, 2025). *rad51* genin zebra balığının 20. kromozomunda bulunur. Bu gen 4 transkript, 216 ortolog ve 6 paraloğu bulunur ve 15 fenotiple ilişkilendirilmiştir (Ensembl, 2025).

Dopamin sistemi ile ilgili genler (*dat, drd1, drd3*)

Dopamin çoğu ökaryotik hücrelerde bulunan katekolamin grubu nörotransmitter olarak görev alan bir moleküldür (McHugh and Buckley, 2015). Dopamin merkezi sinir sisteminde ve periferde sentezlenen G-proteini bağlı reseptörlere bağlanarak etkilerini gösterir. Dopamin reseptörleri vücutta yaygın olarak ifade edilir. Dopaminerjik sinyal yolları fizyolojik süreçlerin sürdürülmesinde önemlidir ve dengesiz aktivasyonu nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili işlev bozukluklarına yol açabilir (Klein *et al.* 2019).

Dopamin vücutta; koku soğanı ve retinadaki duyuşsal algının erken safhalarında, öğrenme, hafıza, vücut sıcaklığı, beslenme, duyuşsal ve motivasyon ile ilgili süreçlerde ve omurilik soğanındaki belirli bölgelerde kimyasal hassasiyeti modüle etmek gibi birçok işlevi bulunmaktadır (Yamamoto and Vernier, 2011). Dopamin beyinde tirozin amino asidinden karaciğerde ise fenilalanin amino asidinden fenilalanin hidroksilaz enzimi ile üretilir. Katekolaminerjik nöronlar içerisinde tirozin, tirozin hidroksilaz ile L-dopa molekülüne, L-dopa molekülünde, dopa dekarboksilaz enzimi ile dopamine dönüştürülür (Ayano, 2016).

Dopamin reseptörleri iki gruba ayrılır ve beş alt tipi vardır. D1- benzeri reseptör sınıfı D1 ve D2 alt tipini içerirken D2- benzeri reseptör sınıfı D2, D3 ve D4 alt tipin içerir (Neve *et al.* 2004). D1-benzeri reseptörler çoğunlukla postsinaptik bölgede bulunurken D2-benzeri reseptörler hem prosinaptik hem de presinaptik nöronlarda bulunur (Jaber *et al.* 1996). Orta beyin dopamin nöronlarının yoğun olduğu bölgedir. Ventral tegmental alanda, substantia nigra ve tertorubral gibi orta beyin bölgesinde bulunan dopamin nöronları ödöl, öğrenme, hafıza ve hareket gibi işlevlerde rol alırlar (Nair-Roberts *et al.* 2008).

Dopamin taşıyıcısı (DAT) plazma membranında bulunan hücre içi ve hücre dışı dopamin konsantrasyonlarını düzenleyen bir proteindir (Canzian *et al.* 2024). DAT presinaptik terminalde yer alır. DAT dopaminin ekstraselüler boşluktan geri alımını sağlar ve dopaminerjik nörotransmisyonu sonlandırır (Li *et al.* 2024). Bu sayede dopaminin postsinaptik hücrelere bağlanması azalır ve dopaminin etkisi sona erer. Dopamin daha önce vurgulandığı gibi katekolaminerjik bir nörotransmitter olup başta motor kontrolü, motivasyon, ödöl ve bilişsel süreçlerde önemli ve karmaşık sinyal yollarını aktive eder. Bu sinyal iletim yollarında bozulmalar Parkinson, şizofreni, huntington hastalığı, dikkat eksikliği/hiperaktivite bozukluğu (DEHB) ve madde bağımlılığı gibi hastalıkların patogeneze katkı sağladığı gösterilmiştir (Klein *et al.* 2019). Dopamin sisteminin nörolojik uyarılabilirlik ve motivasyonel davranışlar üzerindeki etkisi nedeniyle, bu çalışmada dopamin taşıyıcıları ve reseptörlerine ait genlerin transkript düzeyleri incelenmiştir. Davranışsal hipoaktivitenin altında yatan nörotransmitter düzeylerindeki değişimleri anlama açısından bu genler önemli bir role sahiptir.

dat

Zebra balığı modelinde *dat* geni yalnızca dopamin sentezleyen nöronlarda ifade edilen ve transmembran yapıda bir protein kodlayan genidir. İnsan *dat* geni zebra balığı *dat* geni ile yüksek düzeyde benzerlik göstermektedir. Zebra balığı embriyosunda *dat* geninin ifade edildiği ilk bölge ventral diensefalon (18-20. hpf) olup sırayla olfaktör bulbus (48 hpf), retina (amacrine hücreler 60 hpf), pretektum (72 hpf), optik sinir çevresindeki astrositler gibi bölgelerde zamanla ifade edilmeye başlar (Holzschuh *et al.* 2001).

drd1

Zebra balığı D1 benzeri dopamin reseptör genleri diğer omurgalı genleriyle yüksek oranda homologdur, bu benzerlik özellikle transmembran bölgelerde %80'e ulaşmaktadır (Shontz *et al.* 2018). Zebra balığı embriyolarında *drd1* geni yaklaşık 30 saat sonra arka beyinde göllenmeden sonraki 48 saat sonra ön ve arka beyin gibi bölgelerde ekspresyonu tespit edilir. Retinana gelişimi sırasında *drd1* ekspresyonu belirli bölgelerde gözlemlenirken yetişkin zebra balığı retinasında *drd1* ekspresyonu dış nükleer tabaka ve ganglion hücre tabakasında da görünür. Zebra balığında *drd1* geni bağlantı grubu 21 (LG21) pozisyonunda bulunur (Li *et al.* , 2007).

drd3

Zebra balığının 'da tek bir D3 dopamin reseptör geni (*drd3*) tanımlanmıştır ve bu gen memelilerinkiyle %64-67 oranında amino asit benzerliği gösterir. Zebra balığı *drd3* genlerinin ekzon ve intron organizasyonu memelilerinkiyle oldukça benzerdir. *drd3* geni ifadesi zebra balığında ilk olarak somit oluşumu sırasında ifadesi gözlemlenir daha sonra merkezi sinir sistemi boyunca ifade edilir (Boehmler *et al.* 2004). Zebra balığı *drd3* geni 24. Kromozom üzerinde bulunur ve 14 ekzona sahiptir (UniProt, 2025).

Serotonin ile ilgili genler (*5ht1aa*, *5ht1a*, *5ht1b*, *5ht2c*)

Serotonin hem bitki hem de hayvanlarda evrensel olarak yaygın bir şekilde bulunur (Kema *et al.* 2000). Bu sebeple serotoninin filogenetik olarak korunmuş bir molekül olduğunu anlaşılır. Serotonin merkezi sinir sisteminde nörotasmiter periferde ise dolaşım hormonu olarak homeostaziden sorumlu bir monoamindir (Kawai ve Rosen, 2010). Serotonin periferde trombosit agregasyonu, damar tonusu, hiper tansiyon ve bağırsak hareketliliğinden sorumluyken beyinde ruh hali, vücut sıcaklığı, uyku-uyanıklık döngüsü, kusma, cinsel davranış, saldırganlık, nosisepsiyon ve enerji dengesi ile ilişkilendirilir, (Marston *et al.* 2011).

Serotonin esansiyel bir amino asit olan triptofandan sentezlenen bir indol ve bir karbosi-amid yan zincirinden oluşan bir indolamindir. Triptofan ilk önce triptofan hidroksilaz (TPH)

enzimi aracılığıyla 5-hidroksitriptofana (5-HTP) daha sonra aromatik L-amino asit dekarboksilaz (AAAD) enzimi ile 5-hidroksitriptamine (serotonin, 5-HT) dönüştürülür (Lam *et al.* 2010). TPH enziminin iki izoformu bulunur ve hız sınırlayıcı özelliği vardır. TPH1 periferde bulunurken TPH2 izoform enzimi merkezi sinir sisteminde bulunur (Swami ve Weber, 2018). Serotonin kan-beyin bariyerini geçemez. Bu sebeple beyin ve periferik serotonin sistemleri büyük oranda birbirinden fonksiyonel olarak ayrılır (Yabut *et al.* 2019). Bu sebeple TPH enziminin iki farklı izoformu olduğu düşünülebilir.

Merkezi sinir sistemindeki serotonin üretimi beyin sapında üretilen raphe çekirdeklerinde bulunan serotoninerjik nöronlardan gerçekleşir. Bu serotoninerjik nöronların aksonları özellikle dorsal raphe çekirdeği, median raphe çekirdeği ve alt beyin sapının komşu çekirdeklerinden çıkarak korteks, limbik sistem, mezensefalon ve arka beyin gibi beynin farklı bölgelerine uzanır ve burada sonlanır (Pourhamzeh *et al.* 2022).

Vücuttaki serotoninin yaklaşık %95'i dolaşım sisteminden ve bağırsak lümeninden gelen sinyaller aracılığıyla enterokromofin hücreleri tarafından üretilir ve salgılanır (Liu *et al.* 2021). Ayrıca serotonin sentezi pankreastaki beta hücreleri, yağ hücreleri ve osteoklastlar gibi dokularda üretilirken ayrıca monositler, mast hücreleri, makrofajlar, B hücreleri, T hücreleri ve dentrik hücreler gibi bağışıklık hücreleri tarafından da üretilir (El-Merahbi *et al.* 2015). Trombositler serotonin depolarına sahiptir fakat serotonin üreten enzimleri bulunmaz (Berger *et al.* 2009). Kanda bulunan serbest serotonin trombositler tarafından alınır ve depolanır ve daha sonra trombositlerdeki serotonin salınarak hemostatik süreçlere katılır (Veenstra-VanderWeele *et al.* 2000).

Serotonin yedi ana reseptör aile (5-HT1-5HT7) altında toplanan 15'ten fazla reseptör alt tipine bağlanarak fizyolojik etkilerini gösterir. Her reseptör farklı genler tarafından kodlanan reseptör alt gruplarına ayrılır (Adayev *et al.* 2005). Serotonin ana reseptörlerinin altısı G-proteini bağlı reseptörlerdir ancak 5-HT3 iyon kanalı bağlı reseptördür (Mohammad-Zadeh *et al.* 2008). 5-HT2, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT6, 5-HT6 ve 5-HT7 reseptörleri uyarıcı etki gösterirken 5-HT1 ve 5-HT5 reseptörleri inhibitör etki gösterir (Pytliak *et al.* 2011). 5-HT1 reseptörleri adenil siklaz inhibe etmek ve iyon kanallarını düzenlemek için G alfa i/G alfa o proteinleri ile etkileşime girer (Lanfumei and Hamon, 2004). 5-HT1A, raphe çekirdeklerinde presinaptik olarak serotoninin fazla salınımını inhibe eder hem de postsinaptik olarak belirli bölgelerde dopamin salınımını düzenler. 5-HT1 reseptörleri anksiyete ile ilişkilendirilmiştir. Bu sebeple anksiyete ve depresyon tedavisinin hedef reseptörüdür. 5-HT5 Alt Tipleri 5A ve 5Bdir. 5-HT5 alt ailesi hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. 5-HT5A, insan korteksi ve beyinciğinde bulunmuştur. Hayvan modellerinde hafıza ve startle (irkilme) refleksiyle ilişkilendirilmiş. 5-

HT2A, 2B, 2c reseptörleri hücre içi Ca^{2+} artışı ile ilişkilendirilir. 5-HT2A: kortekste fazla ifadesinin bulunur ve halüsinojenler ile belirli ilişkisi bulunmaktadır. Ayrıca şizofreni, depresyon ve tourette sendromu gibi hastalıklarla ilişkilidir. 5-HT2C: merkezi sinir sisteminde yaygın olarak bulunur. Dopamin salınımını negatif düzenler. 5-HT4: bağırsaktaki peristaltik hareketlenmeden ve hipokampüste uzun vadeli potansiyasyonla ilişkilendirilir (McCorvy ve Roth, 2015). 5-HT3 diğer serotonin reseptörlerinden farklı olarak ligand kaplı iyon kanallarından oluşur ve beş alt birimden oluşur (Thompson and Lummis, 2006). Migrenle ilişkilendirilmesine ek olarak bağımlılık yapan maddelerin kronik kullanımının kesilmesiyle ortaya çıkan davranışların baskılanmasıyla ilişkilendirilmiştir. 5HT6 reseptörleri laboratuvar hayvanlarında mekânsal hafıza ile ilişkilendirilmiştir. 5HT7 ise damarlarda bol miktarda, düz kas ve merkezi sinir sistemin 'de de ifade edilir (Pytliak *et al.* 2011). Serotonin sistemi, stres yanıtı, duygudurum regülasyonu ve motor aktiviteyle ilişkili olması nedeniyle, çalışmada serotoninle ilişkili genlerin ekspresyonu analiz edilmiştir. Bu sayede gözlenen davranışsal etkilerin olası nörokimyasal temelleri ortaya konulmaya çalışılmıştır.

5htr1aa

Zebra balığında 5-HT1A reseptörünün iki homoloğu olan gen tanımlanmıştır. Bunlar *ht1aa* ve *ht1b*'dir. Ayrıca insan 5-HT1B ve 5-HT1D reseptör benzerliğine sahip üçüncü bir 5-HTab olarak bilinen reseptör bulunmaktadır (Klee *et al.* 2012). 3 günlük zebra balığı larvalarında *htr1aa* ekspresyonu pretektumda, dorsal ve ventral talamusun lateral kısmında, preoptik alanda, ara ve üst retiküler formasyonda ve serebellar plakada bulunur. Ayrıca retinanın amacrin hücrelerinde *htr1aa* ifadesi tespit edilir (Norton *et al.* 2008). *Ht1aa* geni zebra balığının 8. Kromozomunda bulunur ve 1 ekzona sahiptir (UniProt, 2025).

5ht1a

5ht1a reseptörleri merkezi sinir sisteminde presinaptik otoresptörler ve postsinaptik heteroresptörler olmak üzere iki alanlarda bulunur. Otoresptörlerde 5ht1a serotonin salınımını negatif geri bildirim yoluyla baskılar. Heteroresptörlerde ise serotoninin stres, kaygı bilişsel işlevler ve duygu durumu üzerinde etkilerden sorumludur (Albert and Vahid-Ansari, 2019). Ayrıca zebra balıklarında 5-ht1a reseptörlerinin anksiyete benzeri davranışlarda rolü bulunmaktadır (Bruce de Souza *et al.* 2025).

5ht1b

5-ht1b reseptörleri G-proteni bağlı reseptörlerdir. Presinaptik ve postsinaptik alanlarda etki gösterirler. Postsinaptik reseptörler serotonin aktivitesini hedef nöronlara iletir. Presinaptik serotonin negatif geribildirim etkisiyle kendi salınımını inhibe eder (Norton *et al.* 2008). Zebra

balıklarında 5-ht1b reseptörleri anksiyete ve yeniliklere karşı tepkilerle ilişkilendirilmiştir (Maximino *et al.* 2015).

5ht2c

Zebra balığı 5ht2c geni 7.kromozomda bulunur. 5ht2c geni geç embriyo döneminde sinir dokuda eksprese edilir, diğer dokularda ekspresyonu gözlemlenmez. Gelişimin erken dönemlerinde ise farklı dokularda ekspresyonu gözlemlenir (Schneider *et al.*, 2012). Zebra balıklarında 5ht2c reseptörleri sosyal davranışlar ve savunma davranışlarında rolleri bulunmaktadır (Moura *et al.* 2023).

GABA sistemi ile ilgili genler (*gabra1, gat1, abat, gad1b*)

Gama-aminobütirik asit (GABA) mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan, protein sentezine katılmayan bir amino asittir (Zhang *et al.* 2024). GABA öncelikle merkezi sinir sisteminde önemli bir inhibitör nörotransmitter olarak görev alır. Bunun yanı sıra merkezi ve periferik sinir sisteminde hatta bazı nöral olmayan dokularda da farklı işlevler üstlenen çok yönlü bir moleküldür (Watanabe, *et al.* 2002). GABA ayrıca nöral progenitor hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması ve göçüne ek olarak sinaps olgunlaşması ve nöritogenez süreçlerinde de önemli roller üstlenir (Kihara, 2024).

GABA'nın fizyolojik işlevleri arasında sinaptik iletimin düzenlenmesi, gevşemenin desteklenmesi ile uykusuzluk ve depresyonun önlenmesi yer almaktadır. Ayrıca, daha önce belirtildiği gibi GABA'nın periferik dokular ve organlar üzerindeki etkileri çeşitli farmasötik özelliklerle ilişkilendirilmiştir. Bu etkiler arasında antialerjik, antioksidan, anti-inflamatuar, anti-diyabetik, antimikrobiyal, hepatoprotektif ile böbrek koruyucu ve gastrointestinal sistemi destekleyici özellikler bulunmaktadır (Ngo and Vo, 2019).

GABA hücrelerde glutamik asit dekarboksilaz (GAD) enzimi tarafından glutamat amino asidinden üretilir (Braga *et al.* 2024). GAD enziminin GAD65 ve GAD76 olmak üzere iki formu bulunur. GAD67 nöral hücre sitoplazmasında eşit şekilde dağılıp nörotransmisyon dışında GABA şantında enerji üretimi, antioksidan etki ve sinaptogenez için trofik faktör olarak işlevleri gerçekleştirmek için GABA üretimini sağlarken GAD65 ise sinir terminalinde yoğunlaşp nörotransmisyon için GABA üretir (Buddhala *et al.* 2009). GABA üretildikten sonra akson terminalindeki veziküllerde depolanır. Veziküllerde biriktirilen GABA'lar salınımın gerçekleştirmesi için veziküller nöral membranla birleşerek ekzositoz yoluyla sinaptik boşluğa bırakılır. Serbest bırakılan GABA molekülleri GABA reseptörlerine bağlanarak etkisini gösterir. (Sarasa *et al.* 2020). Daha sonra sinaptik boşlukta bulunan GABA molekülleri GABA taşıyıcıları (GAT) tarafından ortamdan uzaklaştırılır (Yadav *et al.* 2025). GABA taşıyıcıları

sodyum bağımlı taşıyıcılardır ve GABA molekülünün hücre dışı konsantrasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (Scimemi, 2014).

Farmakolojik ve elektrofizyolojik özellik farklılıklarına dayanarak üç farklı GABA reseptörü tanımlanmıştır. Bu reseptörler GABA A, GABA B ve GABA C reseptörleridir. GABA A ve GABA C reseptörleri ligand kaplı iyon kanallarından oluşurken GABA B reseptörü G protein bağımlı reseptördür (Enz, 2001). GABAA reseptörleri pre- ve postsinaptik bölgelerde çok fazla yayılım gösteren klorür kanallarıdır. GABA molekülleri GABA A reseptörlerine bağlandıktan sonra ligand bağlı iyon kapıları açılır ve hücre içerisine negatif yüklü klorür iyonlarının girişini sağlayarak hücre zarının hiperpolarize olmasını sağlar ve nöral ateşlemeyi azaltır (Burt, 2003). Bu sayede GABA molekülleri inhibitör etkisini gerçekleştirir. GABAA reseptörleri beş alt birim proteinlerden oluşur. Memelilerde 19 farklı GABAA reseptör alt birimi ($\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, δ , ϵ , π , θ ve $\rho 1-3$) bulunurken zebra balıklarında 23 GABAA reseptörü alt birimi ($\alpha 1$, $\alpha 2a$, $\alpha 2b$, $\alpha 3-5$, $\alpha 6a$, $\alpha 6b$, $\beta 1-4$, $\gamma 1-3$, δ , π , ζ , $\rho 1$, $\rho 2a$, $\rho 2b$, $\rho 3a$ ve $\rho 3b$) bulunmaktadır (Sadamitsu *et al.* 2021). GABAB reseptörleri G proteinlerine bağlı yapılarıyla merkezi sinir sistemin’de nöronal uyarılabilirliği ve sinaptik iletimi düzenler. Gai/o proteinlerini aktive ederek potasyum ve kalsiyum kanallarını modüle ederek cAMP yollarını tetikler (Lujan and Ciruela, 2012). GABAC reseptörleri retina, omurilik, hipofiz ve gastrointestinal bölgelerde işlevseldir. GABAC reseptörleri mss’de GABA reseptörüne göre daha az miktarda ve daha az yaygın dağılım gösterir (Johnston *et al.* 2003).

GABA molekülünün katabolizması özellikle mitokondride lokalize olan ve ABAT geni tarafından kodlanan GABA transaminaz (GABA-T) proteini tarafından gerçekleşir (Besse *et al.* 2015). GABA-T enzimi ayrıca GABA üreten nöronlar ve astrositler (yıldız şeklinde gözlemlenen glial hücreler) gibi hücrelerin üretimi ve geri alınımı sonucu hücrede bulunan GABA moleküllerini parçalar (Park *et al.* 2025). GABA-T, GABA ile alfa ketoglutarat ko-sübstratını birlikte kullanarak transaminasyon reaksiyonula glutamat ve süksinik semialdehit sentezini katalizler. Daha sonra süksinik semialdehit süksinik semialdehit dehidrogenaz enzimiyle (SSADH) süksinata dönüştürülerek TCA (trikarboksilik asit) döngüsüne katılması sağlanır (Braga *et al.* 2024). GABA-T enziminin inhibisyonu GABA konsantrasyonunda artışa neden olarak alkolizm, epilepsi ve Alzheimer hastalığı gibi nöropsikiyatrik hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Sherif, 1994). GABA sisteminin larva davranış parametrelerini düzenleyen başlıca inhibitör yollarından biri olduğu göz önüne alındığında bu çalışmada GABA sistemi ile ilgili belirli genlerin ekspresyon profilleri değerlendirilmiştir. GABA enerjik dengenin bozulması motor yanıt ve uyarılara karşı duyarlılık gibi etkilerle bağlantılı olabileceği düşünülebilir.

gabra1

Gabra geni zebra balıklarında GABAA reseptörün alfa-1 alt birimini kodlayan bir genidir ve insan *gabra1* geninin ortoloğudur. *Gabra1* geni döllenmenin başlarında sinir sisteminin gelişimi sırasında gözlemlenirken ilerleyen dönemlerde orta ve arka beyin bölgelerinde lokalize olmaya başlar (Reyes-Nava *et al.* 2020). *gabra1* geni zebra balığının 21.kromozomunda yer alır ve 9 ekzon bulundurur (UniProt, 2025).

gat1

GABA taşıyıcısı proteini üretiminden sorumlu genidir. *gat1* geni *slc6a1* ve *slc6a1b* olarakta bilinir. Bazal plak orta beyin bölgesinde ve sinir sisteminde ifade edilir. Zebra balığının 11.kromozom bölgesinde bulunur (ZFIN, 2025).

abat

GABA transaminaz enziminin üretiminden sorumlu genidir. *abat* geni mitokondride aktif olarak işlev görür. Kanda, karaciğerde, sinir sisteminde, pronefrik kanalda ve döllenmeden sonra yumurtanın gelişimi sırasında ifade edilir. Zebra balığı *abat* geni insan *abat* genine ortologdur (ZFIN, 2025). *Abat* geni zebra balığının 3.kromozomunda bulunur ve 15 ekzon bölgesi içerir (UniProt, 2025).

gad1b

Glutamik asit dekarboksilaz (GAD) enzimi üretimi ile ilgili genidir. Zebra balığında insan *gad* genine paralog *gad1a* ve *gad1b* olmak üzere iki gen bulunur (O'Connor *et al.* 2019). *gad1b* geni zebra balığının sinir sisteminde ve embriyo gelişimi sırasında nöral tüpte ifade edilir (ZFIN, 2025). *gad1b* geni zebra balığının 6.kromozomunda bulunur ve 16 ekzon bölgesi içerir (UniProt, 2025).

Davranış ile İlgili Genler (*gnrh3*, *gnrhr3*, *kiss2*)

Stres türleri insanlarda ve hayvanlarda hipotalamus-hipofiz ve gonadal (HPG) aksını ve üreme davranışını olumsuz etkileyebilir. Son yapılan çalışmalar kisspeptin ve GnIH (gonadotropin inhibitor hormon) gibi nöropeptitler gonadotropin salgılayıcı hormon (GnRH) ve gonadotropin sentezi ve salgılanması üzerinde etkiler gösterir. Bu iki peptit stres kaynaklı üreme davranışı bozulmalarında önemli rol oynar (Iwasa *et al.* 2018). Bu kısımda üreme davranışıyla ilgili yalnızca GnRH ve kisspeptit üzerinde durulacaktır.

Gonadotropinler hipofiz bezinden salgılanan ve glikoprotein yapıdaki hormonlardır. Gonadlardaki G-protein bağlı reseptörlere bağlanarak etki gösterirler (Gilbert *et al.* 2018). Erkek ve dişilerdeki üreme fonksiyonu luteinleştirici hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon

(FSH) gibi hormonların kontrolündedir. Gonadlarda bu hormonlar spesifik reseptörlere bağlanarak steroidogenez ve gametogenezi düzenler (Ronin, 1989).

Üreme süreçlerinin hormonal düzenlenmesinde temel bir rol üstlenen gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), hipotalamustan salınarak hipofiz bezini uyarır ve burada luteinize edici hormon (LH) ile folikül uyarıcı hormonun (FSH) sentezini ve salınımını başlatır. GnRH, bu hormonlar aracılığıyla üreme fonksiyonlarını düzenlemesinin yanı sıra, cinsel davranışların oluşumunda ve korku sinyallerinin iletilmesinde de nöromodülatör bir işlev görür (Schneider *et al.* 2006; Dubois *et al.* 2002). GnRH, etkisini gonadotropin salgılatıcı hormon reseptörlerine (GnRHR) bağlanarak gösterir. GnRHR, G proteinine bağlı bir reseptördür ve GnRH ile etkileşimi sonucunda fosfolipaz C yolunu aktive eder. Bu sinyal yolunun ateşlenmesiyle, FSH ve LH hormonlarının sentezi ve salınımı kimyasal olarak tetiklenir (Fanis *et al.* 2023).

Kisspeptin balıklar da dahil olmak üzere pek çok omurgalı türünde üreme ve diğer farklı fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde görev alan bir nöropeptindir. Teleostlarda Kiss1 ve Kiss2 olmak üzere iki analogu bulunmaktadır. Teleostlarda kisspeptin, sistem gelişimi, metabolizma ve davranış rolleri üzerinde etkileri vardır (Wang *et al.* 2022). Hipotalamusta bulunan kisspeptin nöronları GnRH nöronlarından gonadotropin üretici hormon salınımını düzenleyerek üreme eksenini kontrol eder (Navarro, 2020).

gnrh3

Zebra balığında diğer teleost balık türlerinden farklı olarak sadece 2 *GnRH* formu (*gnRH2* ve *gnRH3*) bulunur. Zebra balığında *gnRH3* ventral telensefalon, terminal sinir, preoptik alan ve hipotalamus gibi ön beyin bölgelerinde ifade edilir (Zhao *et al.* 2014). Zebra balıklarında GnRH3 nöronları koku alma bölgesinden (olfaktör bölge) gelişerek preoptik alan-hipotalamus bölgesine göç etmektedir. Zebra balıklarındaki tüm ön beyin GnRH nöronlarının kökeni koku alma bölgesidir (Abraham *et al.* 2009). *gnrh3* geni cinsiyet farklılaşmasında, beyin ve göz gelişiminde etkisi vardır. Sindirim sisteminde, sinir sisteminde, gonadlarda ve koku alma bölgesi gibi çeşitli bölgelerde ifade edilir. *gnrh3* (eski adıyla *sGnRH*) geni insan *gnrh2* geninin ortoloğudur (ZFIN, 2025). *Gnrh3* geni zebra balığının 17.kromozomunda lokalize olur. 1 transkripti bulunur ve 9 fenotiple ilişkilendirilir (Ensembl, 2025).

gnrhr3

Zebra balıklarında insanlardan farklı olarak genomunda 4 farklı GnRH reseptör geni bulunmaktadır. Bu 4 reseptör arasında %45 ile %71 arasında amino asit dizisi özdeşliği bulunmaktadır. *gnrhr3* eksprese olan hücrelerde cAMP birikiminde artış gözlemlenir (Tello *et al.* 2008). *gnrhr3* dişi ve erkek zebra balıklarında sinir sistemi, bağırsak gibi çeşitli bölgelerde

ifade edilir (ZFIN, 2025). *gnrhr3* geni zebra balığının 16.kromozomunda bulunur (UniProt, 2025).

kiss2

Zebra balığı ve başka omurgalı canlılarda *kiss1* genine paralog olan *kiss2* geni bulunmaktadır. *kiss2* mRNA'sı döllenmeden 1 gün sonra tespit edilebilir ve daha sonra embriyonik ve larva gelişimi boyunca artar (Zhao *et al.* 2014). Zebra balıklarının dişi ve erkek bireylerin merkezi sinir sisteminde ifade edilir (ZFIN, 2025). Kiss2 geni zebra balığı 4.kromozomunda yer alır. 1 transkripti ve 20 ortoloğu bulunur. 12 fenotiple ilişkilendirilir (Ensembl, 2025).



MATERYAL VE METOT

Kimyasallar ve Çözeltiler

4F-MDMB-BUTICA (%98'den fazla saflıkta), Cayman Chemical Company'den (Michigan, ABD) temin edilmiştir. Doz seçimi, Chatzimitakos ve ark. (2022) ve Markin ve ark. (2021) tarafından yapılan çalışmalara göre belirlenmiştir. 4F-MDMB-BUTICA, %1 DMSO içeren E3'te (zebra balığı embriyo besiyeri) çözölmüştür. Besiyeri 5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂, 0,33 mM MgSO₄ ve 0,001 metilen mavisi içermektedir. Tüm toksisite testleri E3 besiyerinde gerçekleştirilmiştir. %1 DMSO'nun zebra balığı embriyo gelişimsel toksisite deneyindeki bileşikleri çözmek için güvenle kullanılabileceği bilinmektedir (Hoyberghs *et al.* 2021).

Zebra Balığı Kültürü ve Embriyo Toplama

AB ırkı zebra balıkları, Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Deneysel Araştırma Birimi'ndeki kapalı devre sisteminde yetiştirilmiştir. Zebra balıkları, 27±1,0°C sabit su sıcaklığında, 14:10 saatlik aydınlık-karanlık döngüsünde olup günde iki kez beslenmiştir. Çalışmada kullanılacak balık embriyoları bu birimden elde edilmiştir. Bu amaçla üç dişi ve iki erkek yetişkin balık kuluçka akvaryumlarına yerleştirilmiştir. Akvaryumlar sistem suyuyla doldurularak yukarıdaki koşullar sağlanmıştır. Ertesi sabah akvaryum tabanındaki tüm embriyolar sifonlanarak toplanılmıştır. Döllenmiş yumurtalar seçilip yıkanmış ve E3 besiyeri içeren Petri kaplarına aktarılmıştır. Bu prosedüre uygun olarak elde edilen döllenmiş zebra balığı embriyoları toksisite testi için laboratuvarımıza aynı günün sabahında getirilmiştir.

Balık Embriyosu Toksisite (FET) Testi

Test Organisation for Economic Co-Operation and Development (OECD) test yönergelerine (OECD 2013) göre gerçekleştirilmiştir. Zebra balığı embriyoları her petride 30 adet olacak şekilde planlanarak içinde 25 ml besiyeri ve kannabinoid solüsyonu olan kaplarak yerleştirilmiştir. Balık embriyoları ortalama 3 hpf olarak maruziyete bırakılmaya başlanmıştır. 4F-MDMB-BUTICA 0,15, 0,30, 0,60, 1,20, 2,40 ve 4,80 mg/L konsantrasyonlarda olacak şekilde stok çözeltilerden seyreltme yapılarak hazırlanmıştır. Şu halde 6 uygulama, 1 çözücü kontrol (%1 DMSO) ve 1 kontrol (E3) olmak üzere 8 grup deney seti embriyo ilavesinden sonra 27±1,0°C'de etüvde farklı zaman aralıklarında inkübe edilmiştir.

Maruziyet 3-24 saat (akut) ve 3-120 saate (subakut) kadar devam edilmiştir. Maruziyet süresince deney solüsyonları yenilenmemiştir. Akut maruziyetten sonra embriyolar E3 ortamına transfer edilerek 120. saate kadar izlenilmiştir. Subakut maruziyette ise embriyolar 120 saat boyunca test kimyasalında tutulmuştur. Her deney üç kez tekrarlanılmıştır. Ayrıca, yüksek konsantrasyonlarda gen ekspresyonu çalışmalarında kullanılmak üzere yeterli sayıda larva elde etmek için deney bazen altı kez tekrarlanılmıştır. Her 24 saatte bir, tüm embriyolar 120. saate kadar ölüm ve gelişimsel anormallikler açısından dijital kamera destekli stereo mikroskop (Nikon SMZ1000 ve Nikon DSLR D70s) kullanılarak gözlenilmiştir.

Embriyoların 60-120 saatlik koryondan çıkış oranları da izlenilmiştir. Bu oran şu formülle hesaplanılmıştır: $HT = \frac{\text{Çıkan embriyolar}}{\text{Yaşayan embriyolar}} \times 100$ (Lee *et al.* 2013). Deneyin sonunda larvaların vücut uzunluğu, baş alanı, göz alanı ve perikardiyal alanı ölçülmüştür ve LEICA LAS EZ görüntü işleme yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Ortalama ölüm konsantrasyon (LC_{50}) ve ortalama etkili konsantrasyon (EC_{50}) değerleri, maruz kalma sürelerinin sonundaki kümülatif ölüm oranı ve morfolojik anormalliğe göre hesaplanmıştır. Konsantrasyon-tepki eğrisi, EC_{50} (teratojenik etkiler) ve LC_{50} (embriyotoksik etkiler) değerlerini elde etmek için 120. saat sonundaki veriler kullanılmıştır. Teratojenik indeks (TI) değeri, LC_{50}/EC_{50} oranı olarak hesaplandı. TI değeri 1 veya daha büyük olduğunda, uygulanan bileşik teratojenik olarak kabul edilmektedir (Selderslaghs *et al.* 2009).

Zebra balığı larvalarının kalp atışları döllenmeden sonraki 48 ve 120. saatlerde (hpf) izlenmiştir. Kalp atışları, HD kamera destekli LEICA DM750 mikroskobu (Solms, Almanya) altında 1 dakikada sayılarak hesaplanmıştır. Her gruptan on embriyo rastgele seçilerek veriler alınmıştır. Morfolojik değişiklikler mikroskop altında 24, 48, 72, 96 ve 120. hpf'de gözlemlenmiştir. 24. hpf'de gözlemlenen değişiklikler arasında somitlerde defektler ve kuyruk ayrılmaması takip edilmiştir. Göz ve vücutta zayıf pigmentasyon veya renksizlik, anormal göz morfolojisi, yumurta kesesi ödemi, perikardiyal ödem, anormal kan akışı, gecikmiş yumurtadan çıkma ve gelişme (kuyruk aktivitesi olmaması, kısalmış boy uzunluğu, çene oluşumu gerçekleşmemesi, yüzme kesesi oluşmaması, yüzme eylemi olmaması vb.), kıvrık kuyruk, omurga deformiteleri ve anormal vücut morfolojisi döllenmeden sonraki 48 ve 120. saatlerde araştırılmıştır. Skrolama, normal için (0) ve anormal için (1) verilerek yapılmıştır. 24, 48, 72, 96 ve 120. hpf'de gözlemlenen deforme yüzdeleri, anormal embriyo veya larvaların, o anki canlı embriyo/larva sayısına oranı olarak hesaplanmıştır. Özellikle, omurga deformeleri, ödem, koryondan çıkmama ve anormal pigmentasyon gibi bazı morfolojik anormallikler EC_{50} değerini hesaplamak için kullanılmıştır.

Davranışsal Analiz

İlaçların ve benzeri kimyasalların biyoaktivitesinin incelenmesinde davranışsal değişikliklerin belirlenmesi çok önemlidir. Kannabinoidlerin zebra balığı larvaları üzerindeki davranışsal etkileri Dokunma Tepki Yanıtı (Touch-Evoked Response (TER) testi ile araştırılmıştır. TER, vücudun bir uyarana tepki olarak açılma ivmelenmesi ve yer değiştirmesi olarak tanımlanmıştır (Kalueff *et al.* 2013). TER testi, Guzman ve ark. (2020) tarafından bildirilen şekliyle gerçekleştirilmiştir. Maruz kalmanın sonunda, 120 saatlik larva, 2 mL E3 besiyeri ile doldurulmuş petri kabına (3 cm çapında) aktarılmış. Petri kabı, dijital bir kamera cihazı (Nikon DSLR D70s) ile bir stereomikroskop (Nikon SMZ1000, Tokyo, Japonya) altına yerleştirilmiştir.

1 dakika sonra video kaydı başlatılmış ve 10. saniyede larvanın rostral başına insülin iğnesi ile dokunulmuştur. Bu işlem her larva için üç kez tekrarlanmıştır (videonun toplam uzunluğu 40 saniyedir). Değerlendirme, her larvanın dokunmaya tepkisi ve sonrasında kat ettiği mesafe ölçülerek yapılmıştır. Dokunmaya verilen tepkiler nicel olarak şu şekilde değerlendirilmiştir: 0 puan; larva hareket etmedi, 1 puan; larva bir çemberin çeyreğinden az hareket etmiş, 2 puan; larva bir çemberin çeyreği ile yarısı arasında yüzmüş, 3 puan; larva bir çemberin yarısı ile yarısından fazla yüzmüş ve 4 puan ise larva bir çemberden daha fazla yüzmüş. Her konsantrasyonda en az beş larva değerlendirildi. Dijital kayıtlar LEICA LAS EZ görüntü işleme yazılımı ile analiz edilmiştir.

Toksikogenomik Analiz

120 saat boyunca subletal konsantrasyonlarda (0,15, 0,30, 0,60 ve 1,20 mg/L) kannabinoide maruz bırakılan zebra balığı larvaları (120. hpf) analiz için kullanılmıştır. Maruziyetten sonra larvalar, kalıntı kimyasalları uzaklaştırmak için taze E3 besiyeriyle üç kez yıkanmıştır. Her yıkama 1 dakika sürmüş ve embriyolar steril Eppendorf tüplerine aktarılıp gen ifadesi analizi için -80°C'de saklanmıştır. Toksik tepkilerle ilişkili gen ifade düzeyindeki değişimleri belirlemek için toksikogenomik bir yaklaşım kullanılmıştır. Her deney grubundan elde edilen toplam RNA örnekleri, iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad, Hercules, California, ABD) kullanılarak cDNA'ya ters transkribe edildi. İfade (ekspresyon) analizleri, seçilmiş 19 genlik bir grup üzerinde gerçekleştirilmiştir. Genlerin primer dizileri Tablo 1'de gösterilmiştir. Genler apoptoz, DNA onarımı, inflamasyon, nörotransmisyon ve davranışla ilişkili genler olarak seçilmiştir. qPCR reaksiyonu, CFX96 Touch Real- Time PCR Tespit Sistemi (Bio-Rad) kullanılarak, SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) ile gerçekleştirildi. Veriler, CFX Manager Yazılımı (Bio-Rad) kullanılarak analiz edilmiştir. İlgili gen ifadeleri *βactin* genine göre normalize edilmiştir.

Tablo 1. qPCR Analizi için Kullanılan Genler ve Tasarlanan Primerler

Genler	Etki	İleri primer	Geri primer
<i>casp3a</i>	Apoptoz ve DNA onarımı	AAGGACTTTGATCGCAGG AC	TAATCTGCGCAACTGTCT GG
<i>casp8</i>		TATTCAAGCCTGCCAAGG AG	CCGATCAGGAAATCAGC TTC
<i>ifng1</i>		CTGTTTTTCGGGATGGATGA C	AGCTTTGAGCTCTTCGA TGC
<i>tp53</i>		GGGCAATCAGCGAGCAAA	ACTGACCTTCCTGAGTC TCCA
<i>rad51</i>		ACTAGCCGTCACCTGCCA GC	ACTGCCCACCAGACCAT ACCGTT
<i>dat</i>	Dopamin	AGACATCTGGGAAGGTGG TG	ACCTGAGCATCATACAG GCG
<i>drd2</i>		ACGCTGTCCATCCTTATCT C	TGTCCGATTAAGGCTGG AG
<i>drd3</i>		ATCAGTATCGACAGGTATA CAGC	CCAAACAGTAGAGGGCA GG
<i>5ht1aa</i>	5-hidroksitriptamin (Serotonin)	ATGAGGATGAGCGGGATG TAG	CAATCAGCCAGGACCAC G
<i>5ht1a</i>		ATGAGGATGAGCGGGATG TAG	CAATCAGCCAGGACCAC G
<i>5ht1ab</i>		CTGTGTCGCCTGCACTTTT C	CAGCCAGATGTCGCAGA TG
<i>5ht2c</i>		GCGCTCTCTGTCTTATTG G	GTAGCGGTCTGAGAGAAA TGG
<i>gabral</i>	Gama-amino bütirik asit	TCAGGCAGAGCTGGAAGG AT	TGCCGTTGTGGAAGAAC GT
<i>gat1</i>		ATGCTGTTTATCCTGTTCA TCCG	TGTTGAAGGGGTTGTAG CTCC
<i>abat</i>		GCGTTCAGGCAAAGCTCT	GCAGGACGGAAACGGA T
<i>gad1b</i>		AACTCAGGCGATTGTTGC AT	TGAGGACATTTCCAGCC TTC
<i>gnrh3</i>	Davranış	TGGTCCAGTTGTTGCTGTT AGTT	CCTGAATGTTGCCTCCAT TTC
<i>gnrhr3</i>		AACAGACATGATCCCGAA GG	AGGTTCCCGAACACAAA CAG
<i>kiss2</i>		TCAATGGAGCGAAGGCAG TT	CTGTCAGAGTCGCTGGT TGT
<i>β-aktin</i>	Houskiping geni	ACACAGCCATGGATGAGG AAATCG	TCACTCCCTGATGTCTG GGTCGT

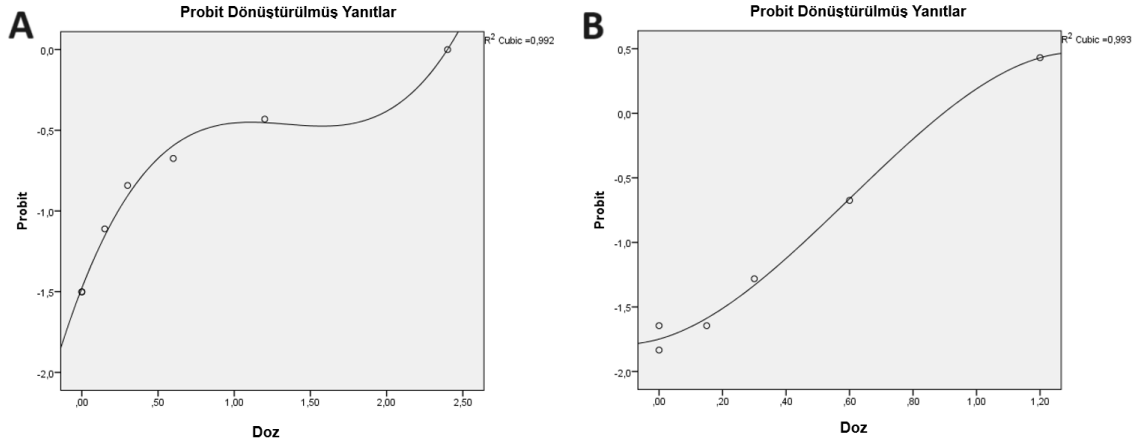
İstatistiksel Analiz

Ortalama $\pm$ standart hata/sapma olarak sunulan veriler tanımlayıcı istatistikler olarak kullanılmıştır. Kontrol grubu ile sentetik kannabinoid ile muamele edilen gruplar arasındaki farklar tek yönlü ANOVA analizi ile belirlenip ardından Dunnett's HSD ve/veya Duncan's HSD testleri uygulanmıştır. Davranışsal sonuçlar, uyaran–yanıt ve zaman değişkenleri için iki yönlü ANOVA ile analiz edilmiş ve ardından Tukey-HSD testi uygulanmıştır. Gelişimsel bozukluk testinde elde edilen morfolojik değişiklik ve ölü larva yüzdeleri sırasıyla EC₅₀ ve LC₅₀ hesaplamalarında kullanılmıştır. Doz–yanıt eğrileri, ölüm yüzdesinden LC₅₀ ve morfolojik değişiklik yüzdesinden EC₅₀'yi tahmin etmek için Probit analizi ile hesaplanmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ veya $p < 0.01$ olarak kabul edildi. Sonuçlar SPSS 21.0 yazılım programı ve Prism 9 (GraphPad Software Inc, Boston, ABD) ile analiz edilmiştir.

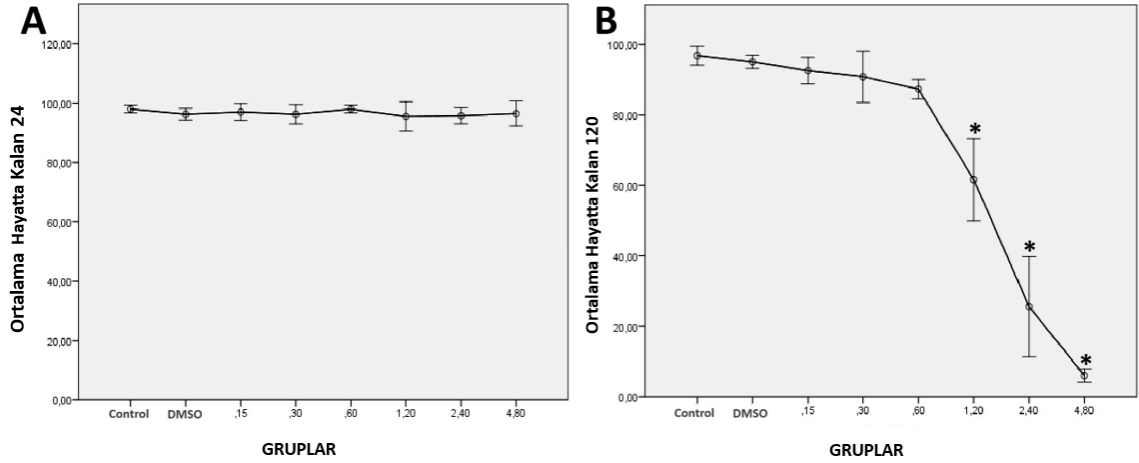
ARAŞTIRMA BULGULARI

Canlılık

Ölü embriyolar, akut ve subakut maruziyetlerin sonunda kaydedilmiştir. 24 hpf’de, 4F-MDMB-BUTICA, zebra balığı embriyolarında ölüme neden olmamıştır. Ancak, 120 hpf’de maruziyetten sonra balık larvalarında ölümler ve anormallikler gözlemlenmiştir. 4F-MDMB-BUTICA’nın 120 hpf LC₅₀ ve EC₅₀ değerleri sırasıyla 1,932 ve 0,960 mg/L olarak bulunmuştur (Şekil 4). Kannabinoide maruz kalan balık larvalarının canlı kalma oranları Şekil 5’te gösterilmiştir. Akut maruziyetin (24 hpf) hayatta kalma oranı üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi olmamıştır. 120 hpf’de, 1,2 mg/L’den düşük konsantrasyonlar, larvaların hayatta kalma oranını kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde etkilememiştir. Buna karşılık, 2,4 ve 4,8 mg/L kannabinoid dozları larvaların hayatta kalma oranlarını düşürmediği görülmüştür.



Şekil 4. 4F-MDMB-BUTICA için LC₅₀ (A) ve EC₅₀ (B) değerlerinin hesaplanmasında kullanılan doz-yanıt eğrileri (güven aralığı %95)



Şekil 5. Farklı 4F-MDMB-BUTICA konsantrasyonlarına akut (A) ve subakut (B) maruz bırakılan zebra balığı larvalarının kümülatif canlılık oranları (%). Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde sunuldu (n=90). *p<0,05 kontrol grubuna kıyasla

Koryondan Çıkma Oranları

Koryondan çıkma oranı, gelişimsel toksisiteyi değerlendirmek için kullanılan önemli bir parametredir. 4F-MDMB-BUTICA'ya maruz bırakılan zebra balığı embriyolarının koryondan çıkma oranı Tablo 2'de gösterilmiştir. Akut maruziyet için farklı kannabinoid dozlarına maruz bırakılan embriyolarda bu oranda herhangi bir gecikme gözlenmemiştir. Buna karşılık, subakut maruziyette koryondan çıkma oranı düşük bulunmuştur. 1,20 ve 2,40 mg/L dozlarında kümülatif koryondan çıkma oranları 60 hpf'de %35,7 ve %12,1 olarak hesaplanmışken 120 hpf'de %34,9 ve %11,7 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 2. Farklı Maruziyet Sürelerinde 4F-MDMB-BUTICA'nın Koryondan Çıkış Oranı (%) Üzerindeki Etkileri

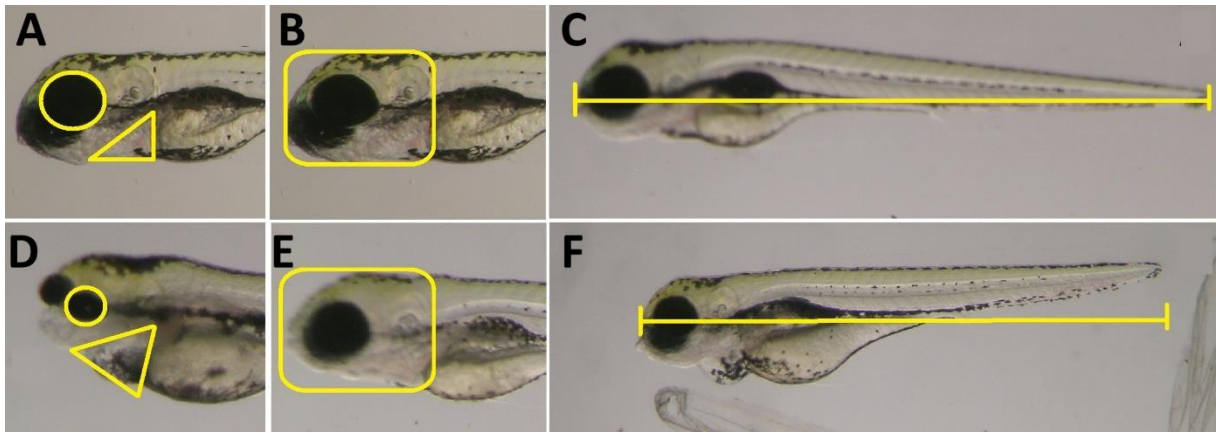
Gruplar	Akut maruziyet		Subakut maruziyet	
	60 hpf	120 hpf	60 hpf	120 hpf
Kontrol	68.0 $\pm$ 1.4 ^a	96.8 $\pm$ 1.5 ^a	67.7 $\pm$ 2.5 ^a	97.3 $\pm$ 1.4 ^a
DMSO	68.4 $\pm$ 2.3 ^a	97.5 $\pm$ 1.3 ^a	68.8 $\pm$ 1.4 ^a	96.5 $\pm$ 1.5 ^a
0.15 mg/L	66.9 $\pm$ 1.7 ^a	93.9 $\pm$ 2.8 ^a	66.3 $\pm$ 2.8 ^a	97.0 $\pm$ 0.9 ^a
0.30 mg/L	67.9 $\pm$ 1.7 ^a	95.4 $\pm$ 2.6 ^a	64.2 $\pm$ 2.1 ^a	97.9 $\pm$ 0.6 ^a
0,60 mg/L	66.7 $\pm$ 3.2 ^a	95.0 $\pm$ 3.1 ^a	58.3 $\pm$ 0.7 ^{a,b}	90.7 $\pm$ 1.6 ^a
1.20 mg/L	66.4 $\pm$ 3.2 ^a	97.6 $\pm$ 0.9 ^a	35.7 $\pm$ 4.3 ^{*,b}	34.9 $\pm$ 6.6 ^{*,b}
2.40 mg/L	65.8 $\pm$ 1.2 ^a	98.3 $\pm$ 1.1 ^a	12.1 $\pm$ 3.0 ^{*,c}	11.7 $\pm$ 2.4 ^{*,c}
4,80 mg/L	64.7 $\pm$ 3.9 ^a	98.0 $\pm$ 1.2 ^a	0.0 $\pm$ 0.0 ^{*,d}	0.0 $\pm$ 0.0 ^{*,d}

Not: Veriler ortalama $\pm$ SD (n=90) olarak sunulmuştur. Post hoc Duncan testine göre, aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05). Tek yönlü ANOVA Dunnett testine göre, aynı sütunda yıldız (*) ile gösterilen gruplar ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05).

Morfometrik Analiz

120 hpf'de, deney gruplarındaki larvaların vücut uzunluğu, göz alanı, baş alanı ve perikardiyal alanı gibi bazı morfometrik parametreleri ölçülmüştür (Şekil 6). Akut maruziyet grubunda zebra balığı embriyolarının morfometrik parametrelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, subakut maruziyet gruplarında vücut uzunluğunda kısalma, göz alanında azalma ve perikardiyal alanda artış gözlenmiştir.

4F-MDMB-BUTICA maruziyetinin larvaların baş alanı üzerinde anlamlı bir etkisi olmamıştır. 120 hpf'de 0,60, 1,20 ve 2,40 mg/L doz-maruziyet gruplarında larva uzunluğunda kısalma gözlenmiştir. Benzer şekilde 0,60, 1,20 ve 2,40 mg/L dozlarda perikardiyal alan artarken, göz küresi büyüklüğü 1,20 ve 2,40 mg/L dozlarında azalmıştır (Tablo 3).



Şekil 6. Kontrol (A–C) ve maruziyet (D–F) gruplarına ait 120 hpf larvalarının morfometrik özellikleri. (A, D) Göz alanı ve perikardiyal alan, (B, E) baş alanı ve (C, F) larva boyu-vücut uzunluğu

Tablo 3. 4F-MDMB-BUTICA'nın 120 hpf Larvaların Vücut Uzunluğu ile Baş, Göz ve Perikardiyal Alanları Üzerindeki Etkileri

Gruplar	Morfometrik parametreler				
	Vücut uzunluğu	Baş alanı (mm)	Göz (mm ²)	küresi	Perikardiyal alan (mm ²)
Kontrol	3.82±0.16 ^a	0.28±0.03 ^a	0.031±0.001 ^a		0.030±0.003 ^a
DMSO	3.76±0.23 ^a	0.29±0.01 ^a	0.030±0.002 ^a		0.028±0.00 ^a
0.15 mg/L	3.62±0.22 ^a	0.28±0.03 ^a	0.031±0.002 ^a		0.028±0.001 ^a
0.30 mg/L	3.62±0.17 ^a	0.28±0.02 ^a	0.030±0.002 ^a		0.027±0.002 ^a
0,60 mg/L	3.20±0.12 ^{a,b}	0.27±0.01 ^a	0.028±0.002 ^a		0.040±0.001 ^{*, b}
1.20 mg/L	2.73±0.07 ^{*, b}	0.29±0.01 ^a	0.021±0.002 ^{*, b}		0.044±0.001 ^{*, c}
2.40 mg/L	2.60±0.12 ^{*, b}	0.28±0.01 ^a	0.019±0.001 ^{*, b}		0.048±0.002 ^{*, c}
4,80 mg/L	0.00±0.00 ^{*, c}	0.00±0.00 ^{*, b}	0.000±0.000 ^{*, c}		0.000±0.000 ^{*, d}

Not: Veriler ortalama ± standart sapma (SS) olarak sunulmuştur (n=30). Post hoc Duncan testine göre, aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05). Tek yönlü ANOVA Dunnett testine göre, aynı sütunda yıldız (*) ile belirtilen gruplar ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlıdır (p<0.05).

Kalp Atış Hızı

Larvaların kalp atış hızları 48 ve 120 saatte kaydedilmiştir. 4F-MDMB-BUTICA'ya akut maruziyet kalp atış hızlarında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Subakut maruziyette, 1,20 ve 2,40 mg/L dozlarında kalp atış hızı kontrole kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. Buna karşılık, 0,15, 0,30 ve 0,60 mg/L doz 4F-MDMB-BUTICA, larvaların kalp atış hızlarında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (Tablo 4).

Tablo 4. 4F-MDMB-BUTICA'ya Maruz Bırakılan 48 ve 120 saatlik larvaların Kalp Atım Hızları (Dakikadaki Atım Sayısı).

Gruplar	Akut maruziyet		Subakut maruziyet	
	48 hpf	120 hpf	48 hpf	120 hpf
Kontrol	66.8±1.1 ^a	155.2±2.9 ^a	66.6±2.1 ^a	156.3±1.2 ^a
DMSO	67.7±1.6 ^a	155.3±2.4 ^a	66.6±2.1 ^a	155.5±1.3 ^a
0.15 mg/L	67.0±1.5 ^a	155.7±2.8 ^a	65.7±0.9 ^a	154.6±1.0 ^a
0.30 mg/L	68.2±1.3 ^a	154.9±0.9 ^a	66.9±1.1 ^a	150.7±1.3 ^a
0,60 mg/L	67.9±0.9 ^a	157.2±2.0 ^a	63.0±1.4 ^a	151.0±2.2 ^a
1.20 mg/L	68.2±1.3 ^a	157.0±2.1 ^a	52.5±1.9 ^{*, b}	77.0±2.9 ^{*, b}
2.40 mg/L	66.6±1.1 ^a	154.4±2.0 ^a	43.6±2.6 ^{*, c}	63.5±5.8 ^{*, c}
4,80 mg/L	66.7±1.3 ^a	155.3±2.0 ^a	22.6±1.1 ^{*, d}	00.0±0.0 ^{*, d}

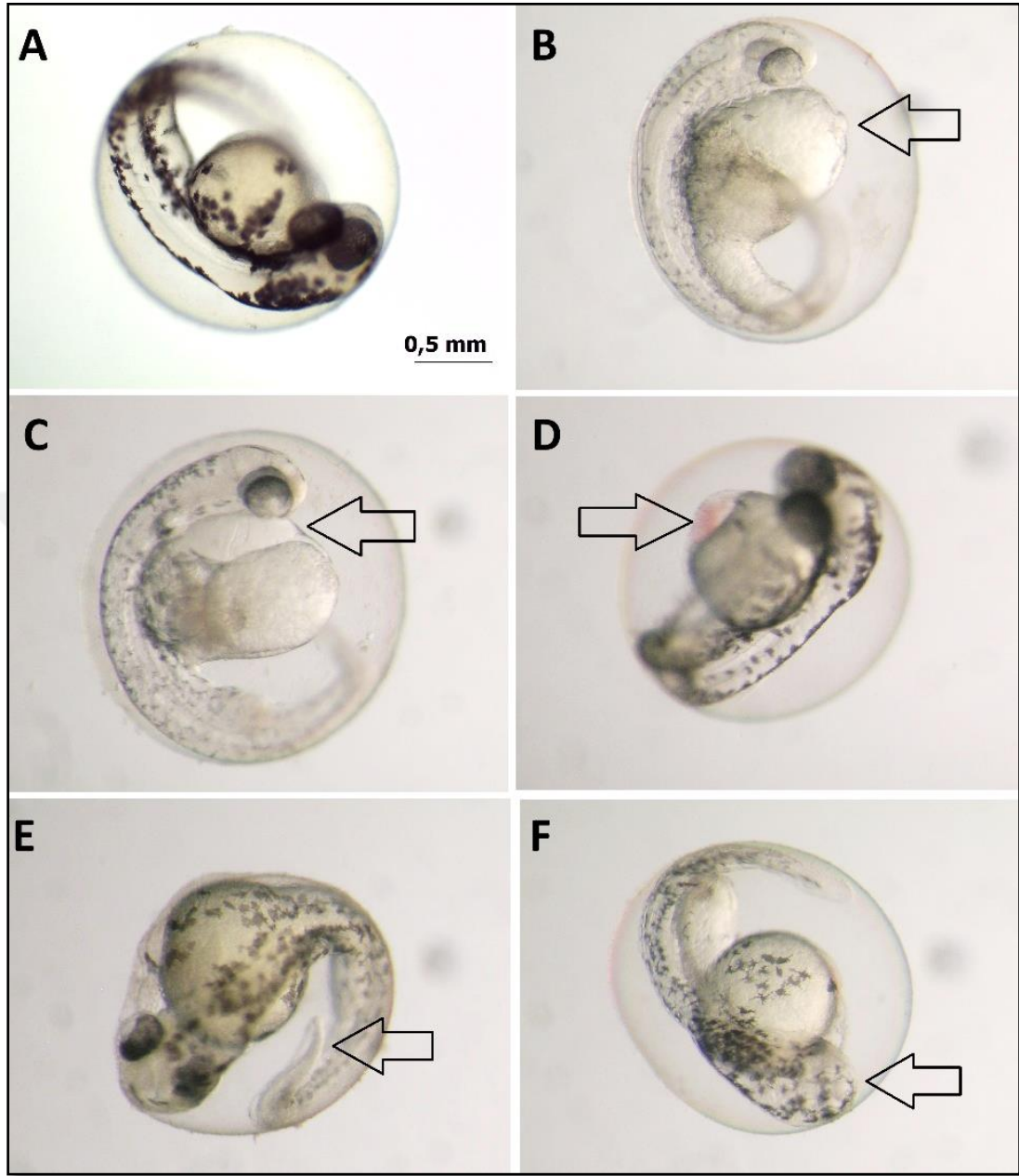
Not: Veriler ortalama ± SD (n=10) olarak sunulmuştur. Post hoc Duncan testine göre, aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05). Tek yönlü ANOVA Dunnett testine göre, aynı sütunda yıldız işareti (*) bulunan gruplar ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05).

Morfolojik Değişiklikler

Hesaplanan teratojenik indeks (TI) değeri 2,015 olup, ilgili kritere göre 4F-MDMB-BUTICA'nın zebra balığında teratojen olduğunu göstermektedir. Şekil 7–10, kannabinoid maruziyetini takiben 24-120 hpf'de gözlemlenen çeşitli teratojenik özellikleri göstermektedir. Akut maruziyetin ardından embriyolarda herhangi bir morfolojik veya gelişimsel anormallik tespit edilmemiştir. 0,15 ve 0,30 mg/L konsantrasyonlarda embriyolar, subakut maruziyetteki kontrol gruplarına benzer şekilde normal gelişim göstermiştir. Bununla birlikte, 0,60 ile 2,40 mg/L arasında değişen konsantrasyonlarda 4F-MDMB-BUTICA'ya subakut maruz bırakılan embriyolar, konsantrasyona bağlı olarak morfolojik değişiklikler göstermiştir. En sık görülen malformasyonlar anormal omurga oluşumu, ödem, bozulmuş kan akışı ve gelişimde gerileme olarak tespit edilmiştir (Tablo 5).

48 saatlik kontrol grubunda kalp atışı kolayca izlenebilmektedir. Gözde ve vücutta pigmentasyon başlamıştır (Şekil 7A). Subakut maruziyet gruplarında ise yumurta kesesi deformitesi (Şekil 7B), zayıf pigmentasyon (Şekil 7B), yumurta kesesi ödemi (Şekil 7C),

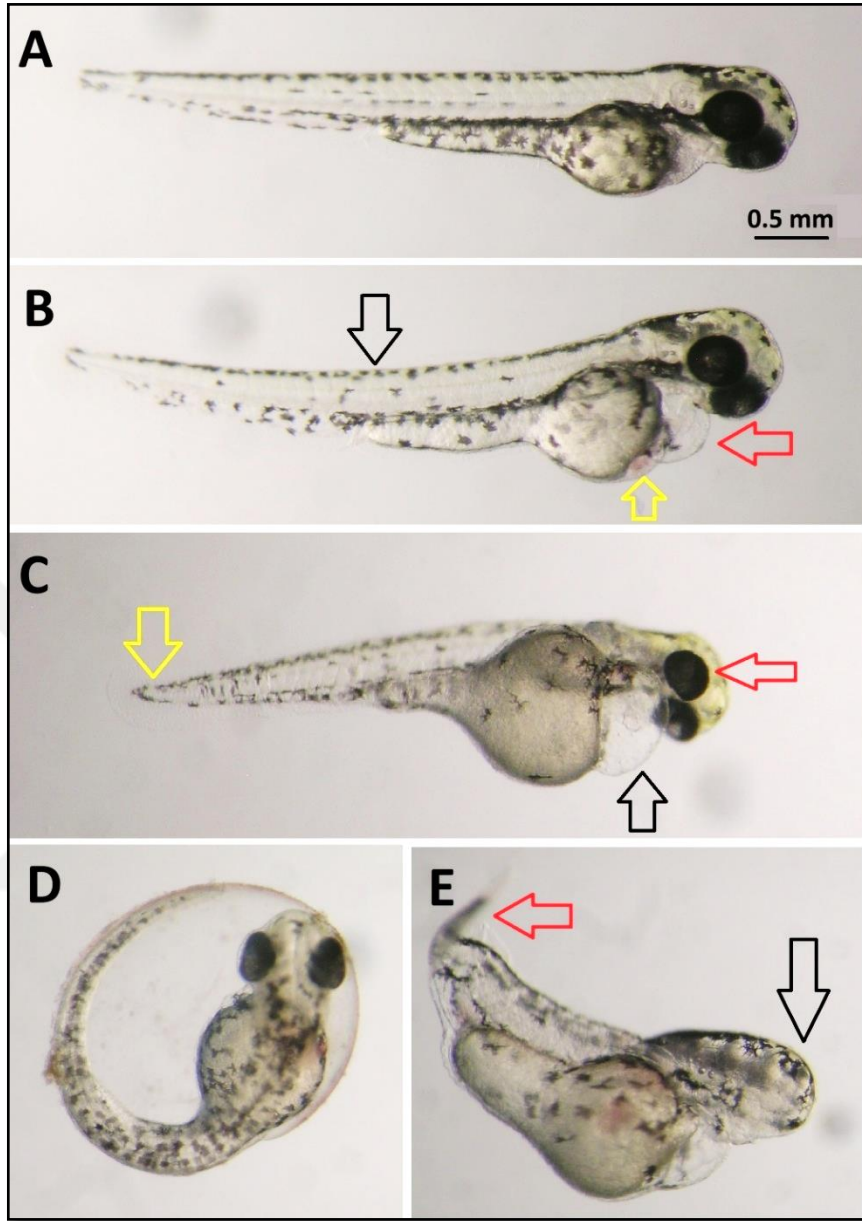
yumurta kesesinde kırmızı kan hücrelerinin birikmesi (Şekil 7D), kıvrık kuyruk (Şekil 7E) ve baş deformasyonu (Şekil 7F) gözlenmiştir.



Şekil 7. 48 hpf zebra balığı embriyolarının temsilci görüntüleri. (A) Kontrol grubu. (B) 0,60 mg/L uygulama grubu: zayıf pigmentasyon ve yumurta kesesinde dejenerasyon (ok). (C) 0,60 mg/L uygulama grubu: yumurta kesesi ödemi (ok). (D) 1,20 mg/L uygulama grubu: yumurta kesesinde birikmiş kırmızı kan hücreleri (ok). (E) 2,40 mg/L uygulama grubu: kıvrık kuyruk (ok). (F) 2,40 mg/L uygulama grubu: şiddetli baş deformasyonu (ok)

72 saatlik kontrol grubu larvalarında normal yüzme aktivitesi ve kan dolaşımı çok net bir şekilde gözlenmektedir (Şekil 8A). Kannabinoide subakut maruz kalan larvalarda lordoz (Şekil 8B), perikardiyal ödem (Şekil 8B, C, E), kırmızı kan hücrelerinde birikme (Şekil 8B), gözlerde küçülme (Şekil 8C), vücut uzunluğunda kısalma (Şekil 8C, E), koryondan çıkışta

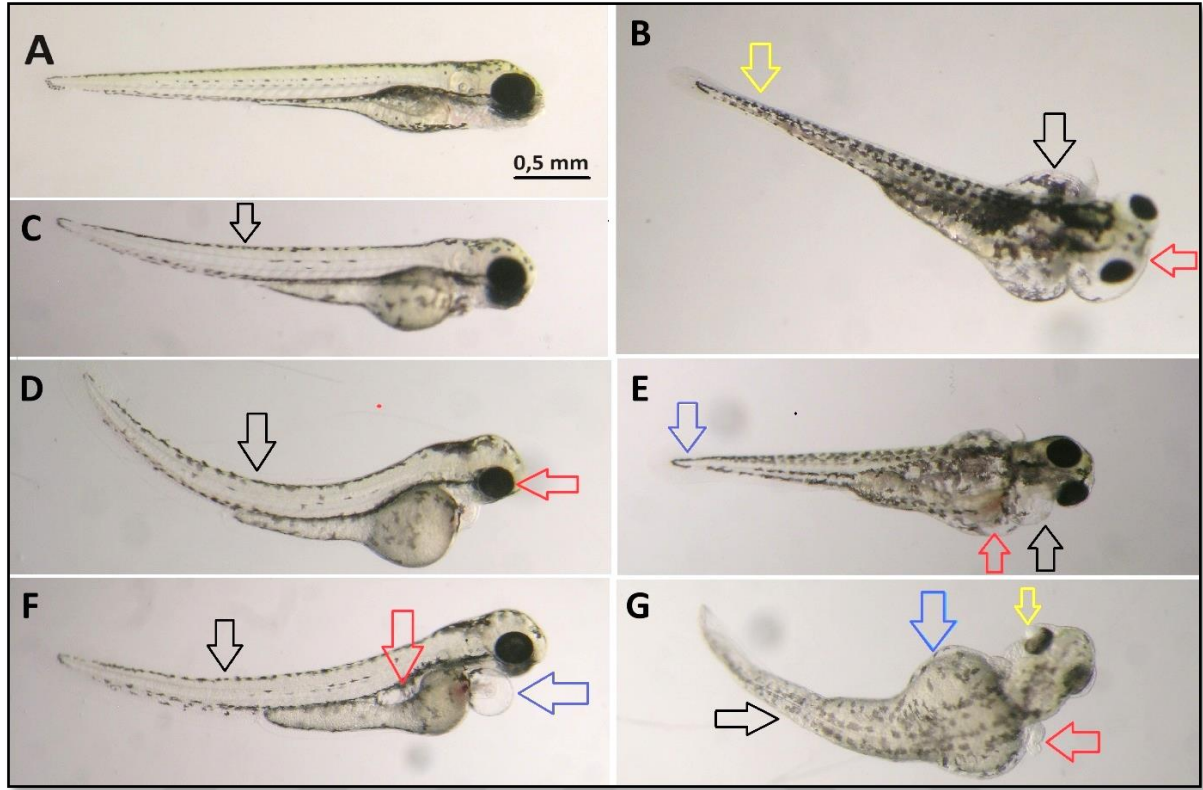
gecikme (Şekil 8D), vücutta zayıf pigmentasyon (Şekil 8D) ve vücut formunda ciddi anormallik (Şekil 8E) belirlenmiştir.



Şekil 8. 72 hpf zebra balığı larvalarının temsilci görüntüleri. (A) Kontrol grubu. (B) 0,60 mg/L uygulama grubu: lordoz (siyah ok), perikardiyal ödem (kırmızı ok) ve yumurta kesesinde konjesyon (birikmiş kırmızı kan hücreleri) (sarı ok). (C) 1,20 mg/L uygulama grubu: göz küçülmesi (kırmızı ok), perikardiyal ödem (siyah ok) ve kısalmış vücut uzunluğu (sarı ok). (D) 1,20 mg/L uygulama grubu: zayıf pigmentasyonlu koryondan çıkmamış larva. (E) 2,40 mg/L uygulama grubu: şiddetli vücut deformasyonu; ödemler, kısa omurga, kıvrık kuyruk (kırmızı ok) ve baş oluşumunun olmaması (siyah ok) gösterilmiştir.

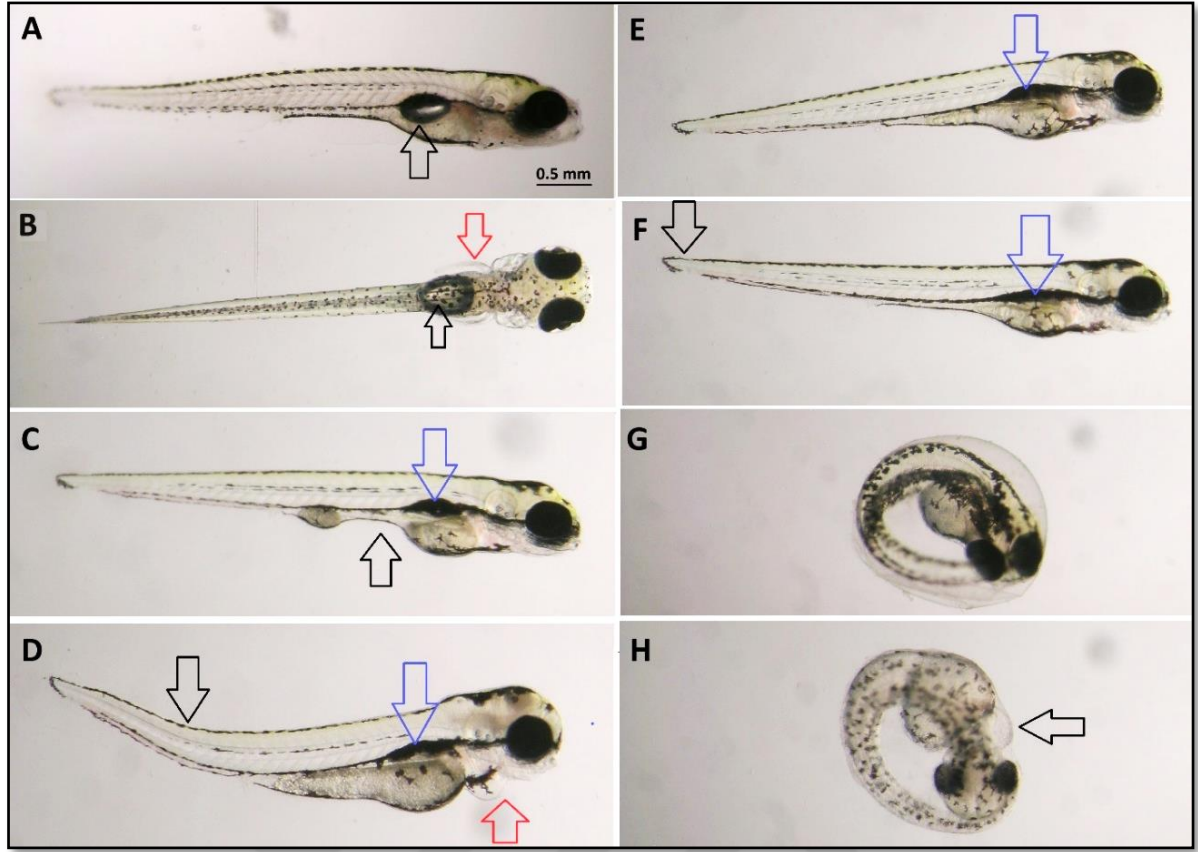
Kontrol, DMSO, 0,15 ve 0,30 mg/L kannabinoid grubuna ait 96 saatlik larvalarda normal gelişim gözlenmiştir (yumurta kesesi küçülmeye başlamış, larvanın ksantofor rengi daha belirgin hale gelmiş ve alt çene ayrılmaya başlamış) (Şekil 9A). 4F-MDMB-BUTICA, 96 saatlik larvalarda çeşitli deformitelere neden olmuştur. Bu larvalarda subakut maruziyet; anormal baş oluşumuna (Şekil 9B), kısalmış vücut uzunluğuna (Şekil 9B, E, G), yumurta kesesi

ödemine (Şekil 9E), perikardiyal ödeme (Şekil 9E,F), lordoza (Şekil 9C, D, F), yumurta kesesi deformitesine (Şekil 9B, F, G), göz küçülmesine (Şekil 9B, D), omurga deformitesine (Şekil 9G), göz deformitesine (Şekil 9G) ve pektoral yüzgeç deformitesine (Şekil 9G) yol açmıştır.



Şekil 9. 96 hpf zebra balığı larvalarının temsili görüntüleri. (A) Kontrol grubu (yan görünüm). (B) 1,20 mg/L uygulama grubu: kısalmış vücut uzunluğu (sarı ok), yumurta kesesi deformasyonu (siyah ok), göz küçülmesi ve anormal baş oluşumu (kırmızı ok). (C) 0,6 mg/L uygulama grubu: hafif lordoz (ok). (D) 1,20 mg/L uygulama grubu: şiddetli lordoz (siyah ok), göz küçülmesi (kırmızı ok). (E) 2,40 mg/L uygulama grubu: kısalmış vücut uzunluğu (mavi ok), şiddetli yumurta kesesi ödemi (kırmızı ok) ve perikardiyal ödem (siyah ok). (F) 1,20 mg/L uygulama grubu: hafif lordoz (siyah ok), yumurta kesesi deformasyonu (kırmızı ok) ve şiddetli perikardiyal ödem (mavi ok). (G) 2,40 mg/L uygulama grubu: kısalmış vücut uzunluğu ve omurga deformasyonu (siyah ok), yumurta kesesi deformasyonu (mavi ok), göz deformasyonu (sarı ok) ve göğüs yüzgeci deformasyonu (kırmızı ok) gösterilmiştir

120. saatte, kontrol grubu larvaları normal omurga morfolojisi, yüzme keselerinin şişmesi, pektoral yüzgeç gelişimi ve normal pigmentasyon sergilemiştir (Şekil 10A, B). 2,40 mg/L subakut 4F-MDMB-BUTICA'ya maruz bırakılan larvaların 120. saatte yüzme keseleri çoğunlukla gelişmemiştir (Şekil 10C, F). Ayrıca, 4F-MDMB-BUTICA, koryondan çıkan larvalarda bölünmüş yumurta kesesi (Şekil 10C), lordoz (Şekil 10D), perikardiyal ödem (Şekil 10D), gelişimde gerileme (Şekil 10D) ve kıvrık kuyruk (Şekil 10F) oluşturmuştur. Koryondan çıkamayan larvalarda da zayıf pigmentasyon, gelişimde gerileme ve yumurta kesesi ödemi tespit edilmiştir (Şekil 10G, H).



Şekil 10. 120 hpf zebra balığı larvalarının temsilci görüntüleri. (A) Kontrol grubu (yan görünüm), şişmiş yüzme kesesi (ok). (B) Kontrol grubu (dorsal görünüm), göğüs yüzgeci (kırmızı ok) ve yüzme kesesi (siyah ok). (C) 1,20 mg/L uygulama grubu: bölünmüş yumurta kesesi (siyah ok) ve şişmemiş yüzme kesesi (mavi ok). (D) 2,40 mg/L uygulama grubu: gelişimsel gerileme, şişmemiş yüzme kesesi (mavi ok), perikardiyal ödem (kırmızı ok) ve ciddi lordoz (siyah ok). (E) 0,60 mg/L uygulama grubu: şişmemiş yüzme kesesi (ok). (F) 1,20 mg/L uygulama grubu: şişmemiş yüzme kesesi (mavi ok) ve hafif eğrilmiş kuyruk (siyah ok). (G) 1,20 mg/L uygulama grubu: gelişimsel gerileme ve yumurtadan çıkmamış larva. (H) 2,40 mg/L uygulama grubu: gelişimsel gerileme, yumurta kesesi ödeme sahip yumurtadan çıkmamış larva (ok) ve zayıf pigmentasyon yer almaktadır

Tablo 5. 4F-MDMB-BUTICA Maruziyetinden Sonra 24–120 hpf’de Belirlenen Malformasyon Yüzdeleri

Maruz kalma süresi	Konsantrasyon (mg / L)	KAY (24 saat)	ASO (24 saat)	AKA (48 saat)	YKÖ (48 ve 72 saat)	PÖ (48 ve 72 saat)	AP (48-120 saat)	AGM (48-120 saat)	GG (48-120 saat)	KB (72-120 saat)	AVM (72-120 saat)	OD (96 ve 120 saat)
24s (Akut)	Kontrol	1,5±0,4	1,2±0,3	3,6±0,4	1,3±0,2	0,9±0,1	1,2±0,1	0,2±0,0	1,6±0,4	2,2±0,1	2,6±0,5	4,5±0,5
	DMSO	1,9±0,2	1,2±0,3	3,9±0,4	1,5±0,2	1,0±0,1	0,9±0,1	0,2±0,0	2,0±0,3	2,4±0,1	2,9±0,4	5,3±0,8
	0,15	1,3±0,1	1,3±0,2	3,8±0,6	1,3±0,2	1,0±0,3	1,1±0,3	0,2±0,0	2,0±0,4	2,1±0,3	2,8±0,5	5,1±0,7
	0,30	1,8±0,2	1,4±0,1	3,7±0,4	1,2±0,2	1,0±0,1	1,7±0,1	0,1±0,0	2,2±0,1	2,0±0,2	2,7±0,4	5,8±0,6
	0,60	1,5±0,2	1,2±0,3	3,8±0,2	1,3±0,2	1,4±0,1	1,4±0,0	0,1±0,0	2,4±0,2	2,2±0,2	3,1±0,4	4,5±0,4
	1,20	1,4±0,1	1,5±0,2	4,0±0,1	1,2±0,2	1,8±0,0	1,6±0,1	0,1±0,0	2,5±0,3	2,1±0,3	3,3±0,3	4,9±0,8
	2,40	1,7±0,4	1,8±0,2	4,0±0,1	1,4±0,2	1,5±0,2	1,5±0,3	0,2±0,0	2,7±0,3	2,4±0,2	3,4±0,4	5,0±0,6
	4,80	2,0±0,8	1,7±0,4	3,8±0,4	1,6±0,2	1,5±0,2	1,8±0,1	0,2±0,0	2,8±0,2	2,5±0,1	3,1±0,3	5,3±0,3
120s (Subakut)	Kontrol	1,6±0,3	1,6±0,4	4,4±0,2	1,1±0,2	1,4±0,3	1,8±0,1	0,2±0,0	2,7±0,1	2,5±0,3	3,5±0,3	5,5±0,4
	DMSO	1,9±0,1	1,5±0,3	4,7±0,4	1,2±0,8	1,6±0,2	1,8±0,2	0,2±0,0	2,7±0,1	2,4±0,2	3,6±0,4	6,0±0,4
	0,15	1,5±0,2	1,7±0,2	4,9±0,3	1,2±0,2	1,4±0,2	1,9±0,2	0,2±0,0	2,7±0,2	2,4±0,2	3,9±0,3	6,4±0,4
	0,30	1,8±0,1	1,7±0,2	4,3±0,4	1,3±0,1	1,7±0,2	1,9±0,3	0,2±0,0	2,8±0,4	2,5±0,2	3,2±0,3	6,8±0,3
	0,60	1,6±0,3	1,9±0,2	15,5±2,9*	20,5±2,8*	17,6±1,6*	25,3±2,5*	19,0±2,89*	20,8±2,2*	15,0±1,8*	27,7±3,3*	40,3±4,6*
	1,20	1,9±0,1	1,7±0,2	30,5±2,4*	36,4±2,6*	31,5±6,6*	46,0±3,4*	26,3±3,4*	41,8±4,5*	28,8±2,5*	43,5±3,4*	62,5±4,8*
	2,40	1,7±0,3	1,9±0,1	39,0±6,4*	50,1±5,4*	51,5±4,7*	48,5±4,5*	56,8±3,8*	65,4±3,4*	36,3±3,3*	61,0±5,6*	77,5±4,8*
	4,80	1,8±0,4	1,8±0,3	60,0±3,9*	65,7±2,4*	70,0±3,1*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*

Tüm anormallikler, belirtilen zaman noktasındaki canlı embriyolara dayalı teratojenik etkileri gösterir. Veriler ortalama $\pm$ SD (n=90) olarak sunulmuştur. Tek yönlü Anova Dunnett'e göre, aynı sütunda yıldız işareti olan gruplar ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). KAY; Kuyruk ayrılması yok, ASO; Anormal somit oluşumu, AKA; Anormal kan akışı, YKÖ; Yumurta kesesi ödemi, PÖ; Perikardiyal ödem, AP; Anormal pigmentasyon (zayıf veya pigmentasyon olmayan göz ve vücut), AGM; Anormal göz morfolojisi, GG; Gecikmiş gelişim, koryondan çıkışta gecikme ve gelişmede yavaşlama (kuyruk aktivitesi yok, boy kısalmış, çene oluşumu yok, yüzme kesesi oluşumu yok, yüzme yok vb.), KB; Kuyrukta bükülme, AVM; Anormal vücut morfolojisi, OD; Omurga deformiteler.

Davranış Analizi

4F-MDMB-BUTICA'nın zebra balığı embriyolarında oluşturduğu davranışsal anormallikler milimetre (mm) cinsinden nicel olarak incelenmiş ve 4 puanlı bir puanlama sistemi (Touch-Evoked Response; TER) kullanılarak değerlendirilmiştir. Akut maruziyet larvalarda herhangi bir davranışsal anormalliğe yol açmamıştır. Benzer şekilde, subakut maruziyette 0,15 ve 0,30 mg/L konsantrasyonlarında kontrol gruplarına benzer şekilde normal yüzme davranışı gözlenmiştir. Ancak, 0,60 ila 2,40 mg/L arasında değişen konsantrasyonlarda 4F-MDMB-BUTICA'ya maruz kalan larvalarda yüzme mesafesinde önemli azalmalar gözlenmiştir (Tablo 6). Örneğin, 1,20 mg/L grubunun ortalama yüzme mesafesi (mm cinsinden), kontrol grubuna kıyasla %80 oranında azalmıştır.

Tablo 6. 4F-MDMB-BUTICA'ya Maruz Bırakılan Zebra Balığı Embriyolarının TER (Dokunmaya Tepki Yanıtı) Değerlendirmesi

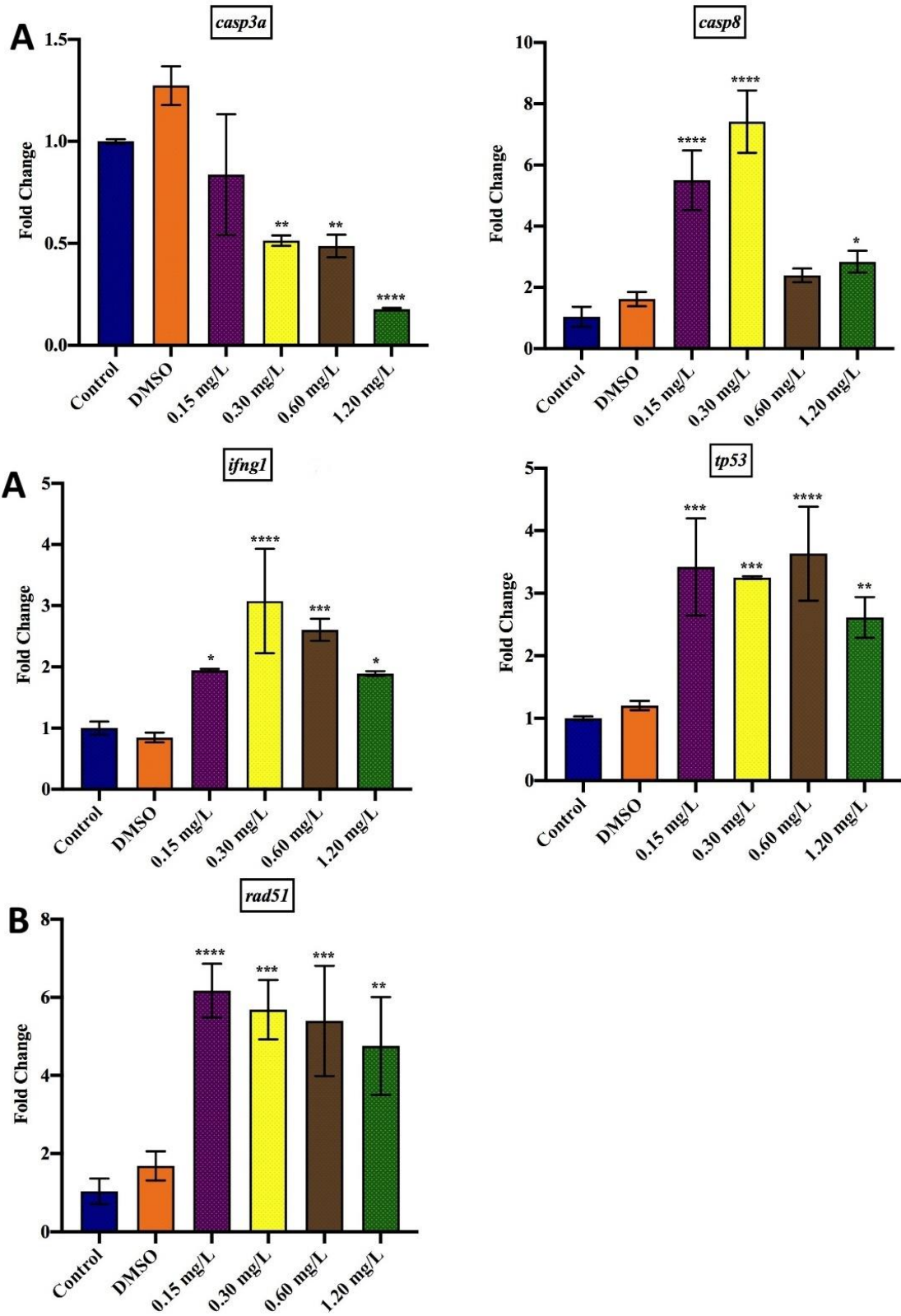
Gruplar	Akut maruziyet		Subakut maruziyet	
	Yüzme mesafesi (mm)	Yüzme mesafesi (puan)	Yüzme mesafesi (mm)	Yüzme mesafesi (puan)
Kontrol	45.5±1.0 ^a	2.4±0.2 ^a	43.0±1.8 ^a	2.4±0.21 ^a
DMSO	45.5±1.3 ^a	2.2±0.1 ^a	41.8±2.6 ^a	2.2±0.12 ^a
0.15 mg/L	45.3±2.6 ^a	2.5±0.1 ^a	41.2±2.7 ^a	2.2±0.14 ^a
0.30 mg/L	44.3±0.7 ^a	2.3±0.2 ^a	34.2±2.2 ^{a,b}	2.0±0.12 ^a
0,60 mg/L	44.4±1.9 ^a	2.4±0.2 ^a	19.5±4.7 ^{b,*}	1.7±0.43 ^{b,*}
1.20 mg/L	44.3±1.5 ^a	2.3±0.2 ^a	9.3±1.3 ^{c,*}	0.6±0.27 ^{c,*}
2.40 mg/L	43.1±1.9 ^a	2.3±0.1 ^a	2.3±0.3 ^{d,*}	0.3±0.00 ^{d,*}
4,80 mg/L	43.8±1.5 ^a	2.3±0.1 ^a	TE	TE

Veriler ortalama ± standart sapma (n=6) şeklinde sunulmuştur. Post hoc Duncan testine göre, aynı sütunda farklı harflerle gösterilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05). Tek yönlü ANOVA Dunnett testine göre, aynı sütunda yıldız işareti (*) bulunan gruplar ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05). TE, tespit edilemedi.

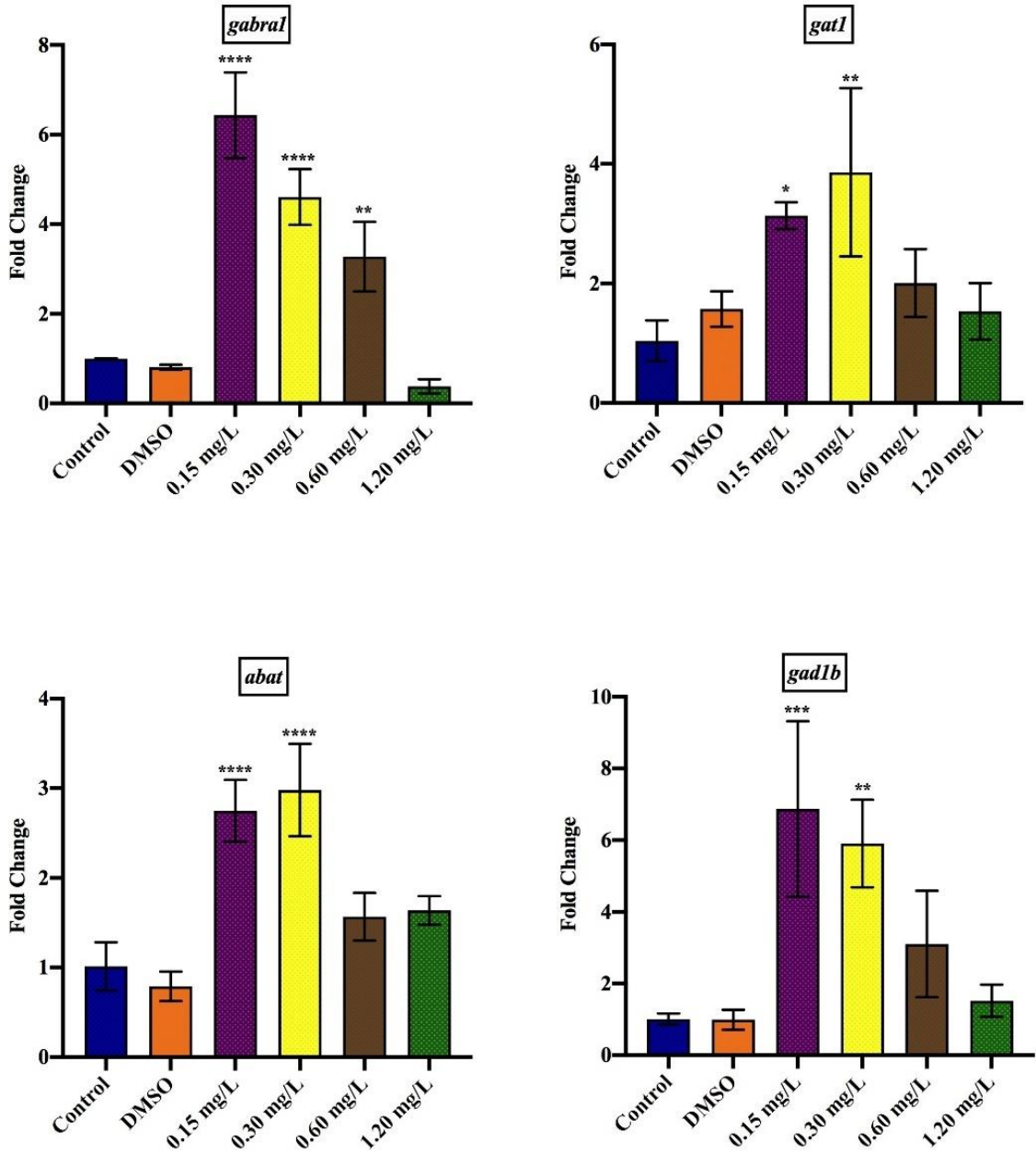
4F-MDMB-BUTICA'nın Gen Ekspresyon Düzeyleri Üzerindeki Toksikogenomik Etkileri

Şekil 11-14'te görüldüğü gibi, 120 saat boyunca (uzun süreli maruziyet) subletal 4F-MDMB-BUTICA dozları zebra balığı larvalarında dopaminerjik (DA), serotoninerjik (5-HT) ve GABAerjik (GABA) nörotransmisyon, davranış, apoptoz ve DNA onarımı ile ilişkili genlerin mRNA ekspresyon düzeylerini değerlendirmek amacıyla toksikogenomik bir yaklaşımla analiz edilmiştir. Akut maruziyet grubuna ait larvaların genlerinde herhangi bir değişiklik gözlenmezken 4F-MDMB-BUTICA'ya subakut maruziyet, genlerde dozdan bağımsız bir şekilde önemli değişikliklere neden olmuştur. Apoptoz (*casp3a*, *casp8*, *ifn1* ve *tp53*) ve DNA onarım (*rad51*) genlerinin ifade seviyelerinde anlamlı bir fark görülmüştür.

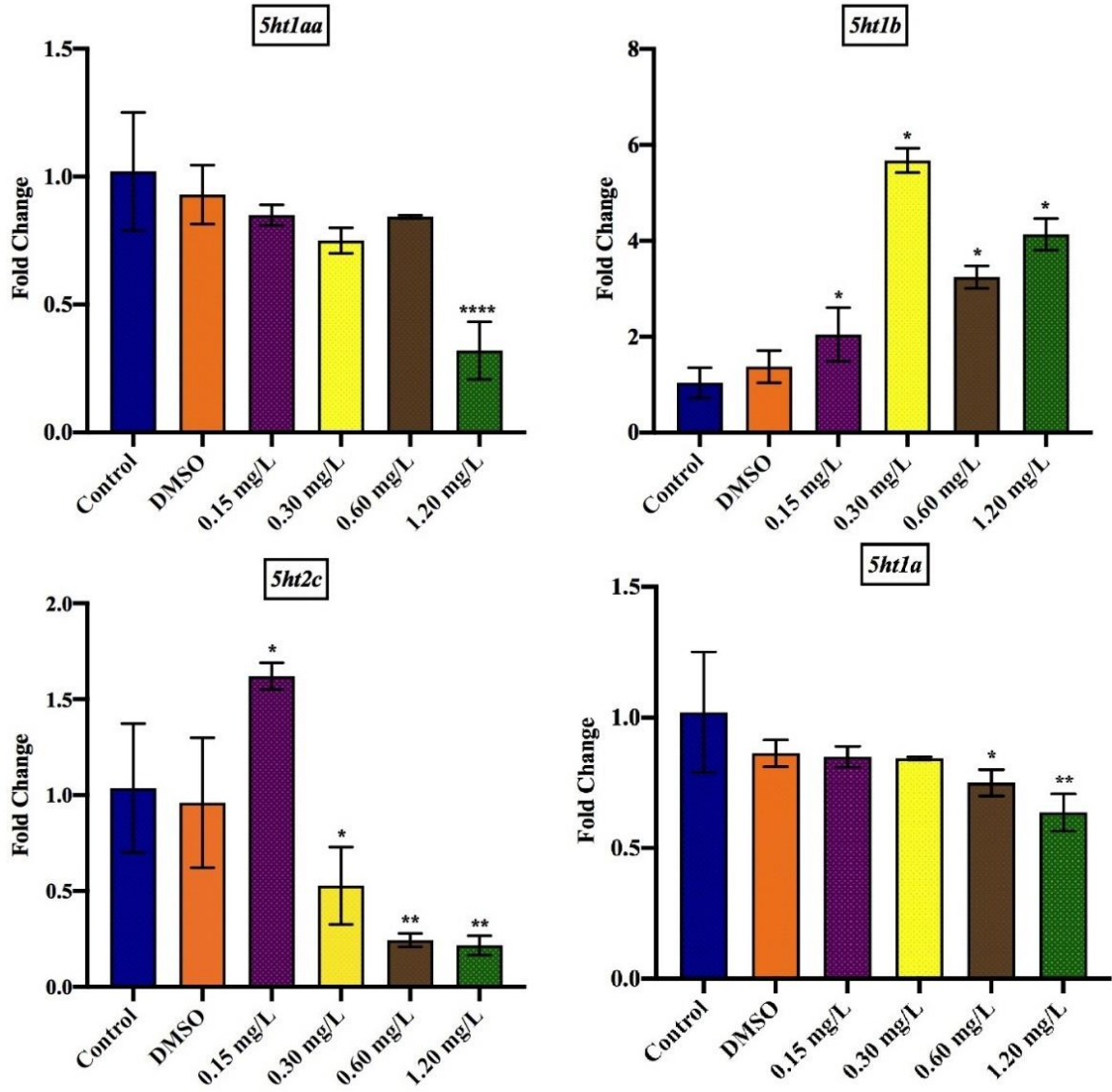
casp8, *ifng1*, *tp53* ve *rad51* genlerinin mRNA seviyeleri anlamlı şekilde artarken, *casp3a* mRNA seviyeleri azalmıştır (Şekil 11). GABA (*gabral*, *gat1*, *abat* ve *gad1b*) ile ilişkili genlerin mRNA seviyeleri 0,15 ve 0,30 mg/L'de artmış, ardından genel olarak 0,60 ve 1,20 mg/L gruplarında azalmıştır (Şekil 12). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, bazı serotoninle ilişkili genlerin (*5ht1aa* ve *5ht1a*) ekspresyon seviyesi, maruziyet gruplarında önemli ölçüde azalmıştır. *5ht1b* ekspresyonunda önemli bir artış gözlenmiştir. Ayrıca, *5ht2c* mRNA'sı 0,15 mg/L grubunda artarken, 0,30, 0,60 ve 1,20 mg/L gruplarında azalmıştır (Şekil 13). Dopamin taşıyıcısı (*dat*) ve dopamin reseptörü 1'in (*drd1*) gen ekspresyon düzeyleri, kontrol grubundakilerden daha yüksek bulunmuştur. Dopamin reseptörü 3'teki (*drd3*) artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı anlaşılmıştır (Şekil 14A). Öte yandan, kannabinoidlere subakut maruziyet, gonadotropin salgılatıcı hormon (*gnrh3*) ve gonadotropin salgılatıcı hormon reseptörü (*gnrhr3*) genlerinin mRNA ekspresyonunu arttırırken, kisspeptin2 geninin (*kiss2*) ifadesini azaltmıştır (Şekil 14B). DMSO grubunda kontrol grubuna kıyasla gen ifadesinde herhangi bir farklılık bulunmamıştır (Şekil 11-14).



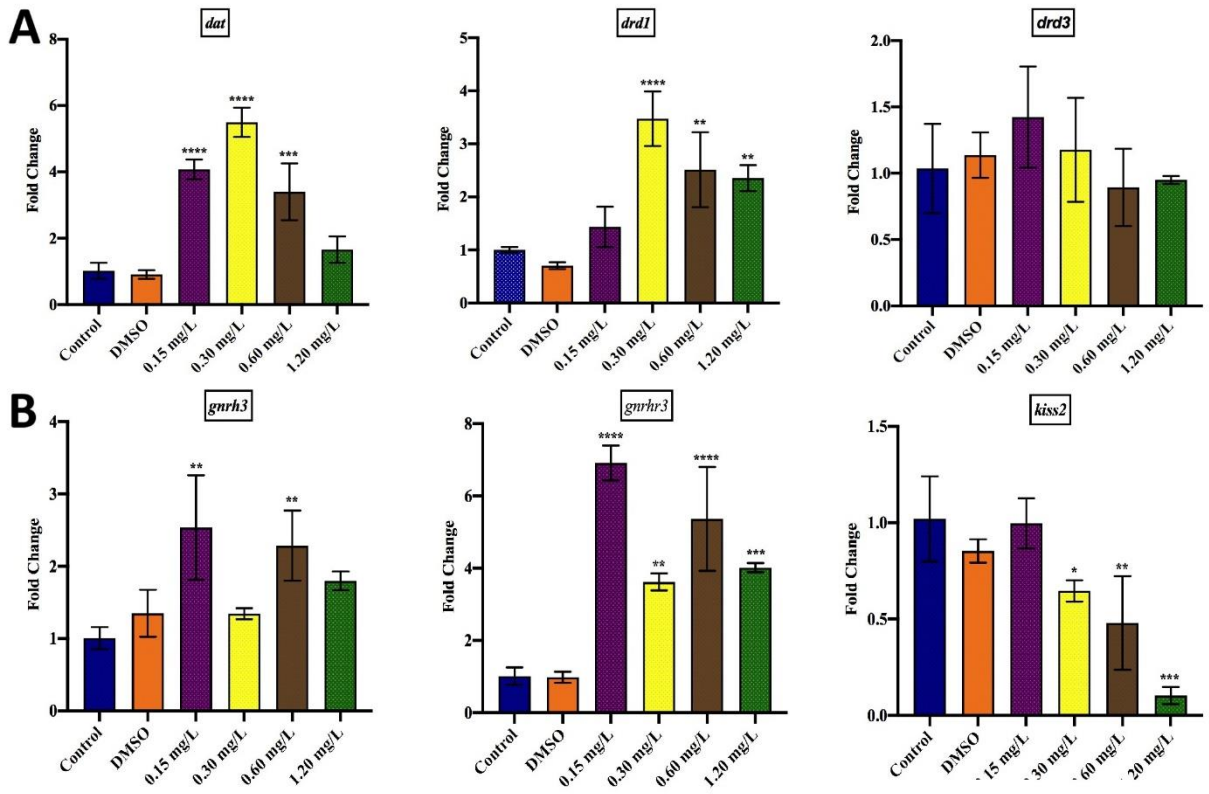
Şekil 11. 120 hpf'de zebra balığı larvalarında apoptoz (A) ve DNA onarımı (B) ile ilişkili genlerin ifadesi üzerine 4F-MDMB-BUTICA'nın etkileri. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir (n=25). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ kontrol grubuna kıyasla aradaki farkın önemli olduğunu göstermektedir



Şekil 12. 120 hpf'de zebra balığı larvalarında GABA ile ilişkili genlerin ifadesi üzerine 4F-MDMB-BUTICA'nın etkileri. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir (n=25). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 kontrol grubuna kıyasla aradaki farkın önemli olduğunu göstermektedir.



Şekil 13. 120 hpf'de zebra balığı larvalarında serotonin ile ilişkili genlerin ifadesi üzerine 4F-MDMB-BUTICA'nın etkileri. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir (n=25). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ kontrol grubuna kıyasla aradaki farkın önemli olduğunu göstermektedir



Şekil 14. 120 hpf'de zebra balığı larvalarında dopamin (A) ve davranış (B) ile ilişkili genlerin ifadesi üzerine 4F-MDMB-BUTICA'nın etkileri. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir (n=25). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ kontrol grubuna kıyasla aradaki farkın önemli olduğunu göstermektedir

TARTIŞMA ve SONUÇ

Mevcut çalışmada, 4F-MDMB-BUTICA'nın akut ve subakut maruziyetleri takiben zebra balığı embriyoları üzerindeki etkilerini çeşitli parametreler üzerinden incelenmiştir. Sonuçlar, 4F-MDMB-BUTICA'nın embriyonik gelişimde kusurlara, larvalarda davranış değişikliklerine ve önemli genlerin ifadesinde değişikliklere yol açabileceğini göstermiştir. 120 saat boyunca kannabinoidlere maruz kalan embriyolar çeşitli gelişimsel değişiklikler göstermiştir. Mevcut bulgular şu şekilde özetlenebilir: 4F-MDMB-BUTICA'ya maruz bırakılan embriyolar, (1) daha kısa larva vücut uzunlukları, (2) düşük kalp atış hızları, (3) düşük hayatta kalma oranı, (4) hafif morfolojik anormallikler, (5) yumurtadan çıkmamış larvalar, (6) dokunma uyaranlarına düşük tepki oranları ve (7) bazı önemli genlerin ifadesinde değişiklikler sergilemiştir. 4F-MDMB-BUTICA, zebra balığı embriyolarında ölümcül etki ve morfolojik değişikliklere neden olmuş ve bu olumsuz etkiler konsantrasyona ve zamana bağlı olarak artmıştır. 4F-MDMB-BUTICA'nın 120 saatlik LC₅₀ ve EC₅₀ değerleri sırasıyla 1,932 ve 0,960 mg/L'dir. 4F-MDMB-BUTICA üzerinde çok az toksisite çalışması bulunmaktadır (Abdelgadir *et al.* 2024) ve LC₅₀ değeri hakkında veri bulunmamaktadır. LC₅₀ değeri bu çalışmada ilk kez verilmiştir. Zebra balığı embriyolarında tetrahidrokannabinol (THC), kannabidiol (CBD) ve kannabinol (CBN) dahil olmak üzere diğer yaygın kannabinoidleri içeren araştırmalarda da benzer bulgular kaydedilmiştir. 4F-MDMB-BUTICA'nın LC₅₀ değeri, THC (3,65 mg/L) ve CBD'ye (0,53 mg/L) oldukça benzerdir (Carty *et al.* 2019), bu da 4F-MDMB-BUTICA'nın benzer toksikolojik etkilere sahip olabileceğini göstermiştir. Benzer şekilde, zebra balığı embriyolarındaki THC'nin LC₅₀ değeri, Chatzimitakos ve ark. (2022) tarafından 1,54 mg/L olarak hesaplanmıştır. CBD için LC₅₀ değerleri 48 besli ortamında 4,4 mg/L ve 72 besli ortamında zebra balığı larvasında 3,7 mg/L'dir (Xuet *al.* 2021). CBN için hesaplanan LC₅₀ değeri ise 1,12 mg/L olarak bulunmuştur (Chousidis *et al.* 2020).

Sonuçlarımız, özellikle morfolojik ve gelişimsel değişikliklere odaklanarak, 4F-MDMB-BUTICA ile ilişkili embriyotoksositeye dair ilk raporu temsil etmektedir. Zebra balığı üzerinde yapılan çalışmalar da kannabinoidlerin olumsuz etkilerini göstermiştir. THC ve CBD'ye maruz bırakılan zebra balığı embriyoları daha kısa larva uzunlukları ve azalmış hayatta kalma, yumurtadan çıkma oranları ve kalp atış hızları göstermiştir (Ahmed *et al.* 2018). Başka bir çalışmada ise, THC, sentetik kannabinoidler CP 55940 ve WIN'in zebra balığı embriyolarında kavisli eksen, yumurta kesesi ve perikardiyal ödem, yüzme kesesi gerginliği ve bazı dismorfolojilere neden olduğu gözlemlenmiştir (Akhtar *et al.* 2013). Sentetik bir

kannabinoid olan 5F-APINAC, zebra balığı larvalarında yumurtadan çıkmamış larvalar, kavisli kuyruklar ve hiperpigmentasyon gibi çeşitli morfolojik ve gelişimsel değişikliklere neden olabilir (Markin *et al.* 2021). Chatzimitakos ve ark. (2022), THC'nin zebra balığı embriyolarında kuyruk kıvrılması ve perikardiyal ödem gibi fenotipik anormalliklere neden olduğunu gözlemlemiştir.

CBD ve THC, ödem, vücut ekseninde eğrilik ve göz, ağız önü kısım, çene, gövde ve yüzgeçlerde anormallikler dahil olmak üzere benzer olumsuz morfolojik etkilere neden olmuş; ayrıca yüzme kesesi şişkinliği ve davranışsal bozukluklar da gözlemlenmiştir (Carty *et al.* 2018). Gelişimleri sırasında kodein ve morfine maruz kalan zebra balığı embriyolarında göz boyutunda küçülme gözlemlenmiştir (Cadena *et al.* 2021). 120 hpf'deki zebra balığı larvalarında CBN ve kannabidivarin'in (CBDV) etkileri üzerine yapılan araştırmalar, 0,75 mg/L'nin üzerindeki konsantrasyonların malformasyonlara ve bradikardiye yol açtığını göstermiştir (Thornton *et al.* 2020). Chousidis ve ark. (2020), CBN'nin doza bağlı perikardiyal ödem, yumurta kesesi deformiteleri, kuyruk bükülmesi, kan akışında azalma ve ip benzeri kalp oluşumuna neden olduğunu bildirmiştir. Liu ve Stainier (2012), kalp atış hızının kardiyak fonksiyonda önemli bir parametre olduğunu belirtmiştir. Bu çalışma, 4F-MDMB-BUTICA'nın zebra balığı embriyolarında perikardiyal ödeme neden olduğunu ve kalp atış hızını düşürdüğünü bulmuştur. Diğer çalışmalarda da benzer bulgular bildirilmiştir. Araştırmalar, CBN'ye maruz kalan zebra balığı embriyolarının kalp atış hızının doza bağlı olarak azaldığını göstermiştir. Bu durum, kalbi sıkıştıran ve kalp atış hızında düşüşe neden olan perikardiyal ödemden kaynaklanan artan basınçtan kaynaklanmaktadır. Perikardiyal ödemin boyutu doza bağlıdır ve kalp atış hızındaki azalmayla orantılıdır (Chousidis *et al.* 2020). Diğer araştırmacılar da THC ve CBD'ye maruz kaldıktan sonra kalp atış hızında önemli bir azalma bulmuşlardır (Ahmed *et al.* 2018). Kannabimimetiklerin embriyonik gelişim üzerindeki olumsuz etkileri çeşitli hayvan modelleri kullanılarak gösterilmiştir. Araştırmalar, THC'ye maruz kalan gebe tavşanların embriyolarında ölüm oranlarının arttığını ortaya koymuştur (Rosenkrantz *et al.* 1986). Rosenkrantz (1999), THC ve esrarın fetal rezorpsiyon oranlarını artırdığını, iskelet gelişimi anormalliklerine neden olduğunu ve kemirgenlerde hidronefroz, hidrocefali ve yarık damak gibi rahatsızlıklarla bağlantılı olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde, HU 210 olarak bilinen sentetik bir kannabinoidin civciv embriyolarında ölüm oranlarını artırdığı ve vücut uzunluğunu, embriyo ağırlığını ve beyin ağırlığını azalttığı bulunmuştur (Gustafsson and Jacobsson 2019). Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) (1997) göre, esrar tüketimi doğumda boy ve kilo kaybına katkıda bulunabilir. Ayrıca, Gilbert ve ark. (2016), sentetik kannabinoidlerin teratojenik etkilere sahip olabileceğini bildirmiştir. Yakın tarihli bir çalışma, bir sentetik kannabinoid türü olan CP-55.940'ın gelişimsel ve teratojenik etkilerini araştırmıştır. Araştırma,

gebeliğin 8. gününde CP55.940'a maruz kalan farelerin yavrularında önemli malformasyonlar tespit edildiğini bulmuştur. Fetüslerdeki kraniyofasiyal, oküler ve beyin anormallikleri arasında lateral ve median yüz yarıkları, yarık damak, mikroftalmi, iris kolobomu, anoftalmi, ekzensefali, holoprosensefali ve kortikal displazi yer almaktadır. Gelişimsel bulgularımız, yukarıda belirtilen çalışmaların sonuçlarıyla tutarlı görünmektedir.

Zebra balığı larvaları (120 hpf), sindirim sistemleri tamamen geliştiğinde ve yüzme keseleri şiştiğinde yüzme hareketlerine başlar (Vaz, Hofmeister and Lindstrand 2019). Zebra balığı larvalarının davranışları, gelişimin ilk 120 saati boyunca hızla değişir (Guzman *et al.* 2020). Bu nedenle larvalar, zebra balıklarında kimyasalların etkileri üzerine yapılan davranış çalışmalarında tercih edilir. Çalışmada, subakut maruziyet sırasında 4F-MDMB-BUTICA'ya maruz kalan larvaların davranışlarında, kat edilen mesafede azalma ile karakterize bir değişiklik gözlemlenmiştir. Bulgularımız, zebra balıklarında kannabinoidleri test eden önceki çalışmalarla büyük ölçüde uyumludur. Hasumi, ve ark. (2020), CBD'nin 4 ila 6 hpf zebra balığı larvalarında hareket hızını ve kat edilen toplam mesafeyi azalttığını bildirmiştir. Başka bir çalışmada, THC'nin 5 hpf larvalarda lokomotor aktiviteyi azalttığı gözlemlenmiştir (Achenbach *et al.* 2018). Chatzimitakos ve ark. (2022), THC konsantrasyonu arttıkça kat edilen mesafenin azaldığını göstermiştir. CBN ile tedavi edilen beş ila yedi günlük döllenme sonrası zebra balığı larvaları, mekanik kaçış tepkisi testinde daha az mesafe göstermiştir (Chousidis *et al.* 2020). Bir deneyde, zebra balığı embriyoları kodein ve morfine maruz bırakılmış, 7 günlük larvalarda yüzmenin azaltıldığı ve aydınlık-karanlık döngü testlerinde davranış kusurları göstermiştir (Cadena *et al.* 2021). THC ve CBD, 4-5 günlük larvaların sinirsel ve lokomotor aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır (Carty *et al.* 2019). Başka bir çalışma, 0,1-0,3 mg/L CBD'nin 120 saatlik zebra balığı larvalarında hipolokomotor etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Carty *et al.* 2018). Bu bulgular, yetişkin zebra balıklarında bildirilen sonuçlarla tutarlıdır (Connors *et al.* 2014; Dahlén *et al.* 2021; Jensen *et al.* 2018).

Özellikle, azalmış koryondan çıkma oranları, daha kısa vücut uzunluğu ve yüksek ölüm oranı kombinasyonu, THC, CBD ve 5F-APINAC'a maruz kalan zebra balıklarında gözlemlenen kanabinoid kaynaklı gelişimsel bozulmanın klasik özelliklerini yansıtmaktadır (Ahmed *et al.* 2018; Markin *et al.* 2021). Bu nedenle mevcut bulgular, sentetik kannabinoidlerin fitokannabinoidlerle örtüşen teratojenik yolları paylaştığını ve bunun potansiyel olarak CB1/CB2 reseptör etkileşimi ve oksidatif stres yolları aracılığıyla gerçekleştiğini öne süren giderek artan kanıtlara katkıda bulunmaktadır (Filipiuc *et al.* 2021). Dahası, zebra balığı embriyolarının maternal metabolizmadan yoksun olduğu düşünüldüğünde, bu etkilerin metabolit müdahalesinden ziyade bileşiğin doğrudan etkisini temsil etmesi muhtemeldir.

Zebra balığı embriyolarında 4F-MDMB-BUTICA kaynaklı gelişimsel toksisitenin moleküler mekanizmasını daha ayrıntılı olarak araştırmak amacıyla, çalışmada apoptoz, DNA onarımı, nörotransmisyon ve davranışla ilişkili genlerin ekspresyonu değerlendirilmiştir. Apoptoz ve dopamin yolları nörotoksistide önemli roller oynar. Kaspazlar apoptozun özünü oluşturur. Apoptoz sürecinde uç bölgeden kesim yapan enzimler arasında en önemlisi kaspaz-3'tür. (Salvesen 2002). *casp3* ekspresyonunun zebra balığı embriyolarında yaygın apoptozu indüklediği bilinmektedir (Yamashita *et al.* 2008). Kaspaz-8, ölüm reseptörüyle ilişkili apoptotik sinyallere aracılık eder (Wyllie 2010). Kaspaz-3, kaspaz-8 ile etkileşime giren *casp3* geni tarafından kodlanan bir kaspaz proteinidir (Ateş Kalkan *et al.* 2021).

tp53, tümör baskılayıcı bir genidir ve birçok omurgalı türünde tümör duyarlılığını etkiler (Diamanti-Kandarakis *et al.* 2009). İnterferon gama'nın (*ifng*), zebra balığında makrofaj yeniden programlamasını, serebrovasküler yeniden şekillenmeyi ve bilişsel işlev bozukluğunu yönlendirdiği bilinmektedir (Apaydin *et al.* 2023). *rad51*, çift zincirli DNA kırıklarının onarımında rol oynayan bir genidir (Bonilla *et al.* 2020). Çalışmada, *casp3a*'nın ifade seviyesi azalırken, *casp8*, *ifng1*, *tp53* ve *rad51*'in ifade seviyeleri 120 saatlik larvalarda önemli ölçüde artmıştır. Gen ifadesindeki bu anormal artış, düzensiz apoptoza yol açmış ve larvalarda hem bilişsel hem de morfolojik anormalliklere neden olmuş olabilir. Ayrıca, *rad51* ekspresyonunun artması embriyonik hücrelerde DNA hasarının arttığını gösterebilir.

Dopamin, sinirsel düzenlemede önemli bir rol oynar. Dopamin taşıyıcısı (*dat*) ve dopamin reseptörleri (*drd1* ve *drd3*), dopamin sinyal yolunun temel bileşenleridir. Bu dopaminerjik yoldaki anormallikler, zebra balığında nörogelişimsel toksisteye yol açabilir (Liu *et al.* 2021). Bu araştırmada, maruz kalma gruplarındaki dopaminle ilişkili genlerin ifade seviyelerinde önemli bir artış görülmüştür. Genlerin bu artan ifadesi, artan dopamin aktivitesiyle bağlantılı olabilir. Zebra balığında bu bulguyu destekleyen çalışmalar mevcuttur. Başka bir çalışmada; zebra balığı embriyoları, 24 hpf sonrası gelişim aşamasında THC ve AM-251'e 96 saat boyunca maruz bırakıldı ve bu bileşiklerin dopamin öncüllerinin sentezini artırdığı gözlemlendi (Akhtar *et al.* 2016). Markin ve ark. (2021), sentetik bir kannabinoid olan 5F-APINAC'a maruz kaldıktan sonra dopamin seviyesindeki artışın, kannabinoidin merkezi sinir sistemini dopaminerjik sistem aracılığıyla etkilediğini gösterebileceğini bildirmiştir. Birçok bağımlılık yapıcı maddenin dopamin salınımını artırdığı veya nöronlara geri emilimini engellediği gösterilmiştir (Bloomfield *et al.* 2016). Dopamin taşıyıcısı (*dat*), dopaminin geri emiliminden sorumludur (Meiser *et al.* 2013) ve artan ekspresyonu dopamin seviyelerinin yükselmesine neden olur. Metamfetamin alımıyla ilişkili artan dopamin seviyeleri, *dat* ekspresyonuyla ilişkilendirilmiştir (Ares-Santos *et al.* 2013). Çalışmamızdaki *dat* artışı,

dopamin seviyesinde bir artışa işaret etmektedir ve bu sonuç, yukarıdaki çalışmaların bulgularıyla tutarlıdır.

GABA'daki anormalliklerin nörolojik bozukluklarla ilişkili olduğu bilinmektedir (Fontes *et al.* 2018). *gat1*, *gabral*, *gad1b* ve *abat* genleri, GABA nörotransmitter sentezi, dönüşümü ve inaktivasyonu gibi başlıca GABA aktivitelerinin gerçekleştirilmesinde önemli roller oynar (Yan *et al.* 2017). *gad1b*, glutamati GABA'ya dönüştürür (Kruft *et al.* 2007). Heterpentamerik GABAA reseptörlerinden biri olan *gabral*, merkezi sinir sisteminde inhibitör sinyal iletimini düzenleyen, nöronal hiperpolarizasyona ve nöronal sinyal iletiminin inhibisyonuna neden olan ligand kapılı bir iyon kanalıdır (Steven and Garrett 2014). *gat1*, sinaptik aralıktaki GABA'nın yaklaşık %85'inin geri alımından sorumludur (Chen *et al.* 2004). *abat*, toplanan GABA'yı süksinik semialdehite metabolize edebilir veya sinaptik veziküllere geri dönüştürülebilir (Yu *et al.* 1984). Mevcut çalışmada, 120 saatlik larvalarında *gabral*, *gat1*, *abat* ve *gad1b*'nin mRNA ifadeleri düşük kannabinoid konsantrasyonlarında artmış, ancak yüksek dozlarda azalmıştır. Bu durum, embriyo ve larvalarda GABA'nın taşınması ve dönüşümündeki bozulmalara bağlanabilir. 4F-MDMB-BUTICA maruziyetine yanıt olarak nöronların hiperpolarizasyonu nedeniyle GABA'da kontrolsüz bir artış, larvalardaki hareket davranışındaki azalmayı açıklayabilir.

Nörotransmitterle ilişkili genlerin yukarı veya aşağı yönlü düzenlenmesi, kannabinoid kaynaklı nörotoksositeye karşı gelişen nöroadaptif ya da telafi edici yanıtları yansıtır olabilir. Apoptoz ve DNA onarımıyla ilişkili genlerin artan ekspresyonu ise genotoksik stres ve hücrel savunma mekanizmalarının aktive olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, gen ekspresyonu verilerinin yalnızca transkripsiyonel yanıtları yansıttığı ve protein düzeyleri veya enzim aktivitesi ile doğrulanmadıkça doğrudan fonksiyonel sonuçlara karşılık gelmeyebileceği unutulmamalıdır. Transkripsiyon sonrası modifikasyonlar, translasyon verimliliği ve protein yıkımı gibi mekanizmalar, mRNA ve protein düzeyleri arasında uyumsuzluklara yol açabilir (Vogel and Marcotte, 2012). Bu nedenle, bu transkripsiyonel değişimlerin fonksiyonel öneminin ve fenotiple ilişkilerinin doğrulanması için Western blot, ELISA veya immünohistokimyasal yöntemlerin kullanılacağı gelecekteki çalışmalar gereklidir.

Bu çalışmada gözlemlenen morfolojik, davranışsal ve gen ekspresyonu değişikliklerine ek olarak, çevresel toksik maddelere karşı genom çapında transkripsiyonel yanıtları inceleyen toksikogenomik alanına önemli bir katkı sağlanmaktadır. Toksikogenomik profillemeye, gözlemlenebilir fenotipik sonuçlardan önce veya onlarla ortaya çıkan erken moleküler biyobelirteçlerin ve etkilenen biyolojik yolların belirlenmesini sağlar (Van Aggelen *et al.* 2010). Bu çalışmada, 4F-MDMB-BUTICA'ya maruziyet sonrasında nörotransmisyon (örneğin,

gabral1, gad1b, dat, 5ht1a), apoptoz (örneğin, *casp3a, tp53*) ve DNA onarımı (*rad51*) ile ilişkili anahtar genlerin farklı düzeylerde ekspresyon göstermesi, bu bileşiğin temel biyolojik yolları hedef aldığını ortaya koymaktadır. Nörotransmitterle ilişkili genlerin yukarı yönde düzenlenmesi, kannabinoid kaynaklı nörotoksositeye karşı nöroadaptif veya telafi edici yanıtları yansıtır olabilirken; apoptoz ve DNA onarımıyla ilişkili genlerin artan ekspresyonu, genotoksik stresin ve hücrel savunma mekanizmalarının aktive olduğunu düşündürmektedir.

Saldırgan davranışı etkileyen en önemli nörotransmitter serotoninidir (Guo *et al.* 2023). Merkezi sinir sisteminde yaygın olarak bulunan serotonin, duyguların, iştahın, uykunun ve çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar. Ayrıca serotonin, omurgalıların embriyonik gelişiminde önemli bir rol oynar (Buznikov *et al.* 2003). Ayrıca balıklarda gelişimi, hareketi ve kaygıyı düzenlemeye yardımcı olur (Shi *et al.* 2022). Bu çalışmada, serotonin sinyalizasyonunda rol oynayan *5ht1aa, 5ht1a, 5ht1b* ve *5ht2c* olmak üzere dört temel gen ölçülmüştür. Serotonin ile ilişkili bazı genlerin (*5ht1aa* ve *5ht1a*) ifade seviyeleri, maruz kalma gruplarında önemli ölçüde azalmıştır. *5ht1b* ifadesinde önemli bir artış gözlenmiştir. Ek olarak, *5ht2c* mRNA'sı 0,15 mg/L grubunda artmış, ardından 0,30, 0,60 ve 1,20 mg/L gruplarında azalmıştır. 4F-MDMB-BUTICA, zebra balığında serotoninle ilişkili gen ekspresyonunu etkileyerek anormal nörotransmisyonu neden olmuştur. Serotonin ekspresyonundaki bu değişiklikler, çalışmada gözlemlenen anormal gelişim ve davranışlara katkıda bulunabilir.

gnrh3, gnhr3 ve *kiss2* genleri kisspeptin/GnIH sinyal yolunda rol oynar (Guo *et al.* 2023). İlginç bir şekilde, gonadotropin salgılatıcı hormon (*gnrh3*) gen ekspresyonu 24-26 saatlik gelişim döneminde koku alma çukurunda başlamış ve zebra balığının erken larva evresinde koku alma soğanına yayılmıştır. *gnrh3* geninin zebra balığı larvalarının beyninin farklı bölgelerinde eksprese edildiği ve farklı işlevler görebileceği tahmin edilmektedir (Kuo *et al.* 2005). *gnrh3* geni, cinsiyet farklılaşmasında, beyin gelişiminde ve kamera tipi gözlerin gelişiminde rol oynar (NCBI, 2025). Ayrıca ilkel germ hücrelerinin (PGC'ler) çoğalmasında da düzenler (Feng *et al.* 2020). *gnhr3* geni, gonadotropin salgılatıcı hormon reseptörüdür (NCBI 2025). Kisspeptin2 bir nöropeptittir. Zebra balığının beyinde ve birçok periferik dokusunda olduğu bulunmuştur. Kiss2'nin zebra balığındaki etkileri tam olarak bilinmemekle birlikte, nöropeptitin hipofizde *gnrh3* salınımını uyarak hormon ekspresyonunu dolaylı olarak etkilediği tahmin edilmektedir (Song *et al.* 2020). 4F-MDMB-BUTICA'ya subakut maruziyet, *gnrh3* ve *gnhr3* genlerinin mRNA ekspresyonunu artırırken, *kiss2*'yi azaltmıştır. Bu nedenle, *kiss2*'deki azalma; *gnrh3* ve *gnhr3*'teki artış, gonadotropin salgılanmasını etkilemiştir. Artan gonadotropin seviyelerinin zebra balığı larvalarının merkezi sinir sistemini etkilediği tahmin edilmektedir. Yukarıda belirtildiği gibi, gonadotropinin balıklarda cinsiyet farklılaşmasında ve

PGC'lerin proliferasyonunda etkili olduğu bilinmektedir. Zebra balıklarında gonad gelişimi 10 ila 14 günlükken başlar ve testis ya da overlere dönüşüm yaklaşık 21. günde gerçekleşir (Uchida *et al.* 2002). Bu farklılaşma, PGC'lerin sayısından etkilenir: Yüksek seviyede PGC yumurtalık gelişimine yol açarken, düşük seviyede PGC testis gelişimine neden olur (Tzung *et al.* 2015). Artan gonadotropin seviyeleri, gonad gelişiminin erken evrelerini gösterebilir ve daha fazla sayıda PGC nedeniyle daha yoğun dişi bireyle ilişkilidir. Bu bağlamda, kannabinoidlerin de cinsel farklılaşmayı etkileyebileceği düşünülebilir.

4F-MDMB-BUTICA'ya maruz bırakılan zebra balığı embriyolarında gözlemlenen davranışsal değişiklikler, özellikle azalmış lokomotor aktivite, ışık-karanlık geçiş testlerinde hipoaktivite ve zayıflamış dokunma tepkisi gibi nörotransmisyonu ve nöronal gelişimi etkileyen nörotoksik bir etki mekanizmasına işaret etmektedir. Bu tür fenotipler genellikle dopaminerjik, GABAerjik ve glutamaterjik sistemleri içeren nörogenez, sinaptogenez ve nörotransmitter sinyallemedeki bozulmalarla ilişkilidir (Burton and Burgess, 2023; Kalueff *et al.* 2016). 4F-MDMB-BUTICA da dahil olmak üzere sentetik kannabinoidlerin, zebra balığı ve diğer omurgalıların gelişmekte olan merkezi sinir sisteminde bol miktarda bulunan CB1 reseptörlerinin güçlü tam agonistleri olarak davrandığı bilinmektedir. CB1 reseptör aktivasyonu, aksonal yönlendirme, sinaptik budanma ve kalsiyum sinyallemesini bozarak, nöronal devreler üzerinde kalıcı etkilere neden olabilir (Lam *et al.* 2006). Bu değişiklikler, erken gelişim dönemindeki davranışsal anormalliklerin altında yatan mekanizmaları oluşturabilir. Ayrıca, önceki çalışmalar, zebra balığı larvalarında gözlenen davranışsal hipoaktivitenin, sinir dokusunda artmış oksidatif stres ve mitokondriyal disfonksiyonla ilişkili olduğunu bildirmiştir; bu etkiler CB1'in aşırı aktivasyonu veya reaktif oksijen türlerinin birikimi sonucu ortaya çıkabilir (Kozal *et al.* 2023). Tüm bu bulgular birlikte ele alındığında, 4F-MDMB-BUTICA'nın neden olduğu davranışsal anormalliklerin, transkripsiyonel düzensizlik, bozulmuş nöral yapılaşma, mitokondriyal disfonksiyon ve oksidatif stresin bir kombinasyonundan kaynaklandığını göstermekte olup, embriyonik beyin gelişimi üzerinde kalıcı etkileri olabilecek karmaşık bir nörotoksik mekanizmaya işaret etmektedir.

Sonuçlar

4F-MDMB-BUTICA'ya kısa süreli maruziyet, zebra balığı embriyolarında belirgin morfolojik ya da gelişimsel anormalliklere yol açmamıştır. Ancak uzun süreli maruziyet, gelişimsel ve moleküler düzeyde geniş bir bozukluk yelpazesıyla sonuçlanmıştır. Bu etkiler arasında vücut uzunluğunda azalma, bradikardi, geç yumurtadan çıkma, artmış mortalite ve hipoaktivite ile bozulmuş sensörimotor yanıtlar gibi davranışsal değişiklikler yer almıştır. Ayrıca, zaman ve doza bağlı toksik etkiyi düşündüren teratojenik deformiteler de

gözlemlenmiştir. Transkriptomik analizler, apoptoz, DNA hasar onarımı, nörotransmisyon ve endokrin sinyalleme ile ilişkili genlerin anlamlı düzeyde düzensizleştiğini ortaya koymuştur. Bu değişiklikler, 4F-MDMB-BUTICA'nın nöral yapılaşma, glial hücre işlevi ve redoks homeostazı gibi süreçlere müdahale edebileceğini göstermektedir. Önemli olarak, gözlemlenen davranışsal fenotipler, genellikle yüksek afiniteyle CB1 reseptörlerine bağlanan diğer sentetik kannabinoidler için bildirilen nörotoksik etki mekanizmasıyla uyumludur. Moleküler bulgular, 4F-MDMB-BUTICA'nın nöral gelişimi transkripsiyonel mekanizmalar aracılığıyla etkileyerek kalıcı nörodavranışsal sonuçlara yol açabileceğini düşündürmektedir. Bulgularımız, zebra balığını yeni ortaya çıkan psikoaktif maddelerin toksikogenomik taramalarında hassas bir model organizma olarak kullanmanın değerini ortaya koymaktadır. Ayrıca burada tespit edilen erken gen ekspresyonu yanıtları, açık morfolojik bozukluklar ortaya çıkmadan önce subletal nörotoksisiteyi öngörmede omik tabanlı yaklaşımların kullanılmasını desteklemektedir. Bu çalışma, 4F-MDMB-BUTICA gibi sentetik kannabinoidlerin gelişimsel nörotoksisite potansiyelini anlamaya yönelik önemli bir ilk adımı temsil etmekte olup, bu bileşiklerin insan sağlığı ve nörogelişimi üzerindeki etkilerini değerlendirmek için uzun vadeli ve türler arası daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu vurgulamaktadır.

KAYNAKLAR

- Abdelgadir, E. H., Al-Qudsi, J., Abu-Nukhaa, E. S., and Alsidrani, D. A., 2024. Subacute Toxicity and Pharmacokinetic Evaluation of the Synthetic Cannabinoid 4F-MDMB-BUTINACA in Rats: A Forensic and Toxicological Perspective. *Future Pharmacology*, 4(4), 676-699.
- Abraham, E., Palevitch, O., Gothilf, Y., and Zohar, Y., 2009. The zebrafish as a model system for forebrain GnRH neuronal development. *General and Comparative Endocrinology*, 164(2-3), 151-160.
- Abuhasira, R., Shbiro, L., Landschaft, Y., 2018. Medical use of cannabis and cannabinoids containing products - Regulations in Europe and North America. *European Journal of Internal Medicine*, 49, 2-6.
- Achenbach, J. C., Hill, J., Hui, J. P., Morash, M. G., Berrue, F., and Ellis, L. D., 2018. Analysis of the uptake, metabolism, and behavioral effects of cannabinoids on zebrafish larvae. *Zebrafish*, 15(4), 349-360.
- Adayev, T., Ranasinghe, B., Banerjee, P., 2005. Transmembrane signaling in the brain by serotonin, a key regulator of physiology and emotion. *Bioscience Reports*, 25(5-6), 363-385.
- Aguilar, S., Gutiérrez, V., Sanchez, L., Nougier, M., 2018. Medicinal cannabis policies and practices around the world. IDPC Brief. Paper. International Drug Policy Consortium.
- Ahmed, K. T., Amin, M. R., Shah, P., Ali, D. W., 2018. Motor neuron development in zebrafish is altered by brief (5-hr) exposures to THC (Δ 9-tetrahydrocannabinol) or CBD (cannabidiol) during gastrulation. *Scientific Reports*, 8(1), 10518.
- Akhtar, M. T., Ali, S., Rashidi, H., van der Kooy, F., Verpoorte, R., and Richardson, M. K., 2013. Developmental effects of cannabinoids on zebrafish larvae. *Zebrafish*, 10(3), 283-293.
- Akhtar, M. T., Mushtaq, M. Y., Verpoorte, R., Richardson, M. K., Choi, Y. H., 2016. Metabolic effects of cannabinoids in zebrafish (*Danio rerio*) embryos determined by ¹H NMR metabolomics. *Metabolomics*, 12(3), 44.
- Alves, V. L., Gonçalves, J. L., Aguiar, J., Teixeira, H. M., Câmara, J. S., 2020. The synthetic cannabinoids phenomenon: from structure to toxicological properties. A review. *Critical Reviews in Toxicology*, 50(5), 359-382.
- Alzu'bi, A., Almahasneh, F., Khasawneh, R., Abu-El-Rub, E., Baker, W. B., Al-Zoubi, R. M., 2024. The synthetic cannabinoids menace: a review of health risks and toxicity. *European Journal of Medical Research*, 29(1), 49.
- Amin, M. R., Ahmed, K. T., Ali, D. W., 2022. Cannabinoid receptor 2 (Cb2r) mediates cannabinol (CBN) induced developmental defects in zebrafish. *Scientific reports*, 12(1), 20251.
- Ampomah, P. B., Lim, L. H. K., 2020. Influenza A virus-induced apoptosis and virus propagation. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, 25(1-2), 1-11.

- An, D., Peigneur, S., Hendrickx, L. A., Tytgat, J., 2020. Targeting Cannabinoid Receptors: Current Status and Prospects of Natural Products. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 5064.
- Andrews, R., Jorge, R., Christie, R., Gallegos, A., 2023. From JWH-018 to OXIZIDS: Structural evolution of synthetic cannabinoids in the European Union from 2008 to present day. *Drug Testing and Analysis*, 15(4), 378–387.
- Antonsson B., 2004. Mitochondria and the Bcl-2 family proteins in apoptosis signaling pathways. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 256-257(1-2), 141–155.
- Apaydin, D. C., Zakarauskas-Seth, B. I., Carnevale, L., Apaydin, O., Perrotta, M., Carnevale, R., Kotini, M. P., Kotlar-Goldaper, I., Belting, H. G., Carnevale, D., Filosa, A., Sawamiphak, S., 2023. Interferon- γ Drives Macrophage Reprogramming, Cerebrovascular Remodelling, and Cognitive Dysfunction in a Zebrafish and a Mouse Model of ion Imbalance and Pressure Overload. *Cardiovascular Research*, 119, (5), 1234–1249.
- Ares-Santos, S., Granado, N., Moratalla, R., 2013. The role of dopamine receptors in the neurotoxicity of methamphetamine. *Journal of Internal Medicine*, 273(5), 437-453.
- Arnold J. C., 2021. A primer on medicinal cannabis safety and potential adverse effects. *Australian Journal of General Practice*, 50(6), 345–350.
- Ateş-kalkan, P. S., Ayık, T., Üstündağ, Ü. V., Alturfan, E. E., 2021. Differential effects of bisphenol a and di (2-Ethylhexyl) phthalate exposure on crestin and the expression of some genes related to apoptosis and inflammation in zebrafish embryos. *European Journal of Biology*, 80 (1), 42–47.
- Audira, G., Siregar, P., Chen, J. R., Lai, Y. H., Huang, J. C., Hsiao, C. D., 2020. Systematical exploration of the common solvent toxicity at whole organism level by behavioral phenomics in adult zebrafish. *Environmental Pollution*, 266, 115239.
- Ayano, G., 2016. Dopamine: Receptors, functions, synthesis, pathways, locations and mental disorders: Review of literatures. *Journal of Mental Disorders and Treatment*, 2 (1), Article 120.
- Bailey, J., Oliveri, A., Levin, E. D., 2013. Zebrafish model systems for developmental neurobehavioral toxicology. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews*, 99 (1), 14–23.
- Balik-Meisner, M., Truong, L., Scholl, E. H., Tanguay, R. L., Reif, D. M., 2018. Population genetic diversity in zebrafish lines. *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society*, 29 (1-2), 90–100.
- Bambino, K., Chu, J., 2017. Zebrafish in toxicology and environmental health. *Current Topics in Developmental Biology*, 124, 331–367.
- Barnes, M. P., 2006. Sativex: clinical efficacy and tolerability in the treatment of symptoms of multiple sclerosis and neuropathic pain. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 7 (5), 607–615.
- Barrie, N., Kuruppu, V., Manolios, E., Ali, M., Moghaddam, M., Manolios, N., 2017. Endocannabinoids in arthritis: current views and perspective. *International Journal of Rheumatic Diseases*, 20(7), 789–797.
- Basnet, R. M., Zizioli, D., Taweedet, S., Finazzi, D., Memo, M., 2019. Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology. *Biomedicines*, 7 (1), 23.
- Behl, T., Makkar, R., Sehgal, A., Singh, S., Makeen, H. A., Albratty, M., Alhazmi, H. A., Meraya, A. M., Bungau, S., 2022. Exploration of multiverse activities of

- endocannabinoids in biological systems. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (10), 5734.
- Berger, M., Gray, J. A., Roth, B. L., 2009. The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine*, 60, 355–366.
- Berghmans, S., Murphey, R. D., Wienholds, E., Neuberg, D., Kutok, J. L., Fletcher, C. D., Morris, J. P., Liu, T. X., Schulte-Merker, S., Kanki, J. P., Plasterk, R., Zon, L. I., Look, A. T., 2005. tp53 mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (2), 407–412.
- Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C. M., Garewal, H., 2002. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutation Research*, 511 (2), 145–178.
- Besse, A., Wu, P., Bruni, F., Donti, T., Graham, B. H., Craigen, W. J., McFarland, R., Moretti, P., Lalani, S., Scott, K. L., Taylor, R. W., Bonnen, P. E., 2015. The GABA transaminase, ABAT, is essential for mitochondrial nucleoside metabolism. *Cell Metabolism*, 21 (3), 417–427.
- Bian, Y., Wang, X., Liang, J. H., Li, L., Wu, X., Tang, B., Leung, G. P., Lee, S. M., 2022. The development of behavioral sensitization induced by a single morphine exposure in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 113, 110456.
- Bissig, K. D., Han, W., Barzi, M., Kovalchuk, N., Ding, L., Fan, X., Pankowicz, F. P., Zhang, Q. Y., Ding, X., 2018. P450-humanized and human liver chimeric mouse models for studying xenobiotic metabolism and toxicity. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 46 (11), 1734–1744.
- Blebea, N. M., Pricopie, A. I., Vlad, R. A., Hancu, G., 2024. Phytocannabinoids: Exploring pharmacological profiles and their impact on therapeutical use. *International Journal of Molecular Sciences*, 25 (8), 4204.
- Blessing, E. M., Steenkamp, M. M., Manzanares, J., Marmar, C. R., 2015. Cannabidiol as a potential treatment for anxiety disorders. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*, 12 (4), 825–836.
- Bloomfield, M. A., Ashok, A. H., Volkow, N. D., Howes, O. D., 2016. The effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol on the dopamine system. *Nature*, 539 (7629), 369–377.
- Boehmler, W., Obrecht-Pflumio, S., Canfield, V., Thisse, C., Thisse, B., Levenson, R., 2004. Evolution and expression of D2 and D3 dopamine receptor genes in zebrafish. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 230 (3), 481–493.
- Bonilla, B., Hengel, S. R., Grundy, M. K., Bernstein, K. A., 2020. RAD51 gene family structure and function. *Annual Review of Genetics*, 54, 25–46.
- Bonini, S. A., Premoli, M., Tambaro, S., Kumar, A., Maccarinelli, G., Memo, M., Mastinu, A., 2018. Cannabis sativa: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. *Journal of Ethnopharmacology*, 227, 300–315.
- Braga, J. D., Thongngam, M., Kumrungsee, T., 2024. Gamma-aminobutyric acid as a potential postbiotic mediator in the gut-brain axis. *NPJ Science of Food*, 8 (1), 16.
- Brailoiu, G. C., Oprea, T. I., Zhao, P., Abood, M. E., Brailoiu, E., 2011. Intracellular cannabinoid type 1 (CB1) receptors are activated by anandamide. *The Journal of Biological Chemistry*, 286 (33), 29166–29174.

- Bredesen, D. E., 1995. Neural apoptosis. *Annals of Neurology*, 38 (6), 839–851.
- Brents, L. K., Prather, P. L., 2014. The K2/spice phenomenon: Emergence, identification, legislation and metabolic characterization of synthetic cannabinoids in herbal incense products. *Drug Metabolism Reviews*, 46 (1), 72–85.
- Brown, D. R., Samsa, L. A., Qian, L., Liu, J., 2016. Advances in the study of heart development and disease using zebrafish. *Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 3 (2), 13.
- Bruce de Souza, L. V. X., Oliveira, L. N., Costa, B. P. D., Lima-Maximino, M., Veloso, V., Maximino, C., 2025. Roles of the 5-HT1A receptor in zebrafish responses to potential threat and in sociality. *Journal of Psychopharmacology*, 0 (0).
- Buddhala, C., Hsu, C. C., Wu, J. Y., 2009. A novel mechanism for GABA synthesis and packaging into synaptic vesicles. *Neurochemistry International*, 55 (1-3), 9–12.
- Burt, D. R., 2003. Reducing GABA receptors. *Life Sciences*, 73 (14), 1741–1758.
- Burton, E. A., and Burgess, H. A. (2023). A Critical Review of Zebrafish Neurological Disease Models–2. Application: Functional and Neuroanatomical Phenotyping Strategies and Chemical Screens. *Oxford Open Neuroscience*, 2. <https://doi.org/10.1093/oons/kvac019>.
- Busquets Garcia, A., Soria-Gomez, E., Bellocchio, L., Marsicano, G., 2016. Cannabinoid receptor type-1: Breaking the dogmas. *F1000Research*, 5, F1000 Faculty Rev-990.
- Buznikov, G. A., Nikitina, L. A., Voronezhskaya, E. E., Bezuglov, V. V., Willows, A. O. D., Nezlin, L. P., 2003. Localization of serotonin and its possible role in early embryos of *Tritonia diomedea* (Mollusca: Nudibranchia). *Cell and Tissue Research*, 311 (2), 259–266.
- Cadena, M. R. S., Cadena, P. G., Watson, M. R., Sarmah, S., Boehm Jr., S. L., Marrs, J. A., 2021. Zebrafish (*Danio rerio*) larvae show behavioral and embryonic development defects when exposed to opioids at embryo stage. *Neurotoxicology and Teratology*, 85, 106964.
- Carty, D. R., Miller, Z. S., Thornton, C., Pandelides, Z., Kutchma, M. L., Willett, K. L., 2019. Multigenerational consequences of early-life cannabinoid exposure in zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 364, 133–143.
- Carty, D. R., Thornton, C., Gledhill, J. H., Willett, K. L., 2018. Developmental effects of cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in zebrafish. *Toxicological Sciences*, 162 (1), 137–145.
- Cassar, S., Adatto, I., Freeman, J. L., Gamse, J. T., Iturria, I., Lawrence, C., Muriana, A., Peterson, R. T., Van Cruchten, S., Zon, L. I., 2020, Use of zebrafish in drug discovery toxicology. *Chemical Research In Toxicology*, 33(1), 95–118.
- Castaneto, M. S., Gorelick, D. A., Desrosiers, N. A., Hartman, R. L., Pirard, S., Huestis, M. A., 2014. Synthetic cannabinoids: Epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. *Drug and Alcohol Dependence*, 144, 12–41.
- Caulkins, J. P., Kilborn, M. L., 2019. Cannabis legalization, regulation, & control: A review of key challenges for local, state, and provincial officials. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, 45 (6), 689–697.
- Cayman Chemical, 2025. 4F-MDMB-BUTICA (Product No. 31075). Erişim: <https://www.caymanchem.com/product/31075>

- Celofiga, A., Koprivsek, J., Klavz, J., 2014. Use of synthetic cannabinoids in patients with psychotic disorders: Case series. *Journal of Dual Diagnosis*, 10 (3), 168–173.
- Center for Forensic Science Research and Education (CFSRE), 2020. 4F-MDMB-BICA monograph. NMS Labs. Erişim: https://www.cfsre.org/images/monographs/4F-MDMB-BICA_070120_NMSLabs_Report.pdf
- Center for Forensic Science Research and Education (CFSRE), 2021. Quarterly trend reports for synthetic cannabinoids [Online]. Trend reports available at: <https://www.npsdiscovery.org/reports/trendreports/>. [Accessed July 26, 2021].
- Ceylan, Z., Şişman, T., Yazıcı, Z., Altıkat, A. Ö., 2016. Embryotoxicity of nitrophenols to the early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Industrial Health*, 32 (8), 1414–1422.
- Chakraborty, C., Hsu, C. H., Wen, Z. H., Lin, C. S., Agoramoorthy, G., 2009. Zebrafish: A complete animal model for in vivo drug discovery and development. *Current Drug Metabolism*, 10 (2), 116–124.
- Chakraborty, C., Sharma, A. R., Sharma, G., Lee, S. S., 2016. Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. *Journal of Nanobiotechnology*, 14 (1), 65.
- Chatzimitakos, T., Chousidis, I., Leonardos, D., Stalikas, C., Leonardos, I., 2022. In the swim of cannabis: Developmental toxicity and metabolomic pathway alterations of zebrafish impact. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27 (17), 5506.
- Chen, D. J., Gao, M., Gao, F. F., Su, Q. X., Wu, J., 2017. Brain cannabinoid receptor 2: Expression, function and modulation. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38 (3), 312–316.
- Chen, N. H., Reith, M. E., Quick, M. W., 2004. Synaptic uptake and beyond: The sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflügers Archiv/European Journal of Physiology*, 447 (5), 519–531.
- Chousidis, I., Chatzimitakos, T., Leonardos, D., Filiou, M. D., Stalikas, C. D., Leonardos, I. D., 2020. Cannabinol in the spotlight: Toxicometabolomic study and behavioral analysis of zebrafish embryos exposed to the unknown cannabinoid. *Chemosphere*, 252, 126417.
- Cohen, K., Weinstein, A. M., 2018. Synthetic and non-synthetic cannabinoid drugs and their adverse effects-a review from public health prospective. *Frontiers in Public Health*, 6, 1-8.
- Cohen, K., Weizman, A., Weinstein, A., 2019. Positive and negative effects of cannabis and cannabinoids on health. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 105(5), 1139-1147.
- Connors, K. A., Valenti, T. W., Lawless, K., Sackerman, J., Onaivi, E. S., Brooks, B. W., Gould, G. G., 2014. Similar anxiolytic effects of agonists targeting serotonin 5-HT1A or cannabinoid CB receptors on zebrafish behavior in novel environments. *Aquatic Toxicology*, 151, 105-113.
- Cooman, T., Bergeron, S. A., Coltogirone, R., Horstick, E., Arroyo, L., 2022. Evaluation of fentanyl toxicity and metabolism using a zebrafish model. *Journal of Applied Toxicology : JAT*, 42(4), 706–714.
- Crippa, J. A., Guimarães, F. S., Campos, A. C., Zuardi, A. W., 2018. Translational Investigation of the Therapeutic Potential of Cannabidiol (CBD): Toward a New Age. *Frontiers in Immunology*, 9, 2009.
- Cristino, L., Bisogno, T., Di Marzo, V., 2020. Cannabinoids and the expanded endocannabinoid system in neurological disorders. *Nature Reviews. Neurology*, 16(1), 9–29.

- Crocq M. A., 2020. History of cannabis and the endocannabinoid system. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 22(3), 223–228.
- D'Arcy M. S., 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592.
- Dahlen, A., Zarei, M., Melgoza, A., Wagle, M., Guo, S., 2021. THC-induced behavioral stereotypy in zebrafish as a model of psychosis-like behavior. *Scientific Reports*, 11(1), 15693.
- Dariš, B., Tancer Verboten, M., Knez, Ž., Ferk, P., 2019. Cannabinoids in cancer treatment: therapeutic potential and legislation. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 19(1), 14–23.
- De Luca, M. A., Fattore, L., 2018. Therapeutic use of synthetic cannabinoids: still an open issue?. *Clinical Therapeutics*, 40(9), 1457–1466.
- De Oliveira, M. C., Vides, M. C., Lassi, D. L. S., Torales, J., Ventriglio, A., Bombana, H. S., Leyton, V., Périco, C. A., Negrão, A. B., Malbergier, A., Castaldelli-Maia, J. M., 2023. Toxicity of synthetic cannabinoids in K2/spice: a systematic review. *Brain Sciences*, 13(7), 990.
- Debatin, K. M., 2004. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 53(3), 153–159.
- Debruyne, D., Le Boisselier, R., 2015. Emerging drugs of abuse: current perspectives on synthetic cannabinoids. *Substance Abuse and Rehabilitation*, 6, 113–129.
- Demin, K. A., Meshalkina, D. A., Kysil, E. V., Antonova, K. A., Volgin, A. D., Yakovlev, O. A., Alekseeva, P. A., Firuleva, M. M., Lakstygal, A. M., de Abreu, M. S., Barcellos, L. J. G., Bao, W., Friend, A. J., Amstislavskaya, T. G., Rosemberg, D. B., Musienko, P. E., Song, C., Kalueff, A. V., 2018. Zebrafish models relevant to studying central opioid and endocannabinoid systems. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 86, 301–312.
- Deo, R. C., MacRae, C. A., 2011. The zebrafish: scalable in vivo modeling for systems biology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 3(3), 335–346.
- Deore, A., Dhumane, J., Wagh, R., Sonawane, R., 2019. The stages of drug discovery and development process. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 7(6), 62–67.
- Dexheimer, T., 2013. DNA repair pathways and mechanisms. In: Mathews, L., Cabarcas, S., Hurt, E. (eds) *DNA Repair of Cancer Stem Cells*. Springer, Dordrecht.
- Di Marzo, V., Piscitelli, F., 2015. The endocannabinoid system and its modulation by phytocannabinoids. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*, 12(4), 692–698.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. *Endocrine Reviews*, 30(4), 293–342.
- Dubois, E. A., Zandbergen, M. A., Peute, J., Goos, H. J., 2002. Evolutionary development of three gonadotropin-releasing hormone (GnRH) systems in vertebrates. *Brain Research Bulletin*, 57(3–4), 413–418.
- Dykukha, I., Essner, U., Schreiber, H., Raithel, L. M., Penner, I. K., 2022. Effects of Sativex® on cognitive function in patients with multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 68, 104173.

- El-Merahbi, R., Löffler, M., Mayer, A., Sumara, G., 2015. The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis. *FEBS Letters*, 589(15), 1728–1734.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516.
- EMCDDA and EUROPOL. 2020. EMCDDA Technical Report on the new Psychoactive Substance Methyl 2-([1-(4-Fluorobutyl)-1H-Indole-3-Carbonyl]Amino)-3,3-Dimethylbutanoate (4F-MDMB-BICA). Lisbon: EMCDDA. https://www.euda.europa.eu/publications/initial-reports/4f-mdmb-bica_bg.
- Ensembl, 2025. Ensembl genome browser: *Danio rerio*. Erişim tarihi: 29 Mayıs 2025 https://www.ensembl.org/Danio_rerio
- Enz, R., 2001. GABA(C) receptors: a molecular view. *Biological Chemistry*, 382(8), 1111–1122.
- Ergül, D. F., Ekemen, S., Yelken, B. B., 2015. Synthetic cannabinoid 'Bonzai' intoxication: six case series. *Turkish Journal of Anaesthesiology and Reanimation*, 43(5), 347–351.
- European Union Drugs Agency (EUDA), 2017. Synthetic cannabinoids in Europe (perspectives on drugs). https://www.euda.europa.eu/publications/pods/synthetic-cannabinoids_en (Accessed Feb, 2025)
- European Union Drugs Agency (EUDA), 2020. EMCDDA initial report on the new psychoactive substance methyl 2-([1-(4-fluorobutyl)-1H-indol-3-yl]carbonyl)amino)-3,3-dimethylbutanoate (4F-MDMB-BICA), initial reports. Luxembourg: Publications Office of the European Union. https://www.euda.europa.eu/publications/initial-reports/4f-mdmbbica_bg
- Evan, G. I., Brown, L., Whyte, M., Harrington, E., 1995. Apoptosis and the cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(6), 825–834.
- Fanis, P., Neocleous, V., Papapetrou, I., Phylactou, L. A., Skordis, N., 2023. Gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR) and hypogonadotropic hypogonadism. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21), 15965.
- Fattore, L., and Fratta, W., 2011. Beyond THC: the new generation of cannabinoid designer drugs. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 60.
- Feng, K., Cui, X., Song, Y., 2020. Gnrh3 regulates PGC proliferation and sex differentiation in developing zebrafish. *Endocrinology*, 161(1), bqz024.
- Filipiuc, L. E., Ababei, D. C., Alexa-Stratulat, T., Pricope, C. V., Bild, V., Stefanescu, R., Stanciu, G. D., and Tamba, B. I. (2021). Major phytocannabinoids and their related compounds: Should we only search for drugs that act on cannabinoid receptors? *Pharmaceutics*, 13(11).
- Finley, S. J., Javan, G. T., Green, R. L., 2022. Bridging disciplines: applications of forensic science and industrial hemp. *Frontiers in Microbiology*, 13, 760374.
- Fontes, M. A. P., Vaz, G. C., Cardoso, T. Z. D., de Oliveira, M. F., Campagnole-Santos, M. J., Dos Santos, R. A. S., Sharma, N. M., Kaushik, P. P., Frézard, F., 2018. GABA-containing liposomes: neuroscience applications and translational perspectives for targeting neurological diseases. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14(3), 781–788.
- Fraguas-Sánchez, A. I., Torres-Suárez, A. I., 2018. Medical use of cannabinoids. *Drugs*, 78(16), 1665–1703.

- Freeman, J. L., Adeniyi, A., Banerjee, R., Dallaire, S., Maguire, S. F., Chi, J., Ng, B. L., Zepeda, C., Scott, C. E., Humphray, S., Rogers, J., Zhou, Y., Zon, L. I., Carter, N. P., Yang, F., Lee, C., 2007. Definition of the zebrafish genome using flow cytometry and cytogenetic mapping. *BMC Genomics*, 8, 195.
- Friedman, D., Sirven, J. I., 2017. Historical perspective on the medical use of cannabis for epilepsy: ancient times to the 1980s. *Epilepsy & Behavior: E&B*, 70(Pt B), 298–301.
- Gilbert, M. T., Sulik, K. K., Fish, E. W., Baker, L. K., Dehart, D. B., Parnell, S. E., 2016. Dose-dependent teratogenicity of the synthetic cannabinoid CP-55,940 in mice. *Neurotoxicology and Teratology*, 58, 15–22.
- Gilbert, S. B., Roof, A. K., Rajendra Kumar, T., 2018. Mouse models for the analysis of gonadotropin secretion and action. *Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism*, 32(3), 219–239.
- Goldsmith, J. R., Jobin, C., 2012. Think small: zebrafish as a model system of human pathology. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012, 817341.
- Goldsmith, P., Harris, W. A., 2003. The zebrafish as a tool for understanding the biology of visual disorders. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 14(1), 11–18.
- Gore, A. V., Pillay, L. M., Venero Galanternik, M., Weinstein, B. M., 2018. The zebrafish: a fintastic model for hematopoietic development and disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 7(3), e312.
- Grotenhermen, F., 2003. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clinical Pharmacokinetics*, 42(4), 327–360.
- Guo, X., Zhang, R., Jin, Q., Cao, N., Shi, J., Zong, X., Chen, X., Wang, C., Li, X., Pang, S., Li, L., 2023. The kisspeptin-GnIH signaling pathway in the role of zebrafish courtship and aggressive behavior induced by azoxystrobin. *Environmental Pollution*, 325, 121461.
- Gurney, S. M. R., Scott, K. S., Kacinko, S. L., Presley, B. C., Logan, B. K., 2014. Pharmacology, toxicology, and adverse effects of synthetic cannabinoid drugs. *Forensic Sci Rev*, 26(1), 53–78.
- Gustafsson, S. B., Jacobsson, S. O., 2019. Effects of cannabinoids on the development of chick embryos in ovo. *Scientific Reports*, 9(1), 13486.
- Guzman, L., Besa, G., Linares, D., González, L., Pont, C., Bartolini, M., Haigis, A. C., Legradi, J., Muñoz-Torrero, D., Gómez-Catalán, J., Barenys, M., 2020. Evaluation of the effects of acetylcholinesterase inhibitors in the zebrafish touch-evoked response: quantitative vs. qualitative assessment. *Environmental Sciences Europe*, 32(1), 145.
- Haber, J. E., 2018. DNA repair: the search for homology. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 40(5), e1700229.
- Hammond-Weinberger, D. R., ZeRuth, G. T., 2020. Whole mount immunohistochemistry in zebrafish embryos and larvae. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 155, 10.3791/60575.
- Hasumi, A., Maeda, H., Yoshida, K. I., 2020. Analyzing cannabinoid-induced abnormal behavior in a zebrafish model. *PLoS One*, 15(10), e0236606.
- Hilderbrand, R. L., 2018. Hemp & cannabidiol: what is a medicine?. *Missouri Medicine*, 115(4), 306–309.
- Hill, K. P., Palastro, M. D., Gruber, S. A., Fitzmaurice, G. M., Greenfield, S. F., Lukas, S. E., Weiss, R. D., 2017. Nabilone pharmacotherapy for cannabis dependence: a randomized, controlled pilot study. *The American Journal on Addictions*, 26(8), 795–801.

- Holzschuh, J., Ryu, S., Aberger, F., Driever, W., 2001. Dopamine transporter expression distinguishes dopaminergic neurons from other catecholaminergic neurons in the developing zebrafish embryo. *Mechanisms of Development*, 101(1–2), 237–243.
- Horzmann, K. A., Freeman, J. L., 2018. Making waves: new developments in toxicology with the zebrafish. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 163(1), 5–12.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503.
- Hoyberghs, J., Bars, C., Ayuso, M., Van Ginneken, C., Foubert, K., Van Cruchten, S., 2021. DMSO concentrations up to 1% are safe to be used in the zebrafish embryo developmental toxicity assay. *Frontiers in Toxicology*, 3, 804033.
- Hudson, S., Ramsey, J., 2011. The emergence and analysis of synthetic cannabinoids. *Drug Testing and Analysis*, 3(7–8), 466–478.
- Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B., Philpott, K. L., 2011. Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 162(6), 1239–1249.
- Iwasa, T., Matsuzaki, T., Yano, K., Mayila, Y., Irahara, M., 2018. The roles of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in stress-induced reproductive disorders. *Endocrine Journal*, 65(2), 133–140.
- İbiloğlu, A. O., Atlı, A., Güneş, M., 2017. Sentetik kannabinoidler. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*, 9(3), 317–328.
- Jaber, M., Robinson, S. W., Missale, C., Caron, M. G., 1996. Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology*, 35(11), 1503–1519.
- Jan, R., Chaudhry, G. E., 2019. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 9(2), 205–218.
- Jensen, H. M., Korbut, R., Kania, P. W., Buchmann, K., 2018. Cannabidiol effects on behaviour and immune gene expression in zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One*, 13(7), e0200016.
- Johnson, J. K., Colby, A., 2023. History of cannabis regulation and medicinal therapeutics: it's complicated. *Clinical Therapeutics*, 45(6), 521–526.
- Johnston, G. A., Chebib, M., Hanrahan, J. R., Mewett, K. N., 2003. GABA(C) receptors as drug targets. *Current Drug Targets: CNS and Neurological Disorders*, 2(4), 260–268.
- Jones, É., Vlachou, S., 2020. A critical review of the role of the cannabinoid compounds Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) and cannabidiol (CBD) and their combination in multiple sclerosis treatment. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(21), 4930.
- Jones, T. C., 2001. Call for a new approach to the process of clinical trials and drug registration. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 322(7291), 920–923.
- Kalueff, A. V., Echevarria, D. J., Homechaudhuri, S., Stewart, A. M., Collier, A. D., Kaluyeva, A. A., Li, S., Liu, Y., Chen, P., Wang, J. J., Yang, L., Mitra, A., Pal, S., Chaudhuri, A., Roy, A., Biswas, M., Roy, D., Podder, A., Poudel, M. K., ... Song, C. (2016). Zebrafish neurobehavioral phenomics for aquatic neuropharmacology and toxicology research. *Aquatic Toxicology*, 170. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.08.007>
- Kalueff, A. V., Gebhardt, M., Stewart, A. M., Cachat, J. M., Brimmer, M., Chawla, J. S., Craddock, C., Kyzar, E. J., Roth, A., Landsman, S., Gaikwad, S., Robinson, K., Baatrup, E., Tierney, K., Shamchuk, A., Norton, W., Miller, N., Nicolson, T., Braubach, O.,

- Gilman, C. P., Pittman, J., Rosemberg, D. B., Gerlai, R., Echevarria, D., Lamb, E., Neuhauss, S. C. F., Weng, W., Bally-Cuif, L., Schneider, H., and the Zebrafish Neuroscience Research Consortium, H., 2013. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, 10(1), 70–86.
- Kawai, M., Rosen, C. J., 2010. Minireview: A skeleton in serotonin's closet?. *Endocrinology*, 151(9), 4103–4108.
- Kema, I. P., de Vries, E. G., Muskiet, F. A., 2000. Clinical chemistry of serotonin and metabolites. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 747(1-2), 33–48.
- Kendall, D. A., Yudowski, G. A., 2017. Cannabinoid receptors in the central nervous system: their signaling and roles in disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, 294.
- Khalili, A., Rezai, P., 2019. Microfluidic devices for embryonic and larval zebrafish studies. *Briefings in Functional Genomics*, 18(6), 419–432.
- Kihara A. H., 2024. GABA signaling in health and disease in the nervous system. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(20), 11193.
- King, K. L., Cidlowski, J. A., 1995. Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *Journal of Cellular Biochemistry*, 58(2), 175–180.
- Klee, E. W., Schneider, H., Clark, K. J., Cousin, M. A., Ebbert, J. O., Hooten, W. M., Karpyak, V. M., Warner, D. O., Ekker, S. C., 2012. Zebrafish: a model for the study of addiction genetics. *Human Genetics*, 131(6), 977–1008.
- Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., Correa, R. G., 2019. Dopamine: functions, signaling, and association with neurological diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 39(1), 31–59.
- Kossack, M. E., Draper, B. W., 2019. Genetic regulation of sex determination and maintenance in zebrafish (*Danio rerio*). *Current Topics in Developmental Biology*, 134, 119–149.
- Kozal, J. S., Jayasundara, N., Massarsky, A., Lindberg, C. D., Oliveri, A. N., Cooper, E. M., Levin, E. D., Meyer, J. N., and Giulio, R. T. D. (2023). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress contribute to cross-generational toxicity of benzo(a)pyrene in *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*, 263. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106658>
- Körmöczi, T., Sija, É., Institóris, L., Kereszty, É. M., Ilisz, I., Berkecz, R., 2021. Analytical methodologies for the characterization and analysis of the parent compound and phase 1 metabolites of 4f-mdmb-bica in human microsome, urine, and blood samples. *Journal of Analytical Toxicology*, 46(2), 135–145.
- Krueger, C., Stöcker, W., Schlosser, M., 2007. Glutamic acid decarboxylase autoantibodies. *Autoantibodies* 369-378. <https://doi.org/10.1016/B978-044452763-9/50052-4>
- Krug, R. G., 2nd, Clark, K. J., 2015. Elucidating cannabinoid biology in zebrafish (*Danio rerio*). *Gene*, 570(2),
- Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Borah, R., Sharma, B., Pandhi, S., Tripathi, V., Yadav, H. S., Devi, S., Patil, U., Xiao, J., Mishra, A. K., 2021. Pharmacological properties, therapeutic potential, and legal status of *Cannabis sativa* L.: An overview. *Phytotherapy research : PTR*, 35(11), 6010–6029.
- Kuo, M. W., Lou, S. W., Postlethwait, J., Chung, B. C., 2005. Chromosomal organization, evolutionary relationship, and expression of zebrafish GnRH family members. *Journal of Biomedical Science*, 12(4), 629-639.

- Laaboudi, F. Z., Rejdali, M., Amhamdi, H., Salhi, A., Elyoussfi, A., Ahari, M., 2024. In the weeds: A comprehensive review of cannabis; its chemical complexity, biosynthesis, and healing abilities. *Toxicology Reports*, 13, 101685.
- Lachowicz, J., Szopa, A., Ignatiuk, K., Świąder, K., Serefko, A., 2023. Zebrafish as an Animal Model in Cannabinoid Research. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10455.
- Lafzi, A., Demirci, T., Yüce, N., Annaç, E., Çiçek, M., Şişman, T., 2024. A study on the possible neurotoxic effects of CUMYL-4CN-BINACA in Sprague Dawley rats. *Legal Medicine (Tokyo, Japan)*, 67, 102389.
- Lai, K. P., Gong, Z., Tse, W. K. F., 2021. Zebrafish as the toxicant screening model: Transgenic and omics approaches. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 234, 105813.
- Lam, C. S., Rastegar, S., and Strähle, U. (2006). Distribution of cannabinoid receptor 1 in the CNS of zebrafish. *Neuroscience*, 138(1).
- Lam, D. D., Garfield, A. S., Marston, O. J., Shaw, J., Heisler, L. K., 2010. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 97(1), 84–91.
- Lanfume, L., Hamon, M., 2004. 5-HT₁ receptors. *Current drug targets. CNS and Neurological Disorders*, 3(1), 1–10.
- Le Boisselier, R., Alexandre, J., Lelong-Boulouard, V., Debruyne, D., 2017. Focus on cannabinoids and synthetic cannabinoids. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 101(2), 220–229.
- Lee, C. J., Paull, G. C., Tyler, C. R., 2022. Improving zebrafish laboratory welfare and scientific research through understanding their natural history. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 97(3), 1038–1056.
- Lee, S. H., Kang, J. W., Lin, T., Lee, J. E., Jin, D. I., 2013. Teratogenic potential of antiepileptic drugs in the zebrafish model. *Biomed Research International*, 2013(1), 726478.
- Legare, C. A., Raup-Konsavage, W. M., Vrana, K. E., 2022. Therapeutic potential of cannabis, cannabidiol, and cannabinoid-based pharmaceuticals. *Pharmacology*, 107(3-4), 131–149.
- Leinen, Z. J., Mohan, R., Premadasa, L. S., Acharya, A., Mohan, M., Byrareddy, S. N., 2023. Therapeutic potential of cannabis: A comprehensive review of current and future applications. *Biomedicines*, 11(10), 2630.
- Leyton, V., Périgo, C. A., Negrão, A. B., Malbergier, A., Castaldelli-Maia, J. M., 2023. Toxicity of synthetic cannabinoids in k2/spice: a systematic review. *Brain Sciences*, 13(7), 990.
- Li, P., Shah, S., Huang, L., Carr, A. L., Gao, Y., Thisse, C., Thisse, B., Li, L., 2007. Cloning and spatial and temporal expression of the zebrafish dopamine D1 receptor. *Developmental dynamics : An Official Publication of The American Association of Anatomists*, 236(5), 1339–1346.
- Li, Y., Wang, X., Meng, Y., Hu, T., Zhao, J., Li, R., Bai, Q., Yuan, P., Han, J., Hao, K., Wei, Y., Qiu, Y., Li, N., Zhao, Y., 2024. Dopamine reuptake and inhibitory mechanisms in human dopamine transporter. *Nature*, 632(8025), 686–694.
- Licitra, R., Marchese, M., Naef, V., Ogi, A., Martinelli, M., Kiferle, C., Fronte, B., Santorelli, F. M., 2022. A review on the bioactivity of cannabinoids on zebrafish models: emphasis on neurodevelopment. *Biomedicines*, 10(8), 1820.

- Licitra, R., Martinelli, M., Petrocchi Jasinski, L., Marchese, M., Kiferle, C., Fronte, B., 2021. In vivo evaluation of cannabis sativa full extract on zebrafish larvae development, locomotion behavior and gene expression. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(12), 1224.
- Lieschke, G. J., Currie, P. D., 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, 8(5), 353-367.
- Liu, J., and Stainier, D. Y., 2012. Zebrafish in the study of early cardiac development. *Circulation Research*, 110(6), 870-874.
- Liu, L., Wu, F. Y., Zhu, C. Y., Zou, H. Y., Kong, R. Q., Ma, Y. K., Su, D., Song, G., Zhang, Y., Liu, K. C., 2021. Involvement of dopamine signaling pathway in neurodevelopmental toxicity induced by isoniazid in zebrafish. *Chemosphere*, 265, 129109.
- Liu, N., Sun, S., Wang, P., Sun, Y., Hu, Q., Wang, X., 2021. The mechanism of secretion and metabolism of gut-derived 5-hydroxytryptamine. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 7931.
- Logan, B. K., Mohr, A. L. A., Friscia, M., Krotulski, A. J., Papsun, D. M., Kacinko, S. L., Roper-Miller, J. D., Huestis, M. A., 2017. Reports of adverse events associated with use of novel psychoactive substances, 2013-2016: A Review *Journal of Analytical Toxicology*, 41(7), 573-610.
- López-Muñoz, A., Sepulcre, M. P., Roca, F. J., Figueras, A., Meseguer, J., Mulero, V., 2011. Evolutionary conserved pro-inflammatory and antigen presentation functions of zebrafish IFN γ revealed by transcriptomic and functional analysis. *Molecular Immunology*, 48(9-10), 1073-1083.
- López-Olmeda, J. F., Sánchez-Vázquez, F. J., 2011. Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Thermal Biology*, 36(2), 91-104.
- Lucas, C. J., Galettis, P., Schneider, J., 2018. The pharmacokinetics and the pharmacodynamics of cannabinoids. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 84(11), 2477-2482.
- Lujan, R., Ciruela, F., 2012. GABAB receptors-associated proteins: potential drug targets in neurological disorders?. *Current Drug Targets*, 13(1), 129-144.
- Mackie K., 2008. Cannabinoid receptors: where they are and what they do. *Journal of Neuroendocrinology*, 20 Suppl 1, 10-14.
- MacRae, C. A., Peterson, R. T., 2015. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 14(10), 721-731.
- Mangal, N., Erridge, S., Habib, N., Sadanandam, A., Reebye, V., Sodergren, M. H., 2021. Cannabinoids in the landscape of cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 147(9), 2507-2534.
- Mao, Y., Jiang, P., 2023. The crisscross between p53 and metabolism in cancer. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 55(6), 914-922.
- Markin, P. A., Brito, A., Moskaleva, N. E., Tagliaro, F., La Frano, M. R., Savitskii, M. V., Appolonova, S. A., 2021. Short- and long-term exposures of the synthetic cannabinoid 5F-APINAC induce metabolomic alterations associated with neurotransmitter systems and embryotoxicity confirmed by teratogenicity in zebrafish. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP*, 243, 109000.
- Marston, O. J., Garfield, A. S., Heisler, L. K., 2011. Role of central serotonin and melanocortin systems in the control of energy balance. *European Journal of Pharmacology*, 660(1), 70-79.

- Martim, S. C., 2016 (20 Nisan) A brief history of marijuana in America. Time. <https://time.com/4298038/marijuana-history-in-america/>
- Martin, D. A., Elkon, K. B., 2004. Mechanisms of apoptosis. *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, 30(3), 441–vii.
- Martinotti, G., Santacroce, R., Papanti, D., Elgharably, Y., Prilutskaya, M., Corazza, O., 2017. Synthetic cannabinoids: psychopharmacology, clinical aspects, psychotic onset. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 16(5), 567–575.
- Maximino, C., Lima, M. G., Batista, E.deJ., Oliveira, K. R., Herculano, A. M., 2015. Interaction between 5-HT1B receptors and nitric oxide in zebrafish responses to novelty. *Neuroscience Letters*, 588, 54–56.
- McCorvy, J. D., Roth, B. L., 2015. Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics*, 150, 129–142.
- McGrath, P., Li, C. Q., 2008. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. *Drug Discovery Today*, 13(9-10), 394–401.
- McHugh, P. C., Buckley, D. A., 2015. The structure and function of the dopamine transporter and its role in CNS diseases. *Vitamins and Hormones*, 98, 339–369.
- Meier, M. H., Caspi, A., Ambler, A., Harrington, H., Houts, R., Keefe, R. S. E., McDonald, K., Ward, A., Poulton, R., Moffitt, T. E., 2012. Persistent cannabis users show neuropsychological decline from childhood to midlife. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(40), E2657–E2664.
- Meier, M. J., Harrill, J., Johnson, K., Thomas, R. S., Tong, W., Rager, J. E., Yauk, C. L. (2025). Progress in toxicogenomics to protect human health. *Nature Reviews Genetics*, 26(2), 105–122. <https://doi.org/10.1038/s41576-024-00767-1>
- Meiser, J., Weindl, D., Hiller, K., 2013. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling*, 11(1), 1-18.
- Menke, A. L., Spitsbergen, J. M., Wolterbeek, A. P., Woutersen, R. A., 2011. Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicologic Pathology*, 39(5), 759–775.
- Meydan, U., 2022. Bonzai: uyuşturucu madde ticareti suçunda sentetik kannabinoidler. *Türkiye Adalet Akademisi Dergisi* (49), 85-114.
- Minten, E. V., Yu, D. S., 2019. DNA Repair: Translation to the Clinic. *Clinical Oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))*, 31(5), 303–310.
- Mohammad-Zadeh, L. F., Moses, L., Gwaltney-Brant, S. M., 2008. Serotonin: a review. *Journal of Veterinary Pharmacology And Therapeutics*, 31(3), 187–199.
- Morales-Noé, A., Esteve-Turrillas, F. A., Armenta, S. 2022. Metabolism of third generation synthetic cannabinoids using zebrafish larvae. *Drug Testing and Analysis*, 14(4), 594–603.
- Morbiato, E., Bilel, S., Tirri, M., Arfè, R., Fantinati, A., Savchuk, S., Appolonova, S., Frisoni, P., Tagliaro, F., Neri, M., Grignolio, S., Bertolucci, C., Marti, M., 2020. Potential of the zebrafish model for the forensic toxicology screening of NPS: A comparative study of the effects of APINAC and methiopropamine on the behavior of zebrafish larvae and mice. *Neurotoxicology*, 78, 36–46.
- Nair-Roberts, R. G., Chatelain-Badie, S. D., Benson, E., White-Cooper, H., Bolam, J. P., Ungless, M. A., 2008. Stereological estimates of dopaminergic, GABAergic and glutamatergic neurons in the ventral tegmental area, substantia nigra and retrorubral field in the rat. *Neuroscience*, 152(4), 1024–1031.

- National Center for Biotechnology Information., 2025. *gnrhr3* Gonadotropin Releasing Hormone Receptor 3 [Danio rerio (zebrafish)]. Erişim Tarihi: 03.02.2025. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/564687>
- Navarro V. M., 2020. Metabolic regulation of kisspeptin - the link between energy balance and reproduction. *Nature reviews. Endocrinology*, 16(8), 407–420.
- Neve, K. A., Seamans, J. K., Trantham-Davidson, H., 2004. Dopamine receptor signaling. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 24(3), 165–205.
- Newton, K., Strasser, A., Kayagaki, N., and Dixit, V. M., 2024. Cell death. *Cell*, 187(2), 235–256.
- Ngo, D. H., Vo, T. S., 2019. An updated review on pharmaceutical properties of gamma-aminobutyric acid. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(15), 2678.
- Nilén, G., Larsson, M., Hyötyläinen, T., Keiter, S. H., 2024. A complex mixture of polycyclic aromatic compounds causes embryotoxic, behavioral, and molecular effects in zebrafish larvae (*Danio rerio*), and in vitro bioassays. *Science of The Total Environment*, 906, 167307.
- Nilén, G., M. Larsson, T. Hyötyläinen, S. H. Keiter. 2024. A Complex Mixture of Polycyclic Aromatic Compounds Causes Embryotoxic, Behavioral, and Molecular Effects in Zebrafish Larvae (*Danio rerio*), and in Vitro Bioassays. *Science of The Total Environment*, 906, 167307.
- Norton, W. H., Folchert, A., Bally-Cuif, L., 2008. Comparative analysis of serotonin receptor (HTR1A/HTR1B families) and transporter (slc6a4a/b) gene expression in the zebrafish brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 511(4), 521–542.
- Nüsslein-Volhard, C., Singh, A. P., 2017., How fish color their skin: A paradigm for development and evolution of adult patterns: Multipotency, plasticity, and cell competition regulate proliferation and spreading of pigment cells in Zebrafish coloration. *Bioessays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 39(3), 10.1002/bies.201600231.
- O'Connor, M. J., Beebe, L. L., Deodato, D., Ball, R. E., Page, A. T., VanLeuven, A. J., Harris, K. T., Park, S., Hariharan, V., Lauderdale, J. D., Dore, T. M., 2019. Bypassing glutamic acid decarboxylase 1 (*Gad1*) induced craniofacial defects with a photoactivatable translation blocker morpholino. *ACS Chemical Neuroscience*, 10(1), 266–278.
- Oltrabella, F., Melgoza, A., Nguyen, B., Guo, S., 2017. Role of the endocannabinoid system in vertebrates: Emphasis on the zebrafish model. *Development, Growth & Differentiation*, 59(4), 194–210.
- Organisation for Economic Co-operation and Development, 2013. Test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- Öztürk, H. M., Yetkin, E., Öztürk, S., 2019. Synthetic Cannabinoids and Cardiac Arrhythmia Risk: Review of the Literature. *Cardiovascular Toxicology*, 19(3), 191–197.
- Pagano, C., Navarra, G., Coppola, L., Avilia, G., Bifulco, M., Laezza, C., 2022. Cannabinoids: Therapeutic Use in Clinical Practice. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3344.
- Parichy D. M., 2015., Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. *eLife*, 4, e05635.

- Park, J. S., Samanta, P., Lee, S., Lee, J., Cho, J. W., Chun, H. S., Yoon, S., Kim, W. K., 2021. Developmental and neurotoxicity of acrylamide to zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3518.
- Park, M. G., Lim, J., Kim, D., Lee, W. S., Yoon, B. E., Lee, C. J., 2025. Suppressing astrocytic GABA transaminase enhances tonic inhibition and weakens hippocampal spatial memory. *Experimental & Molecular Medicine*, 57(2), 379-389.
- Park, W., Wei, S., Kim, B. S., Kim, B., Bae, S. J., Chae, Y. C., Dongryeol Ryu., Ha, K. T., 2023. Diversity and complexity of cell death: A historical review. *Experimental & Molecular Medicine*, 55(8), 1573-1594.
- Patton, E. E., Zon, L. I., Langenau, D. M., 2021. Zebrafish disease models in drug discovery: from preclinical modelling to clinical trials. *Nature reviews. Drug Discovery*, 20(8), 611–628.
- Pei, D. S., Strauss, P. R., 2013. Zebrafish as a model system to study DNA damage and repair. *Mutation Research*, 743-744, 151–159.
- Pisanti, S., Bifulco, M., 2019. Medical Cannabis: A plurimillennial history of an evergreen. *Journal of Cellular Physiology*, 234(6), 8342–8351.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., D’Orazi, G., 2016. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, 8(4), 603–619.
- Potts, A. J., Cano, C., Thomas, S. H. L., Hill, S. L., 2020. Synthetic cannabinoid receptor agonists: classification and nomenclature. *Clinical Toxicology (Philadelphia, PA.)*, 58(2), 82–98.
- Pourhamzeh, M., Moravej, F. G., Arabi, M., Shahriari, E., Mehrabi, S., Ward, R., Ahadi, R., Joghataei, M. T., 2022. The Roles of Serotonin in Neuropsychiatric Disorders. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 42(6), 1671–1692.
- Psychoyos, D., Hungund, B., Cooper, T., Finnell, R. H., 2008. A cannabinoid analogue of Delta9-tetrahydrocannabinol disrupts neural development in chick. *Birth defects research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology*, 83(5), 477–488.
- Psychoyos, D., Hungund, B., Cooper, T., Finnell, R. H., 2008. A cannabinoid analogue of Δ^9 -tetrahydrocannabinol disrupts neural development in chick. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 83(5), 477-488.
- Pulver, B., Fischmann, S., Gallegos, A., Christie, R., 2023. EMCDDA framework and practical guidance for naming synthetic cannabinoids. *Drug Testing and Analysis*, 15(3), 255–276.
- Pytliak, M., Vargová, V., Mechírová, V., Felšöci, M., 2011. Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiological Research*, 60(1), 15–25.
- Reed J. C., 2000. Mechanisms of apoptosis. *The American Journal of Pathology*, 157(5), 1415–1430.
- Reyes-Nava, N. G., Yu, H. C., Coughlin, C. R., 2nd, Shaikh, T. H., Quintana, A. M., 2020. Abnormal expression of GABA_A receptor subunits and hypomotility upon loss of gabral in zebrafish. *Biology Open*, 9(4), bio051367.
- Richards, F. M., Alderton, W. K., Kimber, G. M., Liu, Z., Strang, I., Redfern, W. S., Valentin, J. P., Winter, M. J., Hutchinson, T. H., 2008. Validation of the use of zebrafish larvae in visual safety assessment. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 58(1), 50–58.

- Rodriguez-Martin, I., Herrero-Turron, M. J., Marron Fdez de Velasco, E., Gonzalez-Sarmiento, R., Rodriguez, R. E., 2007. Characterization of two duplicate zebrafish Cb2-like cannabinoid receptors. *Gene*, 389(1), 36–44.
- Ronin C., 1989. Les récepteurs des gonadotropines [Gonadotropin receptors]. *Annales D'endocrinologie*, 50(5), 388–398.
- Roque-Bravo, R., Silva, R. S., Malheiro, R. F., Carmo, H., Carvalho, F., da Silva, D. D., Silva, J. P., 2023. Synthetic Cannabinoids: A Pharmacological and Toxicological Overview. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 63, 187–209.
- Rosa, J. G. S., Lima, C., Lopes-Ferreira, M., 2022. Zebrafish Larvae Behavior Models as a Tool for Drug Screenings and Pre-Clinical Trials: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(12), 6647.
- Rosenkrantz, H., 1999. Effects of cannabis on fetal development of rodents. In G. G. Nahas, K. M. Sutin, D. J. Harvey & S. Agurell (Eds.), *Marihuana and Medicine* (ss. 411–430). Totowa, NJ: Humana Press.
- Rosenkrantz, H., 1999. Effects of Cannabis on Fetal Development of Rodents. In *Marihuana and Medicine*, 411–430. Totowa, NJ: Humana Press.
- Rosenkrantz, H., Grant, R. J., Fleischman, R. W., Baker, J. R., 1986. Marihuana-induced embryotoxicity in the rabbit. *Fundamental and Applied Toxicology*, 7(2), 236–243.
- Rosenkrantz, H., Grant, R. J., Fleischman, R. W., Baker, J. R., 1986. Marihuana-induced embryotoxicity in the rabbit. *Fundamental and Applied Toxicology*, 7(2), 236–243.
- Sadamitsu, K., Shigemitsu, L., Suzuki, M., Ito, D., Kashima, M., Hirata, H., 2021. Characterization of zebrafish GABA_A receptor subunits. *Scientific Reports*, 11(1), 6242.
- Sakata, S., Yan, Y., Satou, Y., Momoi, A., Ngo-Hazelett, P., Nozaki, M., Furutani-Seiki, M., Postlethwait, J. H., Yonehara, S., Sakamaki, K., 2007. Conserved function of caspase-8 in apoptosis during bony fish evolution. *Gene*, 396(1), 134–148.
- Salvesen, G. S., 2002. Caspases and apoptosis. *Essays in Biochemistry*, 38, 9–19.
- Salvesen, G. S., 2002. Caspases and apoptosis. *Essays in Biochemistry*, 38, 9–19.
- Sant, K., Timme-Laragy, A., 2018. Zebrafish as a model for toxicological perturbation of yolk and nutrition in the early embryo. *Current Environmental Health Reports*, 5(1), 125–133.
- Sarasa, S. B., Mahendran, R., Muthusamy, G., Thankappan, B., Selta, D. R. F., Angayarkanni, J., 2020. A brief review on the non-protein amino acid, gamma-amino butyric acid (GABA): Its Production and Role in Microbes. *Current Microbiology*, 77(4), 534–544.
- Schärer O. D., 2003. Chemistry and biology of DNA repair. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 42(26), 2946–2974.
- Schneider, F., Tomek, W., Gründker, C., 2006. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: a review. *Theriogenology*, 66(4), 691–709.
- Schneider, H., Fritzky, L., Williams, J., Heumann, C., Yochum, M., Pattar, K., Noppert, G., Mock, V., Hawley, E., 2012. Cloning and expression of a zebrafish 5-HT(2C) receptor gene. *Gene*, 502(2), 108–117.
- Schrot, R. J., Hubbard, J. R., 2016. Cannabinoids: Medical implications. *Annals of Medicine*, 48(3), 128–141.

- Schurman, L. D., Lu, D., Kendall, D. A., Howlett, A. C., Lichtman, A. H., 2020. Molecular mechanism and cannabinoid pharmacology. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 258, 323–353.
- Scimemi A., 2014. Structure, function, and plasticity of GABA transporters. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 161.
- Seely, K. A., Lapoint, J., Moran, J. H., Fattore, L., 2012. Spice drugs are more than harmless herbal blends: a review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 39(2), 234-243.
- Seely, K. A., Lapoint, J., Moran, J. H., Fattore, L., 2012. Spice drugs are more than harmless herbal blends: a review of the pharmacology and toxicology of synthetic cannabinoids. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 39(2), 234-243.
- Selderslaghs, I. W., Van Rompay, A. R., De Coen, W., Witters, H. E., 2009. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reproductive Toxicology*, 28(3), 308-320.
- Selderslaghs, I. W., Van Rompay, A. R., De Coen, W., Witters, H. E., 2009. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reproductive Toxicology*, 28(3), 308-320.
- Seyit, M., Ozen, M., Oskay, A., Kadioglu, E., 2016. Effectiveness of the synthetic cannabinoids seminar. *Turkish Journal of Emergency Medicine*, 16(2), 57–59.
- Sharma, R., Weinstein, A., 2025. Synthetic cannabinoid withdrawal: A systematic review of case reports. *European Addiction Research*. 1-17.
- Sherif F. M., 1994. GABA-transaminase in brain and blood platelets: basic and clinical aspects. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 18(8), 1219–1233.
- Shevyrin, V., Melkozerov, V., Endres, G., Shafran, Y., Morzherin, Y., 2016. On a new cannabinoid classification system: A sight on the illegal market of novel psychoactive substances. *Cannabis and Cannabinoid Research*, 1(1), 186–194.
- Shi, Z., Liang, X., Zhao, Y., Liu, W., Martyniuk, C. J., 2022. Neurotoxic effects of synthetic phenolic antioxidants on dopaminergic, serotonergic, and GABAergic signaling in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Science of The Total Environment*, 830, 154688.
- Shi, Z., Liang, X., Zhao, Y., Liu, W., Martyniuk, C. J., 2022. Neurotoxic effects of synthetic phenolic antioxidants on dopaminergic, serotonergic, and gabaergic signaling in larval zebrafish (*danio rerio*). *Science of The Total Environment*, 830, 154688.
- Shibasaki, Y., Yabu, T., Shiba, H., Moritomo, T., Mano, N., Nakanishi, T., 2024. Characterization of fish-specific IFN γ -related binding with a unique receptor complex and signaling through a novel pathway. *FEBS Open Bio*, 14(4), 532–544.
- Sholler, D. J., Huestis, M. A., Amendolara, B., Vandrey, R., Cooper, Z. D., 2020. Therapeutic potential and safety considerations for the clinical use of synthetic cannabinoids. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 199, 173059.
- Shontz, E. C., Souders, C. L., 2nd, Schmidt, J. T., Martyniuk, C. J., 2018. Domperidone upregulates dopamine receptor expression and stimulates locomotor activity in larval zebrafish (*Danio rerio*). *Genes, Brain, and Behavior*, 17(4), e12460.
- Singh, V. K., Seed, T. M., 2021. How necessary are animal models for modern drug discovery?. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 16(12), 1391–1397.

- Sola, L., Gornung, E., 2001. Classical and molecular cytogenetics of the zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae, Cypriniformes): an overview. *Genetica*, 111(1-3), 397–412.
- Son, H. W., Ali, D. W., 2022. Endocannabinoid Receptor Expression in Early Zebrafish Development. *Developmental Neuroscience*, 44(3), 142–152.
- Song, Y., Chen, J., Tao, B., Luo, D., Zhu, Z., Hu, W., 2020. Kisspeptin2 regulates hormone expression in female zebrafish (*Danio rerio*) pituitary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 513, 110858.
- Song, Y., Chen, J., Tao, B., Luo, D., Zhu, Z., Hu, W., 2020. Kisspeptin2 regulates hormone expression in female zebrafish (*danio rerio*) pituitary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 513, 110858.
- Spaderna, M., Addy, P. H., D'Souza, D. C., 2013. Spicing things up: synthetic cannabinoids. *Psychopharmacology*, 228(4), 525–540.
- Spanagel R., 2020. Cannabinoids and the endocannabinoid system in reward processing and addiction: from mechanisms to interventions. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 22(3), 241–250.
- Spead, O., Verreet, T., Donelson, C. J., Poulain, F. E., 2018. Characterization of the caspase family in zebrafish. *PloS one*, 13(5), e0197966.
- Steinmetz, K. L., Spack, E. G., 2009. The basics of preclinical drug development for neurodegenerative disease indications. *BMC neurology*, 9 Suppl 1(Suppl 1), S2.
- Steven, N. T., Garrett, E. S., 2014. Chapter 16—Molecular mechanisms underlying the development of functional and behavioral tolerance to alcohol. In A. B. C. Noronha, C. Cui, R. A. Harris, & J. C. Crabbe (Eds.), *Neurobiology of Alcohol Dependence* (ss. 321–346). Academic Press.
- Steven, N. T., Garrett, E. S., 2014. Chapter 16—molecular mechanisms underlying the development of functional and behavioral tolerance to alcohol. In Noronha, A. B. C., Cui, C., Harris, R. A., & Crabbe, J. C. (Eds.), *Neurobiology of Alcohol Dependence* (pp. 321–346). Academic Press.
- Swami, T., Weber, H. C., 2018. Updates on the biology of serotonin and tryptophan hydroxylase. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes, and Obesity*, 25(1), 12–21.
- Swinney, D. C., Anthony, J., 2011. How were new medicines discovered? *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(7), 507–519.
- Syntichaki, P., Tavernarakis, N., 2002. Death by necrosis: uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO Reports*, 3(7), 604–609.
- Şişman T., 2011. Early life stage and genetic toxicity of stannous chloride on zebrafish embryos and adults: Toxic effects of tin on zebrafish. *Environmental Toxicology*, 26(3), 240–249.
- Tai, S., Fantegrossi, W. E., 2017. Pharmacological and Toxicological Effects of Synthetic Cannabinoids and Their Metabolites. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 32, 249–262.
- Teixeira H. M., 2025. Phytocannabinoids and synthetic cannabinoids: from recreational consumption to potential therapeutic use - a review. *Frontiers in toxicology*, 6, 1495547.
- Tellioğlu, T., Tellioğlu, Z., 2012. Can medical marijuana be used in the treatment of psychiatric disorders? *Bulletin of Clinical Psychopharmacology*, 22(1), 98–109.
- Tello, J. A., Wu, S., Rivier, J. E., Sherwood, N. M., 2008. Four functional GnRH receptors in zebrafish: analysis of structure, signaling, syntenic and phylogeny. *Integrative and Comparative Biology*, 48(5), 570–587.

- Tettey, J. N. A., Crean, C., Rodrigues, J., Angeline Yap, T. W., Lee Wendy Lim, J., Shirley Lee, H. Z., Ching, M., 2021. United Nations Office on Drugs and Crime: Recommended methods for the Identification and Analysis of Synthetic Cannabinoid Receptor Agonists in Seized Materials. *Forensic Science International. Synergy*, 3, 100129.
- Thompson, A. J., Lummis, S. C., 2006. 5-HT₃ receptors. *Current pharmaceutical design*, 12(28), 3615–3630.
- Thomsen, L. R., Rosengren, R. J., Glass, M., 2024. Potential Implications of Multi-Drug Exposure with Synthetic Cannabinoids: A Scoping Review of Human Case Studies. *Psychoactives*, 3(3), 365-383.
- Thornton, C., Dickson, K. E., Carty, D. R., Ashpole, N. M., Willett, K. L., 2020. Cannabis constituents reduce seizure behavior in chemically-induced and scn1a-mutant zebrafish. *Epilepsy & Behavior*, 110, 107152.
- Thornton, C., K. E. Dickson, D. R. Carty, N. M. Ashpole, Willett, K. L., 2020. Cannabis Constituents Reduce Seizure Behavior in Chemically-Induced and scn1a-Mutant Zebrafish. *Epilepsy & Behavior*, 110, 107152.
- Tombari, R. J., Mundy, P. C., Morales, K. M., Dunlap, L. E., Olson, D. E., Lein, P. J., 2023. Developmental Neurotoxicity Screen of Psychedelics and Other Drugs of Abuse in Larval Zebrafish (*Danio rerio*). *ACS chemical neuroscience*, 14(5), 875–884.
- Tucker, M. B., MacKenzie, S. H., Maciag, J. J., Dirscherl Ackerman, H., Swartz, P., Yoder, J. A., Hamilton, P. T., Clay Clark, A., 2016. Phage display and structural studies reveal plasticity in substrate specificity of caspase-3a from zebrafish. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 25(11), 2076–2088.
- Tzung, K. W., R. Goto, J. M. Saju., 2015. Early Depletion of Primordial Germ Cells in Zebrafish Promotes Testis Formation. *Stem Cell Reports*, 4, (1), 61–73.
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., Iguchi, T., 2002. Oocyte Apoptosis During the Transition From Ovary-Like Tissue to Testes During Sex Differentiation of Juvenile Zebrafish *Journal of Experimental Biology*, 205, (6), 711–718.
- Umscheid, C. A., Margolis, D. J., Grossman, C. E., 2011. Key concepts of clinical trials: a narrative review. *Postgraduate medicine*, 123(5), 194–204.
- UniProt Consortium, 2025. UniProt: The universal protein knowledgebase. Erişim tarihi: 28 Mayıs 2025, <https://www.uniprot.org/>
- United Nations., 1961. Single Convention on Narcotic Drugs, 1961. https://www.unodc.org/pdf/convention_1961_en.pdf
- UNODC (United Nations Office on Drug(s) and Crime., 2024. Early Warning Advisory (EWA) on New Psychoactive Substances (NPS). <https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS> (Access date 17 April 2024).
- Vamathevan, J., Clark, D., Czodrowski, P., Dunham, I., Ferran, E., Lee, G., Li, B., Madabhushi, A., Shah, P., Spitzer, M., Zhao, S., 2019. Applications of machine learning in drug discovery and development. *Nature reviews. Drug discovery*, 18(6), 463–477.
- Van Aggelen, G., Ankley, G. T., Baldwin, W. S., Bearden, D. W., Benson, W. H., Chipman, J. K., Collette, T. W., Craft, J. A., Denslow, N. D., Embry, M. R., Falciani, F., George, S. G., Helbing, C. C., Hoekstra, P. F., Iguchi, T., Kagami, Y., Katsiadaki, I., Kille, P., Liu, L., ... Yu, L. (2010). Integrating omic technologies into aquatic ecological risk assessment and environmental monitoring: Hurdles, achievements, and future outlook. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 118, Issue 1). <https://doi.org/10.1289/ehp.0900985>

- Vandrey, R., Dunn, K. E., Fry, J. A., Girling, E. R., 2012. A survey study to characterize use of Spice products (synthetic cannabinoids). *Drug and alcohol dependence*, 120(1-3), 238–241.
- Vandrey, R., Stitzer, M. L., Mintzer, M. Z., Huestis, M. A., Murray, J. A., Lee, D., 2013. The dose effects of short-term dronabinol (oral THC) maintenance in daily cannabis users. *Drug and alcohol dependence*, 128(1-2), 64–70.
- Vaz, R., Hofmeister, W., Lindstrand, A., 2019. Zebrafish Models of Neurodevelopmental Disorders: Limitations and Benefits of Current Tools and Techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, (6), 1296.
- Veenstra-VanderWeele, J., Anderson, G. M., Cook, E. H., Jr., 2000. Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions. *European journal of pharmacology*, 410(2-3), 165–181.
- Vera, L., Bernstein, K., Lee, S., 2020. Historical and Current Perspectives of Synthetic Marijuana: Critical Review. *Journal of addictions nursing*, 31(2), 85–91.
- Vermersch P., 2011. Sativex(®) (tetrahydrocannabinol + cannabidiol), an endocannabinoid system modulator: basic features and main clinical data. *Expert review of neurotherapeutics*, 11(4 Suppl), 15–19.
- Vogel, C., and Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 13(4). <https://doi.org/10.1038/nrg3185>.
- Voss, A. K., Strasser, A., 2020. The essentials of developmental apoptosis. *F1000Research*, 9, F1000 Faculty Rev-148.
- Walsh, K. B., Andersen, H. K., 2020. Molecular Pharmacology of Synthetic Cannabinoids: Delineating CB1 Receptor-Mediated Cell Signaling. *International journal of molecular sciences*, 21(17), 6115.
- Wang, B., Mechaly, A. S., Somoza, G. M., 2022. Overview and New Insights Into the Diversity, Evolution, Role, and Regulation of Kisspeptins and Their Receptors in Teleost Fish. *Frontiers in endocrinology*, 13, 862614.
- Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T., Hayasaki, H., 2002. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. *International review of cytology*, 213, 1–47.
- Winstock, A. R., Barratt, M. J., 2013. Synthetic cannabis: a comparison of patterns of use and effect profile with natural cannabis in a large global sample. *Drug and alcohol dependence*, 131(1-2), 106–111.
- Wong, K. U., Baum, C. R., 2019. Acute Cannabis Toxicity. *Pediatric emergency care*, 35(11), 799–804.
- World Health Organization., 1997. Cannabis: A Health Perspective and Research Agenda (No. WHO/MSA/PSA/97.4). World Health Organization.
- World Health Organization., 2021. Critical Review Report: 4FMDMB-BICA. In Expert Committee on Drug Dependence, 44th Meeting. Geneva: World Health Organization 11–15 October 2021. <https://www.who.int/publications/m/item/4f-mdmb-bica-critical-review-report> (Accessed date: 06 November 2024).
- Wu, Y., Fan, F., Zhou, L., Shen, Y., Wang, A., Qin, Y., Wang, J., Yao, W., 2025. ADB-FUBINACA-induced developmental toxicity, neurotoxicity, and cardiotoxicity in embryonic zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental research*, 276, 121517.

- Wyllie, A. H., 2010. Where, O Death, Is thy Sting? A Brief Review of Apoptosis Biology. *Molecular Neurobiology* 42, (1), 4–9.
- Xu, B., Yan, J., Zhou, Y., Zhang, F., Wang, B., Wang, J., Wu, Y., Xu, Y., 2025. Effects of MDA-19 on Zebrafish Larval Behavior: Perspectives From Neurodevelopment, Oxidative Stress, and Metabolomics. *Journal of applied toxicology : JAT*, 45(3), 440–451.
- Xu, S., Zhang, H., Li, C.-Z., Lai, P.-S., Wang, G., Chan, Y. S., Cheng, S. H., Chen, X., 2021. Cannabidiol promotes fin regeneration and reduces apoptosis in zebrafish embryos. *Journal of Functional Foods*, 86, 104694.
- Xu, X., Lai, Y., Hua, Z. C., 2019. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience reports*, 39(1), BSR20180992.
- Yabut, J. M., Crane, J. D., Green, A. E., Keating, D. J., Khan, W. I., Steinberg, G. R., 2019. Emerging Roles for Serotonin in Regulating Metabolism: New Implications for an Ancient Molecule. *Endocrine reviews*, 40(4), 1092–1107.
- Yamamoto, K., Vernier, P., 2011. The evolution of dopamine systems in chordates. *Frontiers in neuroanatomy*, 5, 21.
- Yamashita, M., Mizusawa, N., Hojo, M., Yabu, T., 2008. Extensive apoptosis and abnormal morphogenesis in pro-caspase-3 transgenic zebrafish during development. *Journal of Experimental Biology*, 211, 1874–1881.
- Yan, W., Li, L., Li, G., and Zhao, S., 2017. Microcystin-LR Induces Changes in the GABA Neurotransmitter System of Zebrafish. *Aquatic Toxicology* 188, 170–176.
- Yu, A. C., Fisher, T. E., Hertz, E., Tildon, J. T., Schousboe, A., and Hertz, L., 1984. Metabolic Fate of [14C]-Glutamine in Mouse Cerebral Neurons in Primary Cultures. *Journal of Neuroscience Research*, 11, (4), 351– 357.
- Yuan, J., Ofengeim, D., 2024. A guide to cell death pathways. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 25(5), 379–395.
- Yue, L., Xiang, P., Shen, B., Xu, D., Song, F., Yan, H., 2021. Metabolism of 4f-mdmb-bica in zebrafish by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. *Drug Test Anal*, 13, 1223–1229.
- Zanda, M. T., Fattore, L., 2018. Old and new synthetic cannabinoids: lessons from animal models. *Drug Metabolism Reviews*, 50(1), 54–64.
- Zawilska, J. B., Andrzejczak, D., 2015. Next generation of novel psychoactive substances on the horizon - A complex problem to face. *Drug and Alcohol Dependence*, 157, 1–17.
- Zebrafish Information Network, 2025. ZFIN: The Zebrafish Information Network. Erişim tarihi: 29 Mayıs 2025, <https://zfin.org/>
- Zhang, Q., Zhu, L., Li, H., Chen, Q., Li, N., Li, J., Zhao, Z., Xiao, D., Tang, T., Bi, C., Zhang, Y., Zhang, H., Zhang, G., Li, M., Zhu, Y., Zhang, J., Kong, J., 2024. Insights and progress on the biosynthesis, metabolism, and physiological functions of gamma-aminobutyric acid (GABA): a review. *PeerJ*, 12, e18712.
- Zhao, Y., Lin, M. C., Mock, A., Yang, M., Wayne, N. L., 2014. Kisspeptins modulate the biology of multiple populations of gonadotropin-releasing hormone neurons during embryogenesis and adulthood in zebrafish (*Danio rerio*). *PloS one*, 9(8), e104330.
- Zimmermann, K. C., Green, D. R., 2001. How cells die: apoptosis pathways. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 108(4 Suppl), S99–S103.

- Zimmermann, U. S., Winkelmann, P. R., Pilhatsch, M., Nees, J. A., Spanagel, R., Schulz, K., 2009. Withdrawal phenomena and dependence syndrome after the consumption of "spice gold". *Deutsches Arzteblatt International*, 106(27), 464–467.
- Zou, S., Kumar, U., 2018. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 833.
- Zuardi, A. W. 2006. History of cannabis as a medicine: A review. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 28(2), 153–157.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı :	Berşan KULLEBİ
Doğum tarihi :	
Doğum Yeri :	
Uyruğu :	
Adres :	
Tel :	
E-mail :	
Eğitim	
Lise :	Tevfik İleri Anadolu Lisesi
Lisans :	Atatürk Üniversitesi
Yüksek lisans :	Atatürk Üniversitesi
Doktora :	
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce :	İyi
Tezden Üretilmiş Yayınlar	
Berşan KULLEBİ, Ömercan ALAT, Özkan AKSAKAL, Derya YILMAZTÜRK, Ayşe LAFZİ, and Turgay ŞİŞMAN (2025). Embryotoxicity Evaluation of Novel Synthetic Cannabinoid 4F-MDMB-BUTICA Using Zebrafish Embryos. <i>Journal of applied toxicology</i> : JAT, 45(7), 1314–1330. https://doi.org/10.1002/jat.4778	