



**YENİ NESİL SENTETİK KANNABİNOİD CUMYL-
4CN-BINACA’NIN NÖROTOKSİK VE
TERATOJENİK ETKİLERİNİN ZEBRA BALIĞI
EMBRYO VE LARVALARINDA ARAŞTIRILMASI**

Derya YILMAZTÜRK

**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

**YENİ NESİL SENTETİK KANNABİNOİD CUMYL-4CN-BINACA'NIN
NÖROTOKSİK VE TERATOJENİK ETKİLERİNİN ZEBRA BALIĞI EMBRİYO VE
LARVALARINDA ARAŞTIRILMASI**

(Investigation of the Neurotoxic and Teratogenic Effects of CUMYL-4CN-BINACA, a New
Generation Synthetic Cannabinoid, in Zebrafish Embryo and Larvae)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Derya YILMAZTÜRK

Danışman: Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN

Erzurum
Haziran, 2025



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Graduate School of Natural and
Applied Sciences

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

**Yeni Nesil Sentetik Kannabinoid CUMYL-4CN-BINACA' nın Nörotoksik ve
Teratojenik Etkilerinin Zebra Balığı Embriyo ve Larvalarında Araştırılması**

Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN danışmanlığında, Derya YILMAZTÜRK tarafından hazırlanan bu çalışma, 19/06/2025 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 Islak İmzalıdır
Danışman:	Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır
Jüri Üyesi:	Dr. Öğr. Üyesi Buket BAKAN <i>Atatürk Üniversitesi</i>	Aslı Islak İmzalıdır

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

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

Prof.Dr. Alper NUHOĞLU

Enstitü Müdürü

Aslı Islak İmzalıdır

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Yüksek Lisans Tezi olarak *Prof. Dr. Turgay Şişman* danışmanlığında sunulan “**YENİ NESİL SENTETİK KANNABİNOİD CUMYL-4CN-BINACA’NIN NÖROTOKSİK VE TERATOJENİK ETKİLERİNİN ZEBRA BALIĞI EMBRİYO VE LARVALARINDA ARAŞTIRILMASI**” 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	11	30
Kuramsal Temeller	18	30
Materyal ve Metot	10	35
Araştırma Bulguları ve Tartışma	12	20
Sonuçlar	5	20
Tezin Geneli	16	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
Derya YILMAZTÜRK	Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN
19.6.2025	19.6.2025
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 vesayılı 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

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Hayvan Fizyolojisi ve Histolojisi Laboratuvarı'nda yapılmıştır. FCD-2023-13221 numaralı BAP projesi ile Atatürk Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

Yüksek lisans tez çalışmamın her aşamasında, değerli fikirleriyle desteğini esirgemeyen, bilgi birikimi ile bana yön gösteren, her türlü desteği sağlayan danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN'a en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Araştırmada kullanılan zebra balıkları embriyolarının temin edilmesinde yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Saltuk Buğrahan CEYHUN'a ve Dr. Öğr. Üyesi Ekrem SULUKAN'a, moleküler çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Özkan AKSAKAL ve Ömercan ALAT'a teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde dualarıyla desteklerini hissettiğim anneme, babama, kardeşlerime, eşime, varlıklarıyla hayatıma ışık saçan canımdan çok sevdiğim kızıma ve oğluma teşekkür ederim.

Derya YILMAZTÜRK

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

YENİ NESİL SENTETİK KANNABİNOİD CUMYL-4CN-BINACA 'NIN NÖROTOKSİK VE TERATOJENİK ETKİLERİNİN ZEBRA BALIĞI EMBRİYO VE LARVALARINDA ARAŞTIRILMASI

Derya YILMAZTÜRK

Danışman: Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN

Amaç: CUMYL-4CN-BINACA gibi sentetik kannabinoidler, gelişimsel toksisitesi büyük ölçüde bilinmeyen, yeni ortaya çıkan psikoaktif maddelerdir. Doğum öncesi ve erken yaşam maruziyetine ilişkin artan riskler göz önüne alındığında, bu maddelerin embriyonik gelişim üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi son derece önemlidir. Bu çalışmada, CUMYL-4CN-BINACA'nın zebra balığı (*Danio rerio*) embriyoları üzerindeki etkileri morfolojik gelişim, davranış ve gen ekspresyonu açısından incelenmiştir.

Yöntem: Embriyolar, 1,25 ile 40,0 mg/L konsantrasyon aralığında, kısa süreli (döllenmeden sonraki 3–24 saat) ve uzun süreli (3–120 saat) olmak üzere iki farklı zaman aralığında CUMYL-4CN-BINACA'ya maruz bırakılmıştır. Gelişimsel toksisite göstergeleri, sağ kalım, koryondan çıkma ve larva hareketliliği değerlendirilmiştir. Ayrıca, apoptoz, davranış ve nörotransmisyonla ilişkili 19 genin transkript düzeyleri qPCR ile nicel olarak ölçülmüştür.

Bulgular: Kısa süreli maruziyet anlamlı bir morfolojik etki oluşturmazken, uzun süreli maruziyet konsantrasyona bağımlı olarak teratojenik etkilere yol açmıştır; bu etkiler arasında perikard ve vitellus kesesi ödemi, omurga deformiteleri ve hipoaktivite yer almaktadır. 120. saatte belirlenen medyan öldürücü konsantrasyon (LC_{50}) 16,624 mg/L ve medyan etkili konsantrasyon (EC_{50}) 9,083 mg/L olarak bulunmuştur. Uzun süreli maruziyet, davranışla ilişkili genlerin (*gnrh3*, *gnrhr3*, *kiss2*), apoptoz belirteçlerinin (*casp3a*, *casp8*, *ifn1*, *tp53*) ve DNA onarım geni *rad51*'in ekspresyonunu önemli ölçüde değiştirmiştir. Ayrıca, dopaminerjik (*dat*, *drd1*, *drd3*), serotonerjik (*5ht1aa*, *5ht1a*, *5ht1b*, *5ht2c*) ve GABAerjik (*gabra1*, *gat1*, *abat*, *gad1b*) nörotransmisyonla ilişkili genlerin düzenlenmediği gözlemlenmiştir.

Sonuç: Bu bulgular, CUMYL-4CN-BINACA'nın zebra balığı embriyolarında normal gelişim ve nörodavranışsal programlamayı bozduğunu göstererek, erken omurgalı gelişimi açısından potansiyel bir risk taşıdığını ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: zebra balığı, embriyotoksisite, sentetik kannabinoid, CUMYL-4CN-BINACA, gen ifadesi

Haziran, 2025, 96 sayfa

ABSTRACT

MASTER THESIS

INVESTIGATION OF THE NEUROTOXIC AND TERATOGENIC EFFECTS OF CUMYL-4CN-BINACA, NEW GENERATION SYNTHETIC CANNABINOID, IN ZEBRAFISH EMBRYOS AND LARVAE

Derya YILMAZTÜRK

Supervisor: Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN

Purpose: Synthetic cannabinoids such as CUMYL-4CN-BINACA are emerging psychoactive substances with largely uncharacterized developmental toxicity. Given increasing risks of prenatal and early-life exposure, it is critical to evaluate their impact during embryogenesis. This study investigated the effects of CUMYL-4CN-BINACA on zebrafish (*Danio rerio*) embryos, focusing on morphological development, behavior, and gene expression.

Method: Embryos were exposed to CUMYL-4CN-BINACA at concentrations ranging from 1,25 to 40,0 mg/L during two windows: short-term (3–24 hours post-fertilization, hpf) and long-term (3–120 hpf). Developmental toxicity endpoints, survival, hatching, and larval locomotor activity were assessed. Additionally, qPCR was conducted to quantify transcript levels of 19 genes related to apoptosis, behavior, and neurotransmission.

Results: While short-term exposure caused no significant morphological effects, long-term exposure led to concentration-dependent teratogenic outcomes, including pericardial and yolk sac edema, axial deformities, and hypoactivity. The median lethal concentration (LC₅₀) and median effective concentration (EC₅₀) at 120 hpf were 16,624 mg/L and 9,083 mg/L, respectively. Prolonged exposure significantly altered the expression of behavior-associated genes (*gnrh3*, *gnrhr3*, *kiss2*), apoptotic markers (*casp3a*, *casp8*, *ifng1*, *tp53*), and DNA repair gene *rad51*. Notably, genes involved in dopaminergic (*dat*, *drd1*, *drd3*), serotonergic (*5ht1a*, *5ht1b*, *5ht2c*), and GABAergic (*gabra1*, *gat1*, *abat*, *gad1b*) neurotransmission were also dysregulated.

Conclusion: These findings demonstrate that CUMYL-4CN-BINACA interferes with normal development and neurobehavioral programming in zebrafish embryos, highlighting its potential risk to early vertebrate development.

Keywords: zebrafish, embryotoxicity, synthetic cannabinoid, CUMYL-4CN-BINACA, gene expression

Haziran 2025, 96 pages

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY TUTANAĞI.....	i
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	ii
TEŞEKKÜR	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	xi
GİRİŞ.....	1
KURAMSAL TEMELLER.....	4
Omurgalılarda ve İnsanlarda Embriyonik Gelişim	4
Döllenme	4
Segmentasyon	5
İmplantasyon	6
Gastrulasyon.....	8
Somitlerin gelişimi	10
Nörülasyon	12
Organogenezis.....	13
Teratojenite	14
Nörotoksisite	15
Sentetik Uyuşturucular.....	15
Sentetik Uyuşturucuların Nörotoksik Etkileri.....	19
Sentetik Uyuşturucuların Teratojenik Etkileri	20
CUMYL-4CN-BINACA.....	21
Model Organizma Olarak Zebra Balığı.....	23
Uyuşturucu Toksisite Tespitinde Zebra Balığı Kullanımı	26
Çalışmada İncelenen Zebra Balığı Genleri	27
Apoptoz (<i>casp3a</i> , <i>casp8</i> , <i>tp53</i> ve <i>ifng1</i>).....	27
DNA onarımı (<i>rad51</i>)	29
Dopamin (<i>dat</i> , <i>drd1</i> , <i>drd3</i>).....	30
Serotonin/5-hidroksitriptomin (<i>5ht1aa</i> , <i>5ht1a</i> , <i>5ht1b</i> , <i>5ht2c</i>).....	31

Gama amino butirik asit (<i>gabral, gat1, abat ve gad1b</i>).....	32
Davranış (<i>kiss2, gnrh3, gnrhr3</i>).....	34
MATERYAL VE METOT.....	37
Kimyasallar ve Çözeltiler.....	37
Zebra Balığı Bakımı ve Embriyo Toplama.....	37
Balık Embriyo Toksisite (FET) Testi.....	37
Davranışsal Analiz.....	38
Gen İfade Analizi.....	39
İstatistiksel Analiz.....	40
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	41
Mortalite.....	41
Koryondan Çıkış Oranları.....	42
Morfometrik Analiz.....	43
Kalp Atım Hızı.....	44
Morfolojik Değişiklikler.....	45
Davranışsal Analiz.....	52
İlgili Genlerin Ekspresyonları.....	53
Tartışma.....	58
SONUÇLAR.....	63
KAYNAKLAR.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	83

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. qPCR Analizi İçin Tasarlanan 19 Genin Primerleri	40
Tablo 2. Farklı Maruz Kalma Sürelerinde CUMYL-4CN-BINACA'nın Koryondan Çıkış Oranına (%) Etkisi	43
Tablo 3. CUMYL-4CN-BINACA Maruziyetinin, 120 hpf Embriyonik Gelişim Döneminde Zebra Balığı Larvalarının Vücut Uzunluğu, Baş, Göz ve Perikardiyal Alanları Üzerindeki Etkileri.....	44
Tablo 4. CUMYL-4CN-BINACA'ya Maruz Kalan Zebra Balığı Embriyolarının, 48 ve 120 hpf Embriyonik Gelişim Dönemlerindeki Kalp Atım Hızları (dakikada atım sayısı)	44
Tablo 5. CUMYL-4CN-BINACA Maruziyetinden 24-120 Saat Sonra Belirlenen Deformitelerin Yüzdesi.....	46
Tablo 6. CUMYL-4CN-BINACA'ya Maruz Kalan Zebra Balığı Embriyolarının TER Değerlendirmesi	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. CUMYL-4CN-BINACA (1-(4-siyanobutil)-N-(2-fenilpropan-2-il)-1H-indazol-3-karboksamid)'nın kimyasal yapısı.....	23
Şekil 2. Yetişkin Zebra Balığı (<i>Danio rerio</i>)	24
Şekil 3. CUMYL-4CN-BINACA'nın, LC ₅₀ (A) ve EC ₅₀ (B) değerlerinin hesaplanmasında kullanılan doz-cevap eğrileri (güven aralığı %95)	41
Şekil 4. Farklı CUMYL-4CN-BINACA konsantrasyonlarına maruz bırakılan zebra balığı larvalarının kısa süreli (A) ve uzun süreli (B) maruz kalma koşullarında kümülatif sağ kalım oranları (%).....	42
Şekil 5. Kontrol (A, B ve C) ve maruziet (D, E ve F) gruplarına ait 120 saat sonrası zebra balığı larvalarının morfolometrik özellikleri; A ve D; vücut uzunluğu, B ve E; baş alanı, C ve F; göz alanı (daire) ve perikardiyal alan (üçgen).	43
Şekil 6. 48 hpf zebra balığı larvalarının örnek görüntüleri: A) Kontrol grubu. B) 5,0 mg/L uygulama grubu: küçülmüş gözler (E) ve yumurta kesesinde biriken kırmızı kan hücreleri (R). C) 5,0 mg/L uygulama grubu: küçülmüş gözler (E) ve yumurta kesesi ödemi (YSE). D) 5,0 mg/L uygulama grubu: perikardiyal ödem (PE). E) 10,0 mg/L uygulama grubu: kısalmış kuyruk (T), küçülmüş gözler (E) ve perikardiyal ödem (PE). F) 10,0 mg/L uygulama grubu: şiddetli yumurta kesesi ödemi (YSE), zayıf pigmentasyon, deforme olmuş omurga (S) ve kafa (H).	48
Şekil 7. 72 hpf zebra balığı larvalarının örnek görüntüleri: A) Kontrol grubu. B) 5 mg/L uygulama grubu: lordoz (ok). C) 10,0 mg/L uygulama grubu: skolyoz (ok). D) 10,0 mg/L uygulama grubu: yumurta kesesi ödemi (siyah ok) ve küçülmüş göz (kırmızı ok) ile koryondan çıkmamış larva. E) 10,0 mg/L uygulama grubu: şiddetli vücut defekti (ödemler, kısa omurga, kıvrık kuyruk).	49
Şekil 8. 96 hpf zebra balığı larvalarının örnek görüntüleri: A) Kontrol grubu (yan görünüm).B) Kontrol grubu (dorsal görünüm) C) 5,0 mg/L uygulama grubu: kısalmış uzunluk (ok kuyruğu göstermektedir).D) 10,0 mg/L uygulama grubu: kısalmış uzunluk ve kıvrık kuyruk (ok).E) 5,0 mg/L uygulama grubu: zayıf pigmentasyon, F) 5,0 mg/L uygulama grubu: hafif kifoz (ok).G) 10,0 mg/L uygulama grubu: kısalmış uzunluk ve omurga deformitesi (oklar).H) 20,0 mg/L uygulama grubu: kısalmış uzunluk, küçülmüş gözler (kırmızı ok) ve eğik eksen (siyah ok).	50

Şekil 9. 120 hpf zebra balığı larvalarının örnek görüntüleri: A) Kontrol grubu (yan görünüm), şişmiş yüzme kesesi (ok). B) Kontrol grubu (dorsal görünüm), şişmiş yüzme kesesi (siyah ok) ve göğüs yüzgeci (kırmızı ok). C) 10,0 mg/L uygulama grubu: koryondan çıkmamış larva. D) 20,0 mg/L uygulama grubu: omurga deformitesi (ok) olan koryondan çıkmamış larva. E) 10,0 mg/L uygulama grubu: kırık omurga (kırmızı ok) ve kısalmış kuyruk yüzgeci (sarı ok). F) 5,0 mg/L uygulama grubu: zayıf pigmentasyon ve şişmemiş yüzme kesesi (ok). G) 10,0 mg/L uygulama grubu: gelişmemiş yüzme kesesi. H) 10,0 mg/L uygulama grubu: omurga deformitesi (siyah ok) ve kıvrık kuyruk (sarı ok). I) 5,0 mg/L uygulama grubu: lordoz (ok).....	51
Şekil 10. CUMYL-4CN-BINACA maruziyetinin 120 hpf zebra balığı larvalarındaki apoptoz (A) ve DNA onarımı (B) ile ilgili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri..	54
Şekil 11. CUMYL-4CN-BINACA maruziyetinin 120 hpf zebra balığı larvalarındaki, GABA ile ilgili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri.	55
Şekil 12. CUMYL-4CN-BINACA maruziyetinin 120 hpf zebra balığı larvalarındaki, dopamin (A) ve davranış (B) ile ilgili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri.	56
Şekil 13. CUMYL-4CN-BINACA maruziyetinin 120 hpf zebra balığı larvalarındaki, 5-hidroksitriptaminle ilgili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri	57

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

CB1	Kannabinoid Tip 1 Reseptör
CB2	Kannabinoid Tip 2 Reseptör
EUDA	Avrupa Birliği Uyuşturucu Ajansı
SK	Sentetik Kannabinoidler
THC	Delta-9-tetrahidrokanabinol
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
hpf	Döllenmeden sonraki saat
dpf	Döllenmeden sonraki gün

GİRİŞ

Kannabinoidler; endojen kannabinoidler, fitokannabinoidler (doğal kökenli kannabinoidler) ve sentetik kannabinoidler olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılmaktadır (Khullar et al., 2014). Delta-9-tetrahidrokannabinol (THC), en iyi bilinen doğal kannabinoid örneği olup esrarın başlıca psikoaktif bileşeni olarak tanımlanmaktadır (Sezer, 2018). THC, başta merkezi sinir sisteminde bulunan CB1 reseptörleri ile periferel dokularda yer alan CB2 reseptörleri üzerinden parsiyel agonist etki göstermektedir (Koller et al., 2013). Endojen kannabinoid sistemin başlıca bileşenleri arasında anandamid ve 2-araşidonilgliserol yer almaktadır. Sentetik kannabinoid (SK)'ler ise, THC'nin biyolojik etkilerini taklit edebilmek amacıyla laboratuvar ortamında sentetik olarak üretilen bileşiklerdir (Seely et al., 2011).

SK'ler, kötüye kullanımı her geçen gün artan yeni psikoaktif maddelerdir. SK'ler, merkezi sinir sistemindeki kannabinoid bağlayıcı reseptörler olan CB1 ve CB2 ile aynı anda etkileşime girme özelliğine sahiptirler (Winstock and Barratt, 2013). Bu maddeler THC'ye benzemekle birlikte daha fazla bağımlılık yapabilme potansiyeli olduğu tahmin edilmektedir. SK'lerin bilinen olumsuz etkileri arasında anksiyete, nöbetler, DNA hasarı, iltihaplanma, nefrotoksisite ve hepatotoksisite sayılabilir. Hatta koma ve aşırı doz nedeniyle ölüm olmak üzere bir dizi hasara neden olabilirler (Trecki et al., 2015; van Jan et al., 2015; Bileck et al., 2016; Guler et al., 2020; Silva et al., 2017).

SK'ler yeni psikoaktif maddeler olup (Abbate et al., 2018), doğal kannabinoidler gibi davranmaktadırlar (Cohen and Weinstein, 2018). Bu maddeler ilk olarak doksanlı yıllarda bağlanma yerlerinin belirlenmesi ve tıbbi kullanım için alternatifler oluşturmak amacıyla yalnızca tıbbi maksatlı üretilmişlerdir. Ancak son 10 yılda hem sentetik üretimi hemde kötüye kullanımı artmıştır (Bilici, 2014). 2016 yılında Avrupa Birliği Uyuşturucu Ajansı (EUDA) tarafından izlenen 620 yeni psikoaktif maddeden 169'unun SK olduğu rapor edilmiştir (EUDA, 2017). Örneğin, Amerika Birleşik Devletlerindeki öğrencilerin SK kullanımının yaklaşık %5,8 olduğu tahmin edilmektedir (EUDA, 2017). Kullanılabilirliği, düşük maliyeti ve standart toksikolojik testlerle saptanmasının zorluğu nedeniyle SK kullanımı katlanarak artmaktadır (Bilici, 2014). Bu ilaçların kullanımı tehlikeli yan etkilerle ilişkilendirilmiştir (Winstock ve Barratt, 2013).

Türkiye'de, CUMYL-4CN-BINACA [1-(4-cyanobutyl)-N-(2-phenylpropan-2-yl)-1H-indazole-3-carboxamide] isimli SK'in, 2016 yılının Mayıs-Aralık ayları arasında en yaygın

olarak kullanılan maddelerden biri olduğu rapor edilmiştir. Bu dönemde analiz edilen toplam 2516 vakanın 468'inde CUMYL-4CN-BINACA saptanmıştır. Mahkemeler ve savcılıklar tarafından gönderilen kan örneklerinin analizleri sonucunda bu bileşiğin kullanım sıklığı belirlenmiştir. Analiz edilen örneklerde CUMYL-4CN-BINACA düzeyleri 0,1 ng/mL ile 36,14 ng/mL arasında değişen konsantrasyonlarda tespit edilmiş ve raporlanmıştır. CUMYL-4CN-BINACA, 2016 yılının Mayıs ayında Adli Tıp Kurumu Başkanlığı Kimya İhtisas Dairesi Narkotik Şubesi tarafından ilk kez tanımlanmış ve analizlerde aranacak yeni psikoaktif maddeler listesine dâhil edilmiştir. Bu bileşik, 2015 yılından itibaren Avrupa Birliği uyuşturucu pazarında yer almakta olup, bu güne kadar 11 üye devlette tespit edilmiştir. Risk değerlendirme süreci kapsamında, Macaristan ve İsveç tarafından bildirilen veriler doğrultusunda bu maddeye maruz kaldığı doğrulanan toplam 11 ölüm vakası kayıtlara geçmiştir (EUDA, 2017). Türkiye'de yasaklı SK'ler listesinde yer alan CUMYL-4CN-BINACA'nın insanlardaki potansiyel toksik etkilerine ilişkin sınırlı sayıda vaka raporu bulunmaktadır. Avrupa Birliği tarafından 2018 yılı ortalarında kontrol altına alınmış olmakla birlikte, bu maddenin ayrıntılı toksikolojik profili, özellikle prelinik düzeyde, hâlâ yeterince ortaya konmamıştır.

Zebra balığı (*Danio rerio*), gelişimsel biyoloji çalışmalarında en çok tercih edilen organizma olup ilaçların ve özellikle bağımlılık yapan maddelerin biyolojik etkilerini incelemek için de yaygın olarak kullanılmaktadır (Kimmel et al., 1995; Şişman et al., 2007; Şişman and Geyikoğlu, 2008; Veldman and Lin, 2008; Roper and Tanguay, 2018; Khan and Alhewairini, 2018; Cassar et al., 2020; Aksakal et al., 2020). Zebra balığının önemli bir omurgalı model organizma olma özelliği çok sayıda yavru verebilmesi, hızlı embriyo gelişimi ve insanlara olan genetik benzerliğidir (%70) (d'Amora and Giordani, 2018). Üstelik zebra balığı larvaları hızlı nöronal gelişime gösterirler. Öyleki döllenmeden sonraki 4. gündeki(dpf) zebra balığı larvaları tüm nöronal hücre gruplarına sahiptirler (Kalueff et al., 2014; Peterson and Fishman, 2011; Schmidt et al., 2013).

Zebra balıklarının ayrıca nöroanatomik yapısı, nöron hücre morfolojisi ve sinirsel bağlantıları memelilere oldukça benzemektedir (Geisler et al., 2017). 4R kuralı için sorun oluşturmazlar (Geisler et al., 2017). Döllenmeden sonraki 120 ve 144 saatlik (hpf) larvalarda ergine ait birçok fizyolojik süreçler neredeyse tamamlanmıştır. Davranış özellikleri ile ilgili olarak zebra balığı larvaları (96 saatlik) farklı uyaranlara karşı koordineli davranışlar sergileyebilir. Özellikle 120 hpf larvaları henüz dış beslek olmadıklarından etik açıdan (EU 2010/63/EU) sorun oluşturmazlar (Strahle et al., 2012). Yeni ilaçların kullanım potansiyeli de bu balıklar üzerinde araştırılmaktadır. Ağrı, sedasyon, tümör metastazı, kalp ve damar sistemi

araştırmaları, barsak hareketliliği gibi hücre kültürlerinde basitçe erişilemeyen fenotipik özellikler bu balık türünün embriyolarında rahatlıkla çalışılabilmektedir (Rosa et al., 2022). Zebra balığı embriyo ve larvaları bu özellikleri nedeniyle nörolojik (Saint-Amant and Drapeau, 1998) ve toksikolojik çalışmalar için oldukça uygun model organizmalardır.

SK'lerin güçlü psikoaktif etkileri olup, morfin ve esrar gibi maddelerin alternatifi olarak kullanılan bileşiklerdir. Bu bileşiklerden yeni nesil olanlarının, toksik etkileri hakkında detaylı çalışmalar oldukça sınırlıdır. Üstelik bu bileşiklerin hali hazırda kullanımı Ülkemiz ve Avrupa Birliği ülkelerinde sadece kontrol altında olup; yasaklı maddeler listesinde yer almamaktadır. Bu çalışmada, 2016 yılında Ülkemizden de rapor edilen yeni nesil SK'lerden CUMYL-4CN-BINACA (CUMYL-4CN-BUTINACA veya SGT-78)'nin muhtemel toksik etkileri (nörotoksik ve teratojenik) zebra balığı embriyoları ve larvaları kullanılarak ilk kez araştırılacaktır.

KURAMSAL TEMELLER

Omurgalılarda ve İnsanlarda Embriyonik Gelişim

Omurgalılarda ve insanlarda yeni bir canlının oluşumu, çeşitli aşamalardan oluşan karmaşık bir biyolojik süreçtir. Spermatozoanın, dişi üreme kanalında yumurtayı döllemesiyle başlayan süreç; hücre bölünmesi, hücre farklılaşması, hücre göçü, hücre büyümesi, hücre düzenlenmesi ve programlı hücre ölümü gibi çok sayıda karmaşık biyolojik mekanizmanın ardışık olarak gerçekleşmesiyle yeni bir canlının oluşumunu başlatır. (Carlson, 2013).

Döllenme

Döllenme, genomu bir nesilden diğerine geçiren ve yeni bir organizmanın gelişimini başlatan hücresel mekanizmaların toplamıdır (Primakoff ve Myles, 2002). Döllenmeden önce hem erkek hem dişi gametlerin kapsamlı bir hazırlık aşamasından geçmesi gereklidir (Kota ve Feil, 2010). Erkek üreme hücreleri (sperm) ile dişi üreme hücrelerinin (yumurta), genetik ve fenotipik olarak döllenmeye katılabilecek olgun gametlere dönüşmesini sağlayan, çok aşamalı hücresel farklılaşma süreci 'gametogenez' olarak adlandırılmaktadır (Carlson, 2013).

Döllenme spermatozoanın yumurtayı çevreleyen korona raditaya nüfuz etmesiyle başlar. Spermatozoanın akrozomundan lizin salgılanır, lizin yumurta örtülerini eritir. Memelilerde Hyalurodinaz enzimi zona pellusidayı eritir (Carlson, 2013). Spermatozoanın yumurta hücresine girmesi (penetrasyon), kimyasal bir olaydır ve yaklaşık 20 dakika sürer. Spermatozoa yumurtaya girişi ile oosit mayozu tamamlanır ve ovum oluşur. Döllenme spermatozoanın yumurtaya girmesinden sonra anne ve baba kromozomlarının birbirine karışmasıyla sona erer. Anormal gelişimin (polispermi) oluşmaması için bir başka spermatozoanın yumurtaya girmesi engellenir (Gardner ve diğerleri, 2007; Wassarman ve Litsher, 2008).

Yumurtanın endoplazmik retikulumundan türetilen bir pronükleer membran dişi kromozomal materyalinin etrafında oluşur. Pronükleuslar sperm penetrasyonundan altı ila sekiz saat sonra ortaya çıkar ve yaklaşık on ila on iki saat boyunca kalıcı olurlar. Erkek ve dişi pronükleuslar temas ettiğinde zarları parçalanır ve kromozomlar birbirine karışır. Anneye ve babaya ait kromozomlar, hızlı bir şekilde sentrozomdan türetilen mitotik bir iğ etrafında organize olur. Mitotik bölünmeye hazırlanan sperm tarafından döllenmiş yumurta artık zigot adını alır. Döllenme süreci sırasıyla; korona raditanın penetrasyonu, zona pellusidaya

bağlanma, akrozomal reaksiyon ve zona pellusidanın penetrasyonu, sperm ve yumurtanın bağlanma ve füzyonu, polisperminin önlenmesi, yumurtanın metabolik aktivasyonu, sperm çekirdeğinin yoğunlaşması, yumurta da mayoz bölünmenin tamamlanması, erkek ve dişi prenükleuslarının gelişimi ve füzyonu aşamalarıyla tamamlanmış olur. Döllenme eylemi, yumurtlanmış yumurtayı depresif metabolizmadan kurtarır ve dişi üreme sistemi içinde nihai parçalanmasını önler (Carlson, 2013).

Segmentasyon

Döllenmenin hemen ardından zigot belirgin bir metabolik değişime uğrar ve kısa süre içinde ardışık mitotik bölünmelerle hücre sayısını artırmaya başlar. Çok hücreli bir canlının oluşması için zigotun geçirdiği mitotik bölünmeler segmentasyon olarak adlandırılır (Sadler, 2019; Gilbert ve Barresi, 2020; Carlson, 2013).

Diğer birçok türle karşılaştırıldığında memelilerde segmentasyon oldukça yavaş ilerleyen bir süreçtir ve bölünmeler saatler yerine günler ile ölçülür. Gelişim, ilk iki gün boyunca yaklaşık günde bir bölünme olacak şekilde ilerler. İki hücreli aşamadan sonra memeli bölünmesi eş zamanlı değildir ve seri mitotik bölünmeler geçirir ve oluşan hücrelerin hacmi küçülür. Küçülen bu hücreler, blastomer olarak adlandırılır (Sadler, 2019; Gilbert ve Barresi, 2020; Carlson, 2013). Sekiz hücreli aşamadan sonra plasentalı memelilerin embriyoları, sıkışma adı verilen bir aşamaya girer; bu sırada tek tek dış blastomerler, boşluk ve sıkı bağlantı noktaları yoluyla sıkı bir şekilde yapışır ve yüzeyden bakıldığında bireysel kimliklerini kaybederler (Dard ve diğerleri, 2008; Fleming, 1987).

Embriyonun yaklaşık 16 hücreden oluştuğu yapı morula olarak adlandırılır. Morula, Latince'de "dut" anlamına gelen morum kelimesinden türetilmiştir ve embriyonun bu evredeki görünümünü tanımlar. Bu aşamada, embriyo hâlâ zona pellucida adı verilen glikoprotein yapılı koruyucu tabaka ile çevrilidir. Morula evresinde yer alan hücreler (blastomerler), kompaktlaşma adı verilen süreç aracılığıyla birbirlerine daha sıkı şekilde bağlanır. Ardından hücreler kenarlara doğru yer değiştirerek merkezi bir boşluk oluşturur; bu boşluk blastosöl olarak adlandırılır ve bu yapısal dönüşümle birlikte embriyo blastula (memelilerde blastosist) evresine geçer (Sadler, 2019; Gilbert ve Barresi, 2020; Carlson, 2013).

Döllenmeden yaklaşık dört gün sonra içi sıvı dolu tek sıra hücrelerle çevrilmış küre şeklindeki blastosist olarak adlandırılan yapı meydana gelir. Blastosistin sıvı dolu boşluk kısmı blastosöl (blastokist boşluğu), blastosölü çeviren tabakada trofoblast hücrelerini oluşturur (Sadler, 2019; Gilbert ve Barresi, 2020; Carlson, 2013).

Zona pellucida ile çevrili olan blastosist aşamasındaki embriyo iki tip hücreden oluşur. Merkeze konumlanmış iç hücre kütlesi (ICM; Fleming, 1987) ve küçük bir iç hücre grubunu çevreleyen bir dış epitel tabakası (trofoblast). İki hücreli ve dört hücreli aşamadaki her blastomer, hem iç hücre kütesine hem de trofoblast hücrelere katkıda bulunur (Gardner, 1983).

Blastosistin iç hücre kütesini içeren ucu embriyonik kutup (embriyoblast) olarak, karşı ucu ise ambryonik kutup (trophoblast) olarak adlandırılır. Bu iki hücre tipinin görünümü embriyo içinde meydana gelen büyük organizasyonel değişiklikleri yansıtır. İç hücre kütesinin hücreleri çeşitli ekstraembriyonik yapılara ek olarak embriyonun gövdesini de oluştururken, trofoblast hücreleri plasentanın dış katmanları da dâhil olmak üzere yalnızca ekstraembriyonik yapıları oluşturur. Ekstraembriyonik membran, epiblast ile birlikte amniyon kesesini ve hipoblast ile birlikte de yolk kesesini oluşturur (Doss ve Sneddon, 2019).

İmplantasyon

İnsanlarda implantasyon (rahme yerleşme), blastosistin endometriyal lümen epitelyumunun apikal yüzeyine temas etmesi (appozisyon) ve bağlanması (adezyonu) ile başlayan ve gebeliğin ilk trimesteri boyunca devam eden kesintisiz bir süreçtir. Bu süreç ekstravilöz trofoblastın (plasentayı oluşturan hücre tabakasının bir türü) maternal damar sistemine ulaşması ve bu damarları yeniden şekillendirmesiyle sürer (Richards ve Pangas, 2010).

Yumurtlamadan rahim boşluğuna girişine kadar geçen tüm süre boyunca yumurta ve embriyo, zona pellucida ile çevrilidir (Enders ve Schlafke, 1967). Bu süre zarfında, blastomerlerin ve anne üreme dokularının katkılarıyla zonanın bileşimi değişir. Bu değişiklikler embriyonun taşınmasını ve farklılaşmasını kolaylaştırır. Embriyo rahim boşluğuna ulaştıktan sonra, implantasyona hazırlık amacıyla zona pellucidayı dökmeye başlar. Bu blastosist kuluçkalaması adı verilen bir işlemle gerçekleştirilir. Zona pellucidanın yırtılmasıyla geç blastokist oluşur. Blastokist, endometriumu daima embriyonik kutbu ile tutunur. İmplantasyonun ilk aşaması genişlemiş blastosistin endometrial epitelyuma tutunmasından oluşur. Hormonal olarak şartlandırılmış endometriyal epitel hücrelerinin apikal yüzeyleri çeşitli yapışma moleküllerini (örneğin integrinler) eksprese eder. Buna paralel olarak preimplantasyon blastosistinin trofoblastik hücreleri de yüzeylerinde adezyon molekülleri (integrin) eksprese eder. Blastosist köprü ligandları aracılığıyla endometrial epitelyuma bağlanır. İmplantasyonun bir sonraki aşaması uterus epitelinin penetrasyonudur. Yaklaşık bir gün içinde küçük trofoblastik plakadan gelen sinsityotrofoblastik çıkıntılar bazal laminaya nüfuz etmeye başlar. Erken sinsityotrofoblast oldukça invaziv bir dokudur ve hızlı

bir şekilde genişleyerek endometrial stromaya doğru erozyona uğrar. Blastokist endometriuma gittikçe daha fazla gömülür (Sadler, 2019; Moore ve diğerleri, 2020).

Yedinci günde embriyoblastı oluşturan hücreler iki tabaka göstermeye başlarlar. Bunlar blastokist boşluğuna bakan küçük kübik hücrelerin oluşturduğu hipoblast tabakası ve diğer tarafta prizmatik hücrelerin oluşturduğu epiblast tabakasıdır. Hipoblast ve epiblast hücre tabakalarının oluşturduğu bu iki tabakalı yapıya bilaminer germ disk adı verilir. Ortaya çıkan iki katmanlı embriyonik diskin oluşumu ile ilkel dorsal ve ventral eksen belirlenmiş olur. Epiblast embriyonun dorsal kısmında bulunurken, hipoblast embriyonun ventral kısmında bulunur (Schoenwolf, 2015; Fehrenbach ve Popowics, 2020).

Erken embriyo hala endometriuma batarken (döllenmeden yaklaşık dokuz gün sonra), hipoblast hücreleri yayılmaya başlar ve sitotrofoblastın iç yüzeyini parietal endoderm adı verilen sürekli bir ekstraembriyonik endoderm tabakasıyla kaplar. Endodermal yayılım tamamlandığında birincil yolk kesesi adı verilen bir kesecik şekillenir. Bu nokta da (döllenmeden yaklaşık on gün sonra) embriyo kompleksi ventral yüzeyindeki primer yolksac ile dorsal yüzeyindeki amniyotik kavite arasında yer alan çift katmanlı germ diskini oluşturur. Döllenmeden 10 ila 12 gün sonra embriyo tamamen endometriuma gömülür. Endometrial stromadaki lökositlerden salgılanan interlökin-2 maddesi embriyonun anne tarafından yabancı olarak algılanmasını ve hücrel immün reaksiyon geliştirilmesini engeller (Murata ve diğerleri, 2021; Foyle ve diğerleri, 2024).

Embriyonun uterus astarına implantasyonu; genişlemiş (yumurtadan çıkmış) blastosistin endometrial epitelyuma yerleştirilmesi, uterus epitelinin penetrasyonu, epitelyumun altındaki dokulara istila ve annenin vasküler desteğinin erozyonu gibi aşamaları içerir (Carlson, 2013).

Döllenmeden yaklaşık on iki gün sonra başka bir ekstraembriyonik doku olan ekstraembriyonik mezoderm ortaya çıkmaya başlar (Moore ve Persaud, 2016). Hipoblastlardan ve ekstraembriyonik endoderminden köken aldığı düşünülen bu hücreler, amniyon zarı ve primitif yolk kesesinin dışında gevşek bir bağ dokusu oluştururlar. Bu bağ dokuya ekstraembriyonik mezoderm denilmektedir. Bu hücreler daha sonra ilkel çizgiden köken alan ekstraembriyonik mezodermal hücrelerle birleşir. Ekstraembriyonik mezoderm trofoblastik dokulardan kaynaklanan amniyon ve yolk kesesi epitelinin ve koryon villusunu destekleyen doku haline gelmektedir. Ekstraembriyonik mezoderm tarafından sağlanan destek, sadece mekanik değil, aynı zamanda trofiktir çünkü mezoderm, kan damarlarının çeşitli epitelyumlara oksijen ve besin sağladığı substrat görevi görmektedir (Carlson, 2013).

Gastrulasyon

Gebeliğin üçüncü haftası başladığında embriyo gastrulasyon olarak adlandırılan periyoda girer. Gastrulasyon iki tabakalı embriyonik diskin (bilaminer disk), üç tabakalı embriyonik diske (trilaminer disk) dönüşmesiyle başlar (Şeftalioğlu, 1998; Tam, 1997). Bu dönemdeki embriyoya gastrula adı verilir (Selçukbiricik, 2007). Bu evrede primitif çizgi, notokord ve üç germ tabakası (endoderm, mezoderm, ektoderm) gelişir (Ohta, 2007; Carlson, 2013).

Gastrulasyon, embriyonun arka bölgesindeki epiblasttan türetilen hücrelerin, o bölgedeki embriyonik diskin kenarındaki hücrelerin indüksiyonu yoluyla doğrusal bir orta hat yoğunlaşması olan ilkel çizginin oluşumuyla başlar (Bellairs, 1986; Vakaet, 1984; Stern, 1990; Şeftalioğlu, 1998). İlkel çizgi, epiblast hücrelerinin iyi tanımlanmış bir uzaysal ve zamansal sırayla birleştiği bölgedir. Epiblast hücreleri ilkel çizgiye ulaştıkça şekil değiştirirler ve epiblastın altında (ventralde) yeni katmanlar oluşturmak üzere bu çizginin içinden geçerler. Primitif çizgi oluştuktan sonra, embriyonun kranial ve kaudal uçları ile dorsal ve ventral yüzlerini belirlemek kolaylaşır. Bu süreç, embriyonik eksenlerin ve temel morfolojik yapılarının ortaya çıkmasını sağlar ve embriyonun ilerleyen gelişim aşamalarında doku ve organların doğru pozisyonlarda yerleşmesini mümkün kılar (Şeftalioğlu, 1998).

Hücrelerin ilkel çizgi boyunca hareketi, ilkel çizginin orta çizgisi boyunca bir oluğun (ilkel oluk) oluşmasıyla sonuçlanır. İlkel çizginin ön ucunda, ilkel düğüm veya Hensen düğümü adı verilen küçük ama iyi tanımlanmış bir hücre birikimi bulunur (Hensen, 1876). Bu yapı, embriyonun ana arka sinyal merkezi olmasının yanı sıra, hücrelerin embriyonun ön ucuna doğru bir akış halinde göç ettiği alandır çünkü gelişim açısından büyük öneme sahiptir (Wittler ve Kessel, 2004). Mezoderm adı verilen bu hücreler kısa sürede çubuk benzeri bir mezodermal notokord oluşturan bağırsağın endodermal sırt duvarına ayrılır. Endoderm için ön bağırsağın endodermine yönelik olan epiblast türevli hücreler, ilk olarak bu aşamada endodermal tabakada ortaya çıkar (Lawson ve ark., 1986).

Gastrulasyon sırasında bilaminer embriyonun kaudal ucundaki epiblastta ilkel bir çizgi oluşur (Bellairs, 1986; Eyal-Gilardi ve ark., 1991; Vakaet, 1984, Stern, 1990). İlkel çizgi boyunca göç eden hücreler mezoderm ve endodermi oluşturur ve geri kalan epiblast ektoderm haline gelir. Her üç germ tabakası da epiblasttan köken almaktadır (Ohta, 2007).

Notokord, ilkel düğümden geçen hücrelerden şekil alırken önemli bir sinyal merkezi haline gelir. İnsanlarda anterior sinyallemenin anterior hipoblastla mı (ön visseral endoderm), yoksa prekordal plakla mı, yoksa her ikisiyle mi sınırlı olduğu henüz belirlenmemiştir. Notokord fonksiyonunun başlatılması için Foxa-2 gereklidir. Yokluğunda notokord ve nöral

tüpün taban plakası oluşamaz. Buna karşılık endoderm ilkel çizgi ve ara mezoderm gelişir. Notokord, erken embriyoda gövdenin önemli bir aksiyal sinyal merkezidir ve birçok aksiyal yapının oluşumunda önemlidir. Embriyonun merkezi sinir sisteminin hemen ventralinde uzunlamasına uzanan hücrel bir çubuktur. Filogenetik ve ontogenetik olarak vücut için orijinal uzunlamasına destek görevi görsede notokord aynı zamanda uzmanlaşmamış embriyonik hücreleri kesin doku ve organlara dönüştüren bir dizi sinyalleme bölümünde (indüksiyonlar) birincil hareket ettirici olarak da önemli bir rol oynar. Özellikle notokorddan gelen indüktif sinyaller yüzeydeki ektodermin nöral dokuya dönüşümünü uyarır, erken sinir sistemi içindeki belirli hücrelerin (taban plakası) kimliğini belirler, somitlerin belirli mezodermal hücrelerini omurga gövdelerine dönüştürür ve dorsal pankreasın gelişimindeki en erken adımları teşvik eder (Carlson, 2013).

Notokordun kranialinde, herhangi bir mezodermin bulunmadığı embriyonik ektoderm ve endodermin bitişik olduğu küçük bir bölge vardır. Orofaringeal membran adı verilen bu yapı, gelecekteki ağız boşluğunun yerini işaret eder. Embriyonun bu bölgesi baş ve boyun bölgesinin erken gelişimi için kritik öneme sahiptir ve bu yapı gastrulasyonun ilerleyen aşamalarında birincil ağız boşluğunun oluşmasına zemin hazırlar (Wilson ve diğerleri, 2009; Stemple, 2005).

Döllenmeden yaklaşık on sekiz gün sonra ilkel çizgi kaudal olarak geriler. Ardından notokordu uzatır. Bu süre zarfında epiblasttan primitif oluğa doğru göç eden hücreler aracılığıyla mezoderm oluşmaya devam eder. İlkel çizginin gerilemesine, somitlere, gövdenin ve vücudun kaudal bölgelerinin segmental aksel yapılarına yol açan paraksiyel mezodermin oluşumu ve desenlenmesi eşlik eder (Wilson ve diğerleri, 2009; Stemple, 2005).

Notokordal sürecin kranyal ucu ile orofaringeal membran arasında, prekordal plak adı verilen, endoderm ile yakından ilişkili küçük bir mezodermal hücre topluluğu bulunur (Müller ve O’Rahiliy, 1987; Müller ve O’Rahiliy, 2003; Wilson ve diğerleri, 2009). Ön beyin oluşumunu uyarmada etkili olan moleküler sinyaller yayar. Hem prekordal plaka hem de notokord ilkel düğüm içindeki ilkel çizgi kökenli diğer hücrelere katılan epiblastik hücrelerin apoptasyonunun içeri girmesinden kaynaklanır. İlkel çizgi geriledikçe, önce prekord plakasının ve ardından notokordun hücrel öncülleri düğümden rostral olarak göç eder, ancak gerileyen ilkel çizginin ardından hücrelerin çubuk benzeri bir toplanması olarak geride kalır (Wilson ve diğerleri, 2009; Stemple, 2005; Carlson, 2013).

Embriyonun nöral indüksiyona verdiği ilk belirgin morfolojik tepki, notokordal çıkıntının üzerinde yer alan dorsal ektodermin, nöral plak adı verilen kalınlaşmış epitel hücrelerinden oluşan uzun bir parçaya dönüşmesidir. Burası sinir kretinin bulunduğu bölgedir.

Nöral plağın oluşumuyla birlikte ektodermal germ tabakası iki gelişimsel soya bölünür: nöral ve nöral olmayan (Moore ve diğerleri, 2016).

Mezodermal hücreler primitif çizgiyi geçtikten sonra, sürekli bir mezenkimal hücre tabakası halinde ektoderm ve endoderm arasında yanal olarak yayılır (Gilbert, 2010; Wilson ve diğerleri, 2009; Stemple, 2005). Daha sonra kesit alınan embriyoların mezoderminde üç bölge tanınabilir. Nöral tüpün en yakınında paraksiyal mezoderm veya segmental plaka olarak bilinen kalınlaşmış mezenkimal hücre sütunu bulunur. Bu doku kısa sürede somitler halinde organize olur. Paraksiyal mezodermin lateralinde, sonuçta ürogenital sisteme yol açan kompakt bir ara mezoderm bölgesi bulunur. Bunun ötesinde yan plaka mezodermi sonuçta iki katmana ayrılır ve vücut duvarı, sindirim sistemi duvarı ve uzuvların dokularının büyük kısmını oluşturur (Gilbert ve Barresi, 2020).

Gastrulasyon zamanına kadar embriyo iki taraflı simetriktir. Gastrulasyonun sonuna doğru (McGrath ve diğerleri, 2003), kalbin sağ tarafa dönmesine, ardından bağırsağın asimetric dönmesine, karaciğer ve dalağın asimetric konumlandırılmasına, akciğerlerin lobasyonuna yol açan mekanizmalar devreye girer. Embriyonik dönüşün altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır (Constam ve Robertson, 2000). Memeli embriyolarında asimetrinin bilinen en eski belirtisi, ilkel düğüm etrafındaki silyaların atmasını içerir. Lateral mezodermdaki düğümün sol taraflı ifadesi, tüm omurgalılarda sol-sağ asimetrisinin belirlenmesinde bir ortak nokta gibi görünse de, daha önceki (yukarı doğru) moleküler olaylar omurgalı sınıfları arasında farklılık gösterir (Levin, 2005).

Somitlerin gelişimi

Somitler, eksenel yapıların, nöral tüpün ve notokordun her iki tarafında paraaksiyel mezodermda oluşan segmental birimlerdir. Mezenkimal bir çekirdeği, somitocoel hücrelerini çevreleyen bir epitel duvarından oluşurlar (Christ ve Ordahl, 1995). Somitomer adı verilen bu bölümler ilk olarak kuş embriyolarında incelenmiştir (Williams, 1910; Christ ve ark., 2004), ancak memelilerde de bulunurlar. Erken somitin, hücreleri belirleyen ve gövdenin ve uzuvların lokomotor aparatının önemli dokularını oluşturan bitişik yapılardan yayılan sinyallerin etkisi altında adım adım spesifikasyonu gerçekleşen pluripotent hücrelerden oluştuğu gösterilmiştir (Jacob ve diğerleri, 1974; Christ ve ark., 1992; Ordahl ve Le Douarin, 1992; Aoyama, 1993). Somitlerin olgunlaşması sırasında meydana gelen hücre çeşitlenmesine ek olarak, somitler, embriyonik vücut duvarı içinde vertebral kolonun, kaburgaların, kasların, tendonların, bağların, dorsal kök gangliyonlarının, periferik sinirlerin ve kan damarlarının segmental düzenlenmesini oluşturan metamerik bir model oluşturur (Christ ve diğerleri, 1972,

1979b, 1998). Bu yapıların metamerizmi ve fonksiyonel ilişkisi, omurgalı gövdesinin eğilme ve dönme hareketlerini yapabilme yeteneğinin ön koşuludur.

Embriyonun kaudal ucuna doğru gerilerken ilkel düğüm boyunca yeni somitomer çiftleri oluşur. Somitler embriyonun arka ucundaki kaudal nöral tüpün her iki yanında yer alan presomitik mezoderm adı verilen iki mezenkimal doku çubuğunun ön ucundan çiftler halinde aşamalı olarak sıkıştırılır (Dequeant ve Pourquie, 2008). Neredeyse 20 çift somitomer oluşana ve ilkel düğüm kaudale doğru oldukça gerileyene kadar yedinci somitomer çiftinin arkasında ilk somit çifti (tuğla şeklindeki paraksiyel mezoderm kitleleri) oluşmaz. Kranial somitomerler (açık daireler), yedi çift oluşana kadar Hensen düğümü boyunca şekillenir. Kaudalden yedinci somitomer kadar, kaudal somitomerlerden (ovaler), somitler (dikdörtgenler) oluşur. Kaudal somitomerlerin en ön kısmı somitlere dönüşürken, arka tarafta ilave kaudal somitomerler şekillenir. Önde somitlere dönüşüm ile arkada yeni oluşum arasındaki denge bir süreliğine kaudal somitomer sayısını 11'de tutar (Carlson, 2013).

İlk somit çifti oluşuktan sonra (döllenme olduktan yaklaşık yirmi gün sonra) ilkel çizginin gerilemesi ile ek somit ve somitomerlerin oluşumu arasında düzenli bir ilişki gelişir. Kranial bölgedeki ilk yedi çift somitomer daha fazla ayrılma veya segmentasyona uğramaz. Bu somitomerlerden (kranyal mezoderm) gelen hücreler kafanın iskelet kas sisteminin çoğunu oluşturacaktır ve gövdedeki somitlerden türetilenlerden oldukça farklı hücresel ve moleküler özelliklere sahiptirler. Bu güne kadar incelenen embriyo türlerinde en kaudaldeki kesin somit çifti ile bunların arkasında gösterilebilen somitomer sayısı (genellikle 10 ila 11) arasında sabit bir ilişki vardır. Her birkaç saatte, son oluşan somitlerin kaudalinde bulunan somitomer çifti, yeni bir somit çiftine dönüşür ve ilkel düğümün yakınındaki paraksiyel mezodermin kaudal ucunda yeni bir somitomer çifti yerleştirilir. İlkel çizginin gerilemesi sona erdiğinde, kuyruk tomurcuğunun katkıda bulunduğu hücreler aracılığıyla paraksiyel mezoderm oluşumu devam eder. Servikal, torasik ve lomber omurlar ve ilgili yapılar ilkel çizgi boyunca göç eden hücrelerden türetilirken, sakrum ve kuyruk sokumunun hücresel öncüleri kuyruk tomurcuğundan gelir. Görünüşte homojen bir paraksiyel mezoderm şeridinden bireysel somitlerin oluşumu çeşitli seviyelerde moleküler kontrol ve paraksiyel mezoderm içindeki hücresel davranıştaki değişiklikleri içeren karmaşık bir süreçtir. Somitogenez (somit oluşumu) hakkındaki temel anlayışımız civciv üzerinde yapılan çalışmalardan gelmektedir. Somitogenezdeki ilk önemli adım paraksiyel mezodermin segmentasyonudur. Arka beyindeki segmentasyonun tersine somit oluşumu, kraniyokaudal bir dizide yeni bölümlerin ardışık olarak eklenmesiyle meydana gelir. Somitogenez genellikle saat ve dalga cephesi modeli olarak adlandırılan iki mekanizmayı içerir. İlk adım (dalga cephesi), ilkel çizginin en arka

segmentsiz kısımdaki mezenkimal hücrelerin proliferatif aktivitesi yoluyla vücudun kaudal ucunun uzamasıyla ilişkilidir. Bu bölgedeki hücreler yüksek düzeydeki etki altında aktif olarak bölünürler. Epitelyal somit hücreleri, apikal yüzeyleri küçük bir merkezi lümeni, somitoseli (birkaç çekirdek hücre içeren) çevreleyecek ve dış bazal yüzeyleri (laminin, fibronektin ve hücre dışı matrisin diğer bileşenlerini içeren) bir bazal lamina ile çevrelenecek şekilde düzenlenmiştir (Carlson, 2013; Gilbert ve Barresi, 2020).

Nörülasyon

Dorsal ektodermal hücrelerin birincil indüksiyona yanıtı kalınlaşmak ve böylece bir nöral plaka oluşturmaktır. Nörülasyon bir nöral oluk oluşturacak şekilde nöral plakanın menteşe noktalarında yanal olarak katlanmasından oluşur. Nöral oluğun kalınlaşmış epitelinin karşılıklı kenarları bir nöral tüp oluşturmak üzere birleşir (Schoenwolf ve Smith, 1990; Le Douarin ve Kalcheim, 1999). Nöral tüpün geçici olarak kapatılmayan kranial ve kaudal uçları ön ve arka nöroporlardır (Schoenwolf ve Larsen, 2009). Kranial olarak nöral tüp prosensefalon, mezensefalon ve eşkenar dörtgenden oluşan ilkel üç parçalı bir beyne bölünür (Carlson, 2013). Erken beynin kaudal kısmı da nöromer adı verilen bölümlere ayrılır; eşkenar dörtgenler en belirgin olanlardır. Spesifik homeobox genleri eşkenar dörtgenlerde düzenli bir sırayla ifade edilir. (Gendron-Maguire ve diğerleri, 1993; Rijli ve ark., 1993; Graham ve diğerleri, 2004). Orta beyin ve arka beyin kavşağında yer alan istmik düzenleyici olan sinyal merkezi, önde Wnt-1 ve arkada FGF-8 üretimi yoluyla etki eder (Puelles, L., 2018).

Nöral tüp kapandığında, nöral tepe hücreleri nöral epitelden göç eder ve iyi tanımlanmış yollar boyunca vücuda yayılır. Kranial bölgedeki ektoderm üzerine etki eden sekonder indüksiyonlar, duyu organlarının ve kranial sinirlerin duysal ganglionlarının öncüleri olan birkaç dizi ektodermal plakodun oluşumuyla sonuçlanır (Anderson, 2000; Aybar ve Mayor, 2002; Billon, 2007; Carlson, 2019).

Embriyonik mezoderm gelişimin erken aşamalarında üç kraniyokaudal sütuna bölünmüştür: paraksiyal, orta ve yan plaka mezodermi. Paraksiyel mezoderm eşleştirilmiş somitlerin ve somitomerlerin öncü dokusudur (Keller, 2005). Paraksiyal mezoderm somitlere bölünmesi, c-tüylü ve çeşitli aşağı akışlı moleküllerin periyodik ifadesine yol açan bir saat mekanizmasının etkisiyle gerçekleşir (Schröter et al., 2009). Bu biyolojik saat, segmentasyonun doğruluğunu ve organizmanın gelişimindeki segmental yapılarının doğru şekilde oluşmasını sağlamak açısından büyük öneme sahiptir (Aulehla et al., 2003).

Çok sayıda sinyal molekülünü içeren karmaşık bir dizi endüktif etkileşimin sonucu olarak, epitelyal somitler, sklerotomlara (omur gövdelerinin öncüleri) ve dermatomları

(dermal öncüller) ve miyotomları (aksiyal kasların öncüleri) oluşturan dermomyotomlara bölünür. Daha sonraki alt bölümlerde, ekstremité kaslarının öncü hücreleri somitlerin yan yarılarında bulunur ve eksenel kasların öncü hücreleri orta yarılarda bulunur. Bisklerotomun arka yarısı, bir sonraki kaudal somitin ön yarısı ile birleşerek tek bir vertebral gövde oluşturur (Christ ve Ordahl, 1995; Brent ve Tabin, 2002).

Organogenezis

Gebeliğin dördüncü haftasının sonuna gelindiğinde, henüz sadece 4 mm uzunluğunda olan embriyo, (hala mevcut olmayan) uzuvlar ve (gelişmiş olan) ürogenital sistem dışındaki ana organ sistemlerinin çoğunun temellerini oluşturmuştur. Dışarıdan embriyo C şeklindedir ve nöral tüpün her iki yanında belirgin bir dizi somit yer alır (Sadler, 2012; Moore ve diğerleri, 2020; Carlson, 2013). Göz ve kulakların gelişimi ve parçalanmaya başlayan orofaringeal membran dışında kafa nispeten özelliksizdir. Servikal bölgede faringeal arkuslar belirgindir. Vücut sapı hala ventral vücut duvarının önemli bir bölümünü kaplar ve vücut sapına göre baş olan kalp ve karaciğer, ventral vücut duvarının hatlarında belirgin çıkıntılar oluşturur (Carlson, 2013).

4 haftalık bir embriyoda dolaşım sistemi, çalışan iki odacıklı bir kalp ve üç dolaşım yayından oluşan bir kan damar sistemi içerir. İntraembriyonik dolaşımın yanı sıra, yolk kesesini besleyen ekstraembriyonik vitellin dolaşım arkı ve allantois ile ilişkili olan ve plasentayı besleyen göbek dolaşımında mevcuttur (Carlson, 2013). Kan hücreleri ve kan damarları başlangıçta yumurta sarısı kesesinin mezodermal duvarında bulunan kan adacıklarından oluşur. Orofaringeal membranın önündeki at nalı şeklindeki splanknik mezoderm bölgesinden çıkan kalp, ön bağırsağın her iki yanında iki tüp oluşturur. Ön bağırsak şekillenirken, iki kalp tüpü (Kelly ve ark., 2001) bir araya gelerek tek bir tüp şeklinde kalp oluşturur ve bu kalp döllenmeden yaklaşık 22 gün sonra atmaya başlar (O'Rahilly ve Müller, 2010; Sadler, 2011; Moore ve Persaud, 2015; Bhat ve Palaniappan, 2006; Hiruma, 2017; Carlson, 2013).

Embriyonik endoderm, embriyonun gelişiminin erken aşamalarında, başlangıçta yumurta sarısı kesesinin mezodermal duvarından türetilir. Bu süreç, embriyonun gelişiminde kritik bir rol oynar çünkü endoderm, tüm iç organların (sindirim sistemi, solunum sistemi, karaciğer, pankreas, vb.) temel yapı taşlarını oluşturur (Lescroart et al., 2014). Embriyo, yanal katlanmaya başladıkça endodermal bağırsak, kranyal ve kaudal tüpler şeklinde şekillenir ve bu tüpler ön bağırsak ve arka bağırsak olarak adlandırılır. Bu tüpler, karın bölgesinin ortasında birleştirilir. Ancak orta bölge yani orta bağırsak, başlangıçta ventral olarak yumurta

sarısı kesesine açık kalır. Bu açıklık bağırsakların şekillenmesinde ve içyapılarının doğru yerleşiminde kritik bir rol oynar (Keller, 2005).

Boru şeklindeki bağırsak yapısı gelişmeye devam ederken, yumurta sarısı kesesi ile olan bağlantı giderek zayıflar ve bu bağlantı yumurta sarısı sapı (yolk stalk) olarak bilinen yapıyı oluşturur. Bu aşamada, gelecekteki ağız (stomodeum), orofaringeal membran ile ön bağırsak arasında ayrılır. Ayrıca, arka bağırsak, kloakal plaka ile proktodeum arasında ayrılmaya başlar. Bu süreç, bağırsakların doğru şekilde segmental olarak ayrılmasında önemli bir adımdır (Spemann ve Mangold, 1924).

Bağırsakların bu şekillenme sürecinde, arka bağırsak bir adaptasyon olarak allantois gelişimini başlatır. Allantois, birçok hayvanda idrar ve solunum atıklarının vücuttan uzaklaştırılması için önemli bir yapıdır ve bu özellik, hayvanın embriyonik gelişimi sırasında atık yönetimi açısından önemli bir rol oynar (Smith, 2003). Allantois, ayrıca, plasenta ile ilişkili olan göbek kordonu yapısının gelişiminde de önemli bir rol oynar (Jacobsen et al., 2005).

Orta mezoderm, ürogenital sistemin organlarını oluşturmak için temel bir yapıdır. Lateral plaka mezodermi, somatik mezoderm ve splanknik mezoderm olmak üzere iki ana bölümde ayrılır. Somatik mezoderm, ektoderm ile ilişkili iken, splanknik mezoderm endodermle ilişkili olur. Bu iki bölge arasındaki boşluk, sölom adı verilen bir yapıyı oluşturur ve bu yapı, vücut boşluğunun çeşitli organları tarafından çevrelenen bir alan olarak önemli bir rol oynar (Gilbert, 2006).

Ekstremité tomurcukları, lateral plaka mezoderminden türetilir ve vücuda uzanacak olan organların, özellikle de bacak ve kolların gelişimi için önemlidir. Ayrıca, ekstraembriyonik mezoderm de gelişen vücut yapılarının çoğunu oluşturur. Özellikle vücut sapı ve plasental yapılarla ilgili olan bölümleri oluşturur. Ekstraembriyonik mezoderm, embriyo gelişiminde önemli bir rol oynayan yapılar arasındadır (Carlson, 2013; Smith ve Storch, 2014).

Teratojenite

Teratoloji embriyonik ve fetal dönemde meydana gelen anormal gelişimlerin sebeplerini, mekanizmasını, ortaya çıkan yapısal ve işlevsel anormallikleri, inceleyen bilim dalıdır. Teratoloji genetik çevresel ve biyolojik faktörlerin embriyonun gelişimindeki anormalliklere yol açan etkilerini araştırarak, sağlık üzerindeki potansiyel olumsuz sonuçları anlamaya yönelik önemli bilgiler sağlar (Jones ve Smith, 1975; Wilson, 2005).

Embriyonik gelişim döneminde maruz kalınan teratojenik maddeler, kimyasallar, biyolojik faktörler (enfeksiyonlar), fiziksel faktörler ve ilaçları kapsar. Bu maddeler, plasentadan fetüse geçerek normal gelişimi engelleyebilir veya şekil ve gelişim bozukluklarına neden olabilir. Teratojenik maddelerin embriyonik gelişimdeki olumsuz etkilerine teratojenite adı verilmektedir. Teratojenler fetüsün morfolojik ve fonksiyonel gelişiminde anormalliklere yol açarak, doğum kusurlarının ortaya çıkmasına neden olabilir (Wilson, 2005; Moore ve Persaud, 2009).

Teratojenik maddelere gebeliğin hangi döneminde, ne kadar süreyle ve hangi dozlarda maruz kalındığı önemlidir. Organogenez aşamasındaki bir embriyoda teratojenik hassasiyet maksimum düzeye ulaşır. Çoğu ilaç plasentadan pasif difüzyonla fetüse geçmesine rağmen teratojenik etki göstermez. Teratojenik etki bu ilaçların metabolitleri nedeniyle ortaya çıkmaktadır (Kayaalp, 2002).

Nörotoksisite

Ulusal Araştırma Konseyi ve Çevre Koruma Ajansına göre nörogelişimsel toksisite; kimyasal, biyolojik veya fiziksel faktörlere maruz kalmanın neden olduğu sinir sistemi işlevi veya yapısındaki olumsuz değişiklikleri ifade etmektedir. (Kanungo vd., 2014). Nörogelişimsel bozuklukların ve sakatlıkların yaklaşık %3'ünün nöronal hasara yol açabilen nörotoksinlere maruz kalmaktan kaynaklandığı tahmin edilmektedir (Connors vd., 2008; Homberg vd., 2016; Vargas and Ponce Canchihuamán, 2017).

Sentetik Uyuşturucular

Psikoaktif maddeler, merkezi sinir sisteminde etkisini gösteren beynin işlevlerini değiştirerek algıda, bilinçte, ruh hâlinde, motor işlevlerde ve davranışlarda birtakım değişikliklere sebebiyet veren kimyasal maddelerdir (Aşıcıoğlu, 2013; TUBİM, 2014). Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımlamasına göre psikoaktif maddeler normal sağlığın sürdürülmesi için gerekli olmayan ve yaşayan bir organizma tarafından alındığında bu organizmanın bir veya daha fazla işlevini değiştirme özellikleri olan maddelerdir (WHO, 2010).

SK'ler, kannabinoid reseptörlerine spesifik bir afinite gösteren yeni psikoaktif maddeler olarak adlandırılan maddelerdir (Abbate ve diğerleri, 2018). SK'ler, esrarın temel psikoaktif bileşeni olan THC'nin etkilerini kimyasal olarak taklit etmek üzere tasarlanmış geniş bir psikoaktif madde grubunu içerir (Castaneto ve diğerleri, 2014; Fattore ve Fratta, 2011). SK'ler, merkezi sinir sistemindeki kannabinoid bağlayıcı reseptörler olan CB1 ve CB2 ile aynı anda etkileşime girme özelliğine sahiptirler (Winstock and Barratt, 2013). Zihin değiştirici etkisi kabul edilen ve doğal gibi davranan kannabinoidlerdir (Cohen ve Wein Stein,

2018). Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi Dünya Uyuşturucu Raporu (2015), SK'lerin tüm yeni psikoaktif maddelerin %39'unu temsil ettiğini belirtmiştir (Birleşmiş Milletler, 2016).

Kullanıcılar arasında "sentetik mariuana" ya da “yalancı ot” olarak da adlandırılabilen SK, Avrupa ve Amerika Birleşik Devletlerinde Spice, K2, Genie; Türkiye’de ise “Bonzai, Jamaica ve Jamaican Gold” ismiyle bilinmektedir (Yargıç, 2013). Vaka raporları incelendiği zaman SK’lerin rektal veya parenteral uygulama yollarının kullanılmadığı, bunun yerine inhalasyon ve oral kullanımın olduğu belirtilmiştir (Seely et al., 2012). Sigara gibi içildikleride kolayca buharlaşırlar ve farmakolojik etkilerini daha hızlı gösterirler. Bundan dolayı kullanıcılar tarafından bu kullanım yolu daha çok tercih edilir (Weaver et al., 2015).

Madde kullanıcıları arasında her geçen gün kullanımı artan ‘designer drugs’ olarak tanımlanan SK’ler, genellikle saf formda olmak üzere katı veya yağ halinde bulunabilmektedir (Gurdal ve ark., 2013; Liechti, 2015).

SK paketleri, farklı kimyasal kategorilerden SK’ler içerir ve bunların bileşimleri sürekli olarak değiştirilir. Farklı zaman dilimlerinde üretilen aynı ürünün bileşimi, miktarı, hatta aynı ambalajdaki ürünler bile önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Bu paketlerde çeşitli çalışmalarda belirtildiği gibi SK’lerin yanı sıra katkı maddeleri (hizmet maddeleri, yağ asitleri, esterler, benzodiazepinler ve tramadolün aktif metaboliti) bulunmaktadır (Zuba ve ark., 2011; Dresen ve ark., 2010; Castaneto ve ark., 2014).

Δ9-THC'in keşfinden bu yana, kannabinoidler biyomedikal araştırma amaçları için sentezlenmiştir (Seely ve diğerleri, 2011). Bu sentetik türevler, başlangıçta esrarın ve endokannabinoid sistemin etki mekanizmalarını daha iyi anlamak, sağlık üzerindeki etkilerini araştırmak ve yeni terapötik ajanların potansiyelini farmakolojik olarak değerlendirmek amacıyla geliştirilmiştir (Di Marzo ve Petrocellis, 2006; Gerra ve diğerleri, 2010). Özellikle 1990’lı yıllarda tıbbi kullanıma alternatifler oluşturmak ve kannabinoid reseptörlerine bağlanma yerlerini araştırma amacıyla üretilmişlerdir (Bilici, 2014).

SK’ler, başlangıçta inflamatuvar hastalıklar ve kanser ağrısına yönelik potansiyel tedavi seçeneklerini araştırmak ve endojen kannabinoid sistemi araştırmak için farmakolojik problemler olarak geliştirilmiştir (Pertwee, 2006; Castaneto ve ark., 2014). Ağrı kesici etkileri saptanan SK’in, psikoaktif özellikleri esrarla kıyaslandığında çok daha yoğun ve güçlü olduğunun anlaşılması, bu maddelerin kötüye kullanım oranlarında hızlı bir artışa yol açmıştır (Kayaalp ve Uzbay, 2012). Araştırmalarda kullanım amacıyla sentezlenen SK’ler zamanla keyif verici etkilerinden dolayı eğlence amaçlı kullanılmaya başlanmıştır (Shim et al., 2008). Bu

maddelerin kötüye kullanılmaya başlanmasıyla birlikte, hem bağımlılık riski hem de ciddi yan etkiler kamu sağlığı açısından önemli bir sorun haline gelmiştir (Castaneto et al., 2014).

SK'in CBI'ne, esrarla kıyaslandığında yüz kat daha yüksek bir afinite ile bağlandığı gösterilmiştir (Kayaalp ve Uzbay, 2012; Kalyoncu ve diğerleri, 2014). SK'in etki süresi daha uzun ya da daha kısa olabilir, ancak etkinin başlangıcı $\Delta 9$ -THC'e göre hem daha hızlı, hem de daha yoğundur (Beal ve ark., 1995; Pertwee, 1997; Fattore ve Fratta, 2011). Kullanılabilirliği, düşük maliyeti ve standart toksikolojik testlerle saptanmasının nedeniyle SK kullanımı katlanarak artmaktadır (Bilici, 2014). Esrarla karşılaştırıldığında SK'lerde ciddi ve ölümcül zehirlenmelerin daha yaygın olduğu görülmektedir (EUDA, 2017; Tait ve diğerleri, 2016). Zehirlenmenin yanı sıra hızlı bilinç kaybı/koma, kardiyovasküler etkiler (örneğin hipertansiyon, taşikardi, bradikardi, göğüs ağrısı, miyokard enfarktüsü ve felç), nöbetler ve kasılmalar, kusma/hiperemez, deliryum, ajitasyon, psikoz, agresif ve şiddet içeren davranışlar, ani ölümler de bildirilmiştir. Bu toksisitenin mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır (Tai ve Fantegrossi, 2016). Bununla birlikte, toksik etkilerin ortaya çıkmasında rol oynayan muhtemel faktörler, maddelerin gücü ve kullanıcıların maruz kaldığı doz miktarlarıdır.

SK üreticilerinin etki gücünü artırma ve tespitten kaçma çabaları kapsamında, yeni yapısal türevleri baş döndürücü bir hızla ortaya çıkmaktadır ve kolluk kuvvetlerinin bunların dağıtımını izlemesini veya kontrol etmesini son derece zorlaştırmaktadır (Underwood, 2015). Ayrıca, yasal düzenlemelerin gerisinde kalan hızlı kimyasal modifikasyonlar, bu maddelerin denetlenmesini ve saptanmasını daha da zorlaştırmaktadır (Castaneto et al., 2014; EUDA, 2023).

Yeni psikoaktif maddelerin alımıyla ilişkili semptomlar nöbetlere yol açan merkezi sinir sistemi toksisitesinden, akut psikoz, saldırganlık, kardiyotoksosite (örneğin aritmiler) ve sistem arızalarına neden olan karaciğer toksisitesine kadar değişebilir (Kronstrand ve diğerleri, 2018). SK'e bağlı akut zehirlenmelerde, esrarın etkilerinden farklı olarak çok daha uyarıcı ve semptomimetik maddelerin kullanımında görülen yan etkiler benzer şekilde ortaya çıkabilmektedir (Groten hermen, 2003; Cohen ve ark., 2012; Bozkurt, 2014). Bu yan etkiler genellikle terleme, titreme, midriyazis, bulantı, kusma, iştah değişiklikleri, hipertansiyon, hipotansiyon, göğüs ağrısı, taşikardi, bradikardi, solunum depresyonu, konfüzyon, psikomotor ajitasyon, somnolans ve sedasyon gibi belirtileri içermektedir (Zimmermann ve ark., 2009; Cohen ve ark., 2012; Derungs ve ark., 2013).

Ayrıca, SK kullanımı sonrası ortaya çıkan klinik belirtiler, hastaların kullandıkları maddenin içeriği, etken maddesi, miktarı ve saflık derecesine bağlı olarak farklılık gösterebilmekte olup, kullanılan maddenin miktarı, içeriği ve saflık derecesine bağlı olarak da

ciddi entoksikasyon belirtileri ortaya çıkabilmektedir (Brewer ve Collins, 2014; Cohen ve ark., 2012).

SK'ler moleküllerin kimyasal yapılarına göre aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadır; (Gurney et al., 2014; Brents et al., 2014).

1. Klasik kannabinoidler; Tetrahidrokannabinol (THC), esrarın diğer bileşenleri ile yapısal olarak benzer sentetik analogları içerir. Ör: AM411, O-1184, HU-210 ve AM-906.
2. Klasik olmayan kannabinoidler; Sikloheksilfenoller veya 3-arilsikloheksanoller. Ör: CP-55,940, CP-47,497, CP-55,244.
3. Hibrit kannabinoidler; Klasik ve klasik olmayan kannabinoidlerin yapısal özelliklerinin kombinasyonlarıdır. Ör: AM-4030.
4. Aminoalkilindoller (AAIs): Aminoalkilindoller yedi alt gruba ayrılır;
 - a) Fenilasetilindoller. Ör: JWH-251, JWH-250.
 - b) Naftolindoller. Ör: JWH-015, JWH-018, JWH-073, JWH-081, JWH-122, JWH200, JWH- 210, JWH-398.
 - c) Siklopropolindoller. Ör: XLR-11, UR-144.
 - d) Benzolindoller. Ör: AM-694, pravadolin, RSC-4.
 - e) Naftilmetilindoller. Ör: JWH-184.
 - f) İndol karboksamidler. Ör: STS-135, APICA.
 - g) Adamantolindoller. Ör: AM-1248, AB-001.
5. Eikozanoidler; Endokannabinoidler olan anandamid gibi bileşikler ve bu bileşiklerin metanandamid gibi sentetik analogları.
6. Diğerleri; Bu grupta, naftoilpiroller (JWH-307), naftilmetilinden (ör: JWH-176), diarilpirazoller (selektif CB1 antagonisti Rimonabant), indazol karboksamid (ör: APINACA) ve naftalen-1-il-(4-pentoksinaftalen-1-il) metanon gibi diğer yapısal türevler bulunmaktadır.

Birleşmiş Milletler Uyuşturucu ve Suç Ofisi tarafından 2019 yılı Haziran ayı itibarıyla, 111 ülke ve bölge tarafından 911 yeni psikoaktif maddenin piyasaya sürüldüğü rapor edilmiştir. Bu maddeler arasında SK'ler 251 farklı bileşik ile en geniş grubu oluşturarak listenin en başında yer almaktadır. (UNODC, World Drug Report 2019).

Dünyada olduğu gibi Türkiye'de de bilinen uyuşturucu maddelere ek olarak, bu maddelere benzeyen ve yasal kısıtlamaları bulunmayan yeni psikoaktif maddelerin görülme oranı her geçen gün artmaktadır. Türkiye'de 2010 Mayıs ayında ilk SK resmi olarak ele geçirilmiştir (Gurdal ve ark., 2013). 2011 yılı mart ayında Amerika Gıda ve İlaç Dairesi

tarafından yasa dışı ilan edilen 6 farklı SK çeşidi, 13 Şubat 2011 tarihinde Resmi Gazete’de yayınlanan bir yazıyla ülkemizde de yasaklı maddeler listesine alınmıştır (Hoyte ve ark., 2012; Artuç ve ark., 2014). Ayrıca bazı SK’ler, 22 Mayıs 2013 tarihinde yayımlanan ve 2013/4827 Sayılı Kararname eki listesinde yer alarak yasa dışı madde olarak ilan edilmiştir (Çınar ve Çınar 2012, TUBİM 2014). İstanbul Narkotik Birimi ve Adli Tıp Kurumuna 01 Ağustos 2010–31 Mart 2012 tarihleri arasında gönderilen 1200 bitkisel bileşenin analizi sonucunda, bunlardan 1179’unun (%98,3) SK içerdiği belirlenmiştir (Artuç ve ark., 2014).

Sentetik Uyuşturucuların Nörotoksik Etkileri

SK’ler, esrar ile benzer farmakolojik etkilere sahip olmaları nedeniyle, kullanıcılar tarafından tercih edilen maddeler arasında yer almaktadır (Fattore and Fratta, 2011). Spice karışımlarının kullanımı işitsel, görsel ve dokunsal algılarda yanılsamalara, zamanın yavaş geçtiği hissine ve halüsinasyonlara neden olduğu ifade edilmektedir (Yamamoto et al., 2003; Cottencin et al., 2014).

Esrar ve SK daha önceden psikotik bozukluk yaşayan bireylerin, yeni psikoz belirtilerinin ortaya çıkmasına veya belirtilerin daha da kötüleşmesine yol açabileceği belirtilmektedir. Bu maddeler, psikotik bozukluğun başlangıcını tetikleyebilir (Evren ve Bozkurt, 2013). CB1 reseptörleri hipotalamus, serebral korteks, serebellum, bazal ganglionlar, hipokampus, omurilik ve olfaktör sistemde yaygın olarak bulunur (Mackie, 2005; Maccarrone and Wenger, 2005). SK’in, kannabinoid reseptörler aracılığı ile ortaya çıkan farmakolojik etkilerinden bazıları; bilişsel bozukluk, öğrenme, bellek bozuklukları, öfori, halüsinasyonlar, uyku bozuklukları ve iştah artışıdır (Liechti, 2015; Winstock ve Barratt, 2013). SK’lerin hepsi psikostimulan etkileri ve duyuşsal motor fonksiyonlarını etkilemektedirler (Zanda and Fattore, 2018).

Daha önce sağlıklı olan 10 erkekte, bir kereden fazla SK kullanımı sonrasında yeni başlangıçlı psikoz olduğu bildirilmiştir (Hurst ve ark., 2011). Ayrıca 316 SK kullanıcısının değerlendirildiği diğer bir çalışmada ise en sık görülen yan etkilerin motor koordinasyonda azalma (%38), taşikardi ve aritmi (%33), dissosiasyon (%22), baş dönmesi (%20), paranoya (%18), konfuzyon (%18), baş ağrısı (%18), panik (%14), konuşma bozukluğu (%14), terleme (%14), bulantı veya kusma (%9), depresyon (%4) ve psikoz (%4) olduğu bildirilmiştir (Barratt ve ark., 2013). Literatürde ayrıca SK’lerin kullanımına bağlı intihar düşüncesi ve intihar girişimi oranlarında belirgin artış olduğunu öne sürülen yayınlar mevcuttur (Fattore ve Fratta, 2011; Shanks ve ark., 2012; Patton ve ark., 2013).

SK'ler için bildirilen yan etkiler; tremor, ataksi, nistagmus, fasikülasyonlar, hipertonsite, hiperrefleksiyon ve hiperekstansiyon sayılabilir. SK'lerin en yaygın bilişsel etkileri; dikkat, konsantrasyon, hafıza ve operasyonel becerilerde bozulmadır. Bu etkiler genellikle intoksikasyon döneminde görülmekle birlikte bu dönemin ötesine de uzanabilmektedir (Musshoff ve diğerleri, 2014; Spaderna ve diğerleri, 2013).

Sentetik Uyuşturucuların Teratojenik Etkileri

SK kullanıcıları arasında ciddi ve tehlikeli sağlık etkileri sıklıkla rapor edilmektedir (McGuinness ve Newell, 2012). Yetişkinlerde SK'lerin toksik etkilerinin kanıtlanmış olması, doğum öncesi dönemde gerçekleşen maruziyetlerin de fetal gelişim üzerinde zararlı olabileceğini düşündürmektedir. Birçok epidemiyolojik kanıtlara rağmen kannabinoidler dünya çapında hamile kadınlar tarafından en sık suistimal edilen yasa dışı maddeler olmaya devam etmektedir (Brown ve Graves, 2013; Calvigioni ve diğerleri, 2014; Holbrook ve Rayburn, 2014). Yağda çözünebilen bir bileşik olan $\Delta 9$ -THC'nin plasental bariyeri kolayca geçebildiği ve fetüse ulaştığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, $\Delta 9$ -THC'nin fetal dokularda biriktiği ve maruziyetten sonra bu dokulardan geri kazanılabildiği saptanmıştır. Ayrıca, ilacın uygulanmasından üç saat sonra anne ve fetal plazmada benzer $\Delta 9$ -THC konsantrasyonlarının bulunduğu belirlenmiştir (Bailey et al., 1987).

Doğum öncesi dönemde kannabinoid maruziyetinin etkilerine ilişkin mevcut bilgilerin büyük bir kısmı, esrar veya psikoaktif bileşenlerinin insan ve hayvan modellerinde yürütülen daha önceki çalışmalara dayanmaktadır. Özellikle 1980'li ve 1990'lı yıllarda yayımlanan gelişimsel toksikoloji (teratojenite) çalışmalarının büyük bir kısmında, gebelik süresince esrar kullanımının fetal büyüme geriliği ve distal uzuv defektleri gibi anormallikleri gibi çeşitli doğumsal bozukluklarla ilişkili olduğunu, bu bulguların fetal alkol sendromunda gözlemlenen etkilerle benzerlik göstermektedir. Kraniyofasiyal anormallikler davranışsal anormallikler ve ara sıra perinatal ölüm arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir (Gibson ve diğerleri, 1983; Hingson ve diğerleri, 1982).

Son on yıldaki yasa dışı uyuşturucu kullanımı eğilimleri, üreme çağındaki kadınlar arasında hem doğal hem de SK'lerin artan popülaritesini yansıtmaktadır (Papaseit ve ark., 2014; Schneir ve diğerleri, 2011).

Özellikle birçok Batı ülkesinde esrar kullanımındaki son yıllarda gözlenen artış, doğum öncesi esrar maruziyetinin teratojenik etkilerinin önemine dikkat çekmektedir. Güncel literatürde yer alan bulgular, doğum öncesi esrar maruziyeti sonrasında fetal gelişim bozuklukları, yüksek prematürite oranları, erken doğumlar, yaşam boyu devam ettiği

gösterilen daha küçük beyin hacmi ve daha küçük kafalar gibi nörogelişimsel etkilerin sıklığında anlamlı bir artış olduğunu ortaya koymaktadır (Brents L., 2017).

Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar, maternal esrar maruziyetinin, doğan yavrularda davranış bozuklukları ile ilişkilendirilmektedir ve nöropsikiyatrik bozukluk riskinin artmasıyla bağlantılıdır (Morris ve ark., 2011).

Opioid ilaçları kullanan bir kadın hamile kaldığında, doğmamış çocuk ve yenidoğanın opioid bağımlısı olma ve yoksunluk etkileri gösterme riski bulunmaktadır. Ayrıca yeterince tanımlanmamış olan ilaca maruz kalma nedeniyle gelişimsel kusurların ortaya çıkma riskini de artırmaktadır (Reddy et al., 2017).

Kannabinoidler plesantayı kolaylıkla geçip fetüse ulaşabildiği için fetüsün gelişimini olumsuz yönde etkileyebilir ve yeni doğanlarda nörolojik bozukluklar oluşma riskini artırır (Kanyo et al., 2021). Üstelik doğum öncesi esrar maruziyetinin bağışıklık hücreleri üzerindeki dnanın metilasyon durumunun değişmesine yol açabileceğinin gösterilmesi, yalnızca bağışıklık gelişimi için değil, aynı zamanda beyin gelişimi ve olgunlaşması için de uzun süreli etkilere sahiptir. Bir kemirgen modelinde, bu etkilerin ilerleyen dönemde opioid bağımlılığının gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Zumbrun ve diğerleri, 2015).

Bağımlılık genetiği, model organizma olarak zebra balığı kullanılarak incelenmiştir (Klee ve diğerleri, 2012). Zebra balığı çalışmaları, insan bağımlılarında görülen uyuşturucuların etkilerini, doğum öncesi opioidlere maruz kalan bebeklerdeki doğum kusurlarını ve doğum öncesi maruziyetin gelişim ve davranış üzerindeki etkilerini özetlemektedir (Sarmah ve diğerleri, 2020).

CUMYL-4CN-BINACA

CUMYL-4CN-BINACA sentetik bir kannabinoid ve bir CB1 reseptör agonistidir. Esrarın başlıca psikoaktif etkilerinden sorumlu olan Δ^9 -tetrahidrokanabinol (THC) ile bazı farmakolojik benzerlikleri paylaşmaktadır. İnsanlarda CUMYL-4CN-BINACA esrar ve diğer SK'lere benzer etkilere sahiptir. Ancak yaşamı tehdit eden ek toksisitesi bulunmaktadır.

CUMYL-4CN-BINACA, ağrı ile mide bulantısını tedavi etmek, iştahı uyarmak ve olumlu bir ruh hali değişikliğini teşvik etmek amacıyla kullanılabilecek sentetik bir kannabinoid türevi olarak sunulmuş, ilk olarak 2014'de Yeni Zelanda patentinde SGT-78 adıyla ortaya çıkmıştır (Bowden ve Williamson, 2014; Longworth ve diğerleri, 2017; New Zelland, 2014). Sonrasında CUMYL-4CN-BINACA, Çin'den İspanyol sevkiyatı sırasında İspanyol gümrük yetkilileri tarafından tek bir ele geçirme vakasında 50 kg toz formunda ele geçirilmiş; sıvı ve toz formlar olmak üzere çeşitli formlarda tespit edilmiştir (EUDA, 2017).

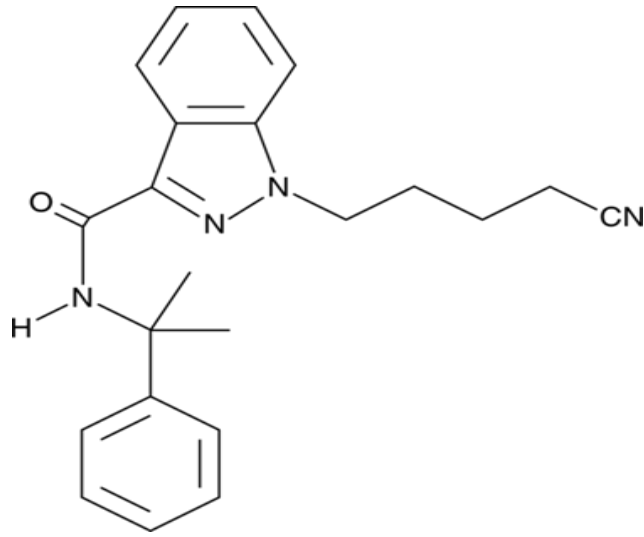
CUMYL-4CN-BINACA, Avrupa Birliği'nde Ekim 2015 itibarıyla piyasada bulunmaktadır ve dokuz üye devlette, ayrıca Türkiye'de de tespit edilmiştir (EUDA, 2017).

CUMYL-4CN-BINACA, EUDA tarafından izlenen SK'lerin çoğunda olduğu gibi ortak bir yapısal özellik olan bir indazol çekirdeğine sahiptir (Şekil 1). CUMYL-4CN-PINACA'nın yapısındaki pentil grubunun siyanobütil ile yer değiştirmesi sonucunda CUMYL-4CN-BINACA sentezlenmiştir (EUDA, 2017). Yapısında cumil grubu (cumyl), N-bütil kuyruğunun 4-pozisyonunda(4-CN) bağlı siyano grubu, bir indazol çekirdeği (INA) ve bir karboksilamid bağlı olan SK'dir. Saf formunda CUMYL-4CN-BINACA kristalimsi bir katıdır (EUDA, 2017). CUMYL-4CN-BINACA'nın yapısal karakterizasyonu yakın zamanda rapor edilmiştir (Bovens ve diğerleri, 2017). CUMYL-4CN-BINACA metabolitleri idrar örneklerinde ve insan karaciğer mikrozomlarında tanımlanmıştır (Öztürk ve diğerleri, 2018; Staeheli ve diğerleri, 2018). CUMYL-4CN-BINACA'nın akciğer, karaciğer, böbrek, kardiyovasküler sistem ve merkezi sinir sistemi gibi birçok organ sisteminde toksisite oluşturabilen siyanüre metabolize olduğu bilinmektedir.

CUMYL-4CN-BINACA gibi SK'ler için THC/kenevire benzer etkiler rapor edilmiştir. Bazı durumlarda etkilerin daha şiddetli olduğu bildirilmektedir. (EUDA, 2017). İnsanlarda CUMYL-4CN-BINACA zehirlenmeleri zihinsel durum değişikliği, anksiyete, bulantı ve kusma, nöbetler veya titreme ve hatta ölümle ilişkilendirilmiştir (EUDA, 2017).

AB'de CUMYL-4CN-BINACA'nın analitik olarak doğrulandığı 11 ölüm meydana gelmiştir. Bu ölümlerin en az beşinde, CUMYL-4CN-BINACA'nın ölüm nedeni veya ölüme katkısı olduğu açıklanmıştır (EUDA, 2017).

Avrupa Polis Teşkilatı ve EUDA'nın yaptığı ortak bir çalışmada CUMYL-4CN-BINACA İsveç'te sekiz ve Almanya'da üç ölüm vakası raporlanmıştır (EUDA, 2017). 2016 yılında Türkiye'de Adli Tıp Kurumu Başkanlığı'na gönderilen 2350 vaka üzerinde yapılan otopsi ve analizler sonucunda, 355 vakada (%15,1) CUMYL-4CN-BINACA tespit edilmiştir (Yeter, 2017).



Şekil 1. CUMYL-4CN-BINACA (1-(4-siyanobutil)-N-(2-fenilpropan-2-il)-1H-indazol-3-karboksamid)'nın kimyasal yapısı

Model Organizma Olarak Zebra Balığı

Model organizmalar, insan genomuna benzerliğinden dolayı tercih edilen ve insan genomundaki biyolojik, farmakolojik olayların nedenini anlamak amacıyla araştırmalarda kullanılan canlılardır.

Zebra balığı (*Danio rerio*) 1970'lerden günümüze kadar birçok tıbbi ve bilimsel çalışmalarda önemli bir omurgalı model olarak kullanılmaktadır. Zebra balığı (*Danio rerio*) ilk olarak Streisinger ve arkadaşları tarafından 1981 yılında genetik çalışmalar için tanıtılmış ve o zamandan beri çeşitli araştırmalarda yer almıştır (Streisinger ve diğerleri, 1981). Zebra balıklarının; jenerasyon zamanının kısa olması, düşük maliyetli olması, kolay bakılabilmesi, yumurta ve embriyolarının optik transparan olması, gen manipulasyonlarının kolay uygulanabilmesi, laboratuvar ortamında kolay beslenebiliyor ve çoğaltılabiliyor olması, yüksek fekondite göstermesi (ergin dişiler haftalık aralıklarla yüzlerce yumurta bırakır), dayanıklı bir tür olması, kolay bulunabilmesi ve tüm genomu dizilenmiş olması bu canlıyla çalışmayı avantajlı hale getirmektedir (Lambert, 1970; Selman ve diğerleri, 1993).

Omurgalılara benzer gelişim, anatomi ve fizyolojiye sahip olan zebra balığı biyolojik araştırmalarda kullanılan klasik memeli modellerine uygun alternatif bir organizmadır. (Otte ve diğerleri, 2017).

Zebra balığı (*Danio rerio*) Güney Asya kökenli olup, Pakistan, Kuzey Hindistan, Bhutan ve Nepal gibi ülkelerin akarsularında doğal olarak bulunan tropikal bir tatlı su balığı türüdür. Kemikli balıklar (Teleostei) grubunda yer alan bu tür Actinopterygii sınıfının Cyprinidae familyasına aittir (Carpio ve Estrada, 2006). Sivrisinek larvaları ve diğer böceklerle beslenmektedirler. Vücutlarının her iki yanında 7-9 adet gümüş rengi ve mavi

Çizgiler bulunmaktadır. Yetişkin zebra balıklarının boyu maksimum 4-5 cm civarındadır. Zebra balıklarının yaşam ortamı için optimum sıcaklık 26-28°C'dir. Uygun iletkenlik ve pH değerleri sırasıyla 10 ile 271 µS ve pH 6,0-8,0 arasındadır (Engeszer ve diğerleri, 2007). Ve bir çift zebra balığının hızla fonksiyonel metabolik organlara sahip larvalara dönüşen yüzlerce döllenmiş yumurta üretebildiği yüksek bir üreme kapasitesine sahiptir (Kamel ve Ninov, 2017).



şekil 2. Yetişkin zebra balığı (*Danio rerio*).

Zebra balığı, genomunun dizilenmesinin ardından insanlarda protein kodlayan genlerin %70'i ile zebra balıklarında bulunan genlerle benzerliği yani gen diziliminin aynı olması ve insanlarda rastlanan hastalıklarla ilgili genlerin %84'ünün yine zebra balıklarında benzer olması birçok çalışmada tercih edilmesini sağlamıştır (Griffin, 2020). Ayrıca zebra balıklarının yumurta ve embriyoları şeffaf görünürler. Bu şeffaf görünüm gelişim döneminde farklı organ sistemlerinin oluşumunu steromikroskop altında her aşamanın takip ve ayırt edilmesine olanak sağlar. Organogenez alışmaları için birçok fırsat sunmaktadır. (David, 2004). Zebra balıklarında kimyasal kaynaklı malformasyonlar doğrudan mikroskop altında gözlemlenebilir. (Nishimura ve diğerleri, 2016; Huang ve diğerleri, 2018)

Dllenmemiş yumurtaların opak yapısı döllenmiş yumurtalardan kolaylıkla ayırt edilmesini sağlar. Döllenen embriyolar yaklaşık yarım saat içerisinde blastodisk oluşumunu başlatır. İlk hücre bölünmesi döllenmeden 45 dakika sonra gerçekleşir. Ardından blastomerler 15 dakikada bir bölünürler. Blastomerlerin segmentasyon aşamasından sonra gastrulasyon safhası başlar. Embriyonik gelişim süreci; zigot (0-45 dakika), yarıklanma (45 dakika-2,15 saat), blastula (2,15-5,20 saat), gastrula (5,20-10 saat), segmentasyon (10-24 saat), faringula (24-48 saat), kuluçka (48-72 saat), larval safha (72 saat sonrası) olmak üzere sekiz temel

aşamadan oluşur (Kimmel ve ark., 1995). Gelişim aşamalarının birinci gününde embriyolar baş ve kuyruk bölgelerinden oluşur, ikinci gününde pigmentasyon göstermeye başlarlar (Westerfield, 2000). Zebra balığı embriyogenezi döllenmeden sonraki 72 saat (hpf) içinde tamamlanır ve 3 ay içinde cinsel olgunluğa ulaşır (King-Heiden ve ark., 2012). Bu avantajlar zebra balığını çeşitli toksik kimyasalların ve ilaçların gelişim ve üreme üzerindeki etkisini araştırmak için ideal bir model haline getirir (De la Paz ve ark., 2017). Embriyonun gelişimi stereo mikroskop altında incelenebilir. Özellikle kalbi, 3 haftalık gebelikteki bir insan embriyosunununkiye benzerdir ve kardiyovasküler sistem üzerindeki etkileri canlı zebra balıklarında mikroskopla kolayca değerlendirilebilir (Teixidó ve ark., 2019).

Zebra balığı embriyo ve larvaları, yetişkin zebra balığına göre toksinlere karşı önemli ölçüde daha yüksek duyarlılık göstermiştir (Chahardehi ve diğerleri, 2020). Zebra balığı larvaları, erişilebilir ve karakterize edilmiş devrelerle nispeten basit, okunaklı ve basmakalıp sensörimotor davranışlar sergiler. Kapsamlı ileri genetik ve kimyasal tarama için, uygun mükemmel bir omurgalı sistemidir (Meshalkina ve diğerleri, 2018).

Yetişkin zebra balığı santral sinir sistemi tarafından kontrol edilen bilişsel, duyu-motor ve temel motor tepkiler gibi nörobiyolojik tepkilere sahip olup, insanlarla homolog beyin yapıları içeren entegre bir sinir sistemine sahiptir (Tierney, 2011). Beyinlerinin hücresel yapısının yanı sıra sinaptik yapısı ve işlevi de insanlarınkiyle benzerlik göstermektedir. Bundan dolayı günümüzde hem larva hem de yetişkin zebra balığı, beyin işlevi, işlev bozukluğu ve bunların genetik ve farmakolojik modülasyonu gibi sinir sistemi hakkındaki bilgilerimizi zenginleştirmek için kullanılmaktadır (Kalueff ve diğerleri, 2014). Zebra balıklarının, hem yetişkinlerine hem de embriyolarına toksikoloji çalışmaları için ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak embriyolar yumurtanın şeffaflığı nedeniyle toksisite incelemeleri için idealdir; bu sayede toksisite testi sırasında gelişimsel evrelerin tespiti ve son noktaların değerlendirilmesi kolaylaşır. (Jayasinghe, 2019; Lammer ve diğerleri, 2009).

Zebra balıkları, bazı memeli modellerine göre uygun maliyetli bir alternatif olduğundan ilaç araştırmalarında çeşitli aşamalarda kullanılmaktadır. Embriyolarının şeffaf olması, canlı organizmalarda ilaçların iç organlara olan etkilerini kolay ve kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesini sağlamaktadır (Peterson ve ark., 2000). Zebra balığı şu anda gelişimsel toksikoloji de dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal alanlarda mükemmel bir model organizma olarak kabul görmektedir (Teraoka ve ark., 2003; Ota ve Kawahara, 2013; Nishimura ve ark., 2015).

Uyuşturucu Toksisite Tespitinde Zebra Balığı Kullanımı

Düşük maliyetli, yüksek verimli ve hızlı tahliller gerektiren, toksikolojik, ilaç ve kimyasal toksisite çalışmaları için yaygın olarak kullanılan bir hayvan modeli olan zebra balığı (*Danio rerio*), insanlarla homolog endojen kannabinoid sistemi nedeniyle kannabinoid toksisite mekanizmalarını incelemek için uygundur (Chatzimitakos ve Stalikas, 2016). Uyuşturucuların etkilerinin anlaşılması, gelişimsel zararlarının olup olmadığını anlayabilmek için zebra balığı embriyo ve larvaları kullanılabilir. Zebra balığı memelilerle fizyolojik, morfolojik ve histolojik benzerlikleri paylaşmaktadır (Diekmann an Hill, 2013). Genomunun dizilenmesi, insan genlerinin yaklaşık %70'inin bir zebra balığı ortologuna sahip olduğunu ve potansiyel insan hastalığıyla ilişkili genlerin yaklaşık %82'sinin en az bir belirgin zebra balığı ortologuna sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (Howe ve diğerleri, 2013). SK'lerin metabolik mekanizmaları reseptör afiniteleri ve farmakolojik etkileri tam bilinmemektedir. SK türev sayısındaki hızlı artışa paralel olarak, bu bileşiklerin insanlar ve hayvanlar üzerinde *in vivo* ve *in vitro* düzeyde yapılan çalışmaları incelenmiştir (Armenian et al., 2018).

Zebra balığının doku/organ yapısı ve genetiğı memelilerle önemli benzerlikler göstermektedir. Benzerliklerinden dolayı herhangi bir kimyasalın, doğal ürünün veya küçük moleküllerin organ gelişimi üzerindeki etkisi zebra balığı embriyolarında kolayca değerlendirilebilir (Parng ve diğerleri, 2002). Erken embriyonik gelişimi yönlendiren genetik sinyaller ve tepkiler, zebra balığı ve memeli embriyogenezi arasında temelde benzerdir (Sipes ve diğerleri, 2011). Zebra balıklarının gelişim süreci memelilerle karşılaştırılabilir (Behl ve diğerleri, 2015; Nishimura ve diğerleri, 2015; Sipes ve diğerleri, 2011). Zebra balığı beyin yapısı ve stres düzenleyici eksen de dâhil olmak üzere çeşitli sinirsel ve fizyolojik sistemlerin yapısı ve işlevi açısından diğer omurgalı türleriyle (kemirgenler ve insanlar dâhil) geniş benzerlikler paylaşmaktadır (Randlett, 2015).

Zebra balığı, *in vivo* toksisite testi için uygun maliyetli ve yararlı bir model olarak ortaya çıkmıştır ve ilaçların veya kimyasalların gelişimsel toksisitesini değerlendirmek için rutin olarak kullanılmaktadır (Nishimura ve diğerleri, 2015). Özellikle gelişim biyolojisi, toksikoloji ve ilaç araştırmaları için sıklıkla kullanılmışlardır (Ma ve ark., 2013). Zebra balığının embriyolarının derisi geçirgendir. Küçük moleküllerin embriyolara kolayca geçmesini sağlar. Bileşikler, embriyoların büyüdüğü suya basitçe eklenir. Küçük bileşikler, koryondan gelişmekte olan embriyoların gövdesine nüfuz edebilir. Değıştirilmiş genlerin, kolayca enjekte edilebildiğı ve kimyasal mutajenleri sudan absorbe edebilen, genetik olarak izlenebilir bir omurgalı modelidir; embriyolar şeffaftır ve dışarıdan gelişir, bu da noninvaziv görüntüleme tekniklerinin kullanılmasına olanak tanır. Embriyolar memeli modellerine göre

çok hızlı gelişir ve potansiyel olarak deney süresini kısaltır (Garcia ve diğerleri, 2016). Zebra balığı embriyolarında gelişimsel toksisiteyi tespit ederken, uç nokta parametreleri bir standartla (negatif kontrol) karşılaştırıldığında iki şekilde kategorize edilir. İlk olarak ölümcüllük pıhtılaşma, somitlerin malformasyonu, kalp atışının olmaması ve kuyruk kopmasının olmaması temelinde değerlendirilir. İkinci olarak teratojenite anormal göz gelişimi, kendiliğinden hareket eksikliği, alışılmadık kalp hızı, pigmentasyon eksikliği ve ödeme dayanarak değerlendirilir (Nagel, 2002; Calienni ve diğerleri, 2017).

Zebra balığının endokannabinoid gen fonksiyonu bağımlılık, kaygı, gelişim, enerji homeostazisi ve gıda alımı, bağışıklık sistemi fonksiyonu, öğrenme ve hafıza ile ilişkilendirilmiştir (Ellis, 2019). THC'ye maruz kaldıktan sonra zebra balıklarında kaygı, öğrenme ve hafıza gibi bilişsel bozukluklara sebep olan olumsuz sonuçlar bildirilmiştir (Ruhl ve diğerleri, 2014; Stewart ve Kalueff, 2014).

Zebra balığı larvalarının ana öğrenme ve hafıza modelleri arasında, bir hayvanın tekrarlanan uyaranlara tepki vermesiyle karakterize edilen alışkanlık; ağırlı veya zararlı uyaranlara dayalı duyarlılaştırma; nötr bir uyarının güçlendirici uyarana ilişkilendirilmesini içeren koşullandırma ve hayvanın sürü oluşturma tercihinin dayalı sosyal öğrenme gibi farklı öğrenme süreçlerinden bahsetmek mümkündür (Roberts, 2013).

Zebra balığı larval davranış modellerinde mekânsal ve sosyal öğrenme, hafıza, kaygı ve nörotransmitterlerin yönlendirdiği sosyal veya hastalık davranışları gibi nörolojik işlevlerden yararlanılabilir. Zebra balığının hem larval hem de yetişkin aşamalarında tespit edilen davranışsal fenotipler, sosyal davranış (keşif ve lokomotor yetenekler) ve uyuşukluk, kaygı, lokomotor aktivite gibi azalmış fizyolojik fonksiyon, keşif ve sosyal etkileşim ile karakterize edilen hastalık davranışı ile ayrılabilir. Kaçmak, dokunma ve sese tepki olarak yüzme, büyük karmaşıklığa rağmen refleksif bir tepkidir. Hafıza işleme ve uzaysal öğrenme gibi davranışsal olgular zebra balığının telensefalik bölgesinin lateral palliumunda gerçekleşir ve korku tepkisi, sırasıyla memeli hipokampusu ve amigdala gibi habenula ile ilişkilidir (Agetsuma ve diğerleri, 2010; Kenney, 2017).

Çalışmada İncelenen Zebra Balığı Genleri

Apoptoz (*casp3a*, *casp8*, *tp53* ve *ifng1*)

Apoptoz, organizmanın sağlığını korumak için kritik öneme sahip programlanmış hücre ölümü sürecidir. Apoptoz farklı morfolojik özellikler ve enerjiye bağımlı biyokimyasal mekanizmalarla karakterizedir. Apoptoz, genetik olarak düzenlenmiş bir mekanizma olup, hücrenin ölümüne yol açan çeşitli içsel veya dışsal sinyallere yanıt olarak işler. Apoptoz,

embriyonik gelişimde, bağışıklık sisteminin gelişiminde ve işleyişinde, kimyasal kaynaklı hücre ölümlerinde, hormona bağlı atrofide, normal hücre döngüsünde hayati öneme sahiptir. Apoptozda meydana gelen olumsuz durumlar, nörodejeneratif hastalıklar, otoimmün bozukluklar, iskemik hasar ve çeşitli kanser türü ile ilgilidir (Elmore, 2007; Kerr ve diğerleri, 1972; Chin ve Hayward, 2004).

casp3a

casp3a, zebra balığında apoptozun terminal fazında görev alan önemli bir uygulayıcı kaspazdır. Zebra balığı *casp3a*, insan *casp3* ile yüksek oranda benzerlik gösterir, ancak aktif bölge dinamiklerinde bazı farklılıklar mevcuttur. Özellikle P4 pozisyonundaki substrat bağlanma plastisitesi, *casp3a*'nın farklı substratları tanımasını ve kesmesini mümkün kılar. Bu özellik *casp3a*'nın fonksiyonel çeşitliliğini artırarak apoptozun düzenlenmesinde esneklik sağlar (Arasu ve diğerleri, 2018).

Transgenik zebra balığı embriyolarında *casp3a*'nın aşırı ekspresyonu; retina, notokord, kalp ve yumurta kesesi gibi dokularda yaygın apoptoza neden olur. Bu durum gelişimsel morfogenezin bozulmasına ve kalp yetmezliği gibi fenotiplere yol açmaktadır (Yoo ve Huttenlocher, 2009). Ayrıca *casp3a*'nın substrat özgüllüğü, apoptozun zamanlaması ve şiddetinin dokuya özel olarak ayarlanmasını sağlar. Bu bulgular, *casp3a*'nın sadece hücre ölümünü değil, aynı zamanda gelişimsel süreçleri şekillendirmede de rol oynadığını göstermektedir (Dix ve diğerleri, 2014).

casp8

casp8, hücre dışı sinyallere yanıt olarak aktifleşen bir diğer önemli kaspazdır. *casp8* ölüm reseptörlerine bağlı apoptoz sinyallerini iletir (Wyllie, 2010). Fas gibi ölüm reseptörlerinin aktive olmasından sonra, *casp8* başlatıcı kaspaz olarak rol alır ve apoptozun başlatılmasında yer alır. *casp8*'in aktivasyonu, hücredeki diğer kaspazları aktifleştirir. Böylece apoptozun ilerlemesine neden olur. *casp8*'in ana rolü hücre apoptozunda aşağı akış yolu hücre reseptörü olarak görev yapmaktır. *casp8* bir proenzim olarak sentezlenir. Büyük bir N terminal ön bölüm ve bir C-terminal katalitik bölüm içerir. Apoptozu tetiklemek için efektör kaspazların inaktif önformlarının ayrılmasını sağlar. *casp8* önformu ölüm efektör formu içerir. Bu form diğer proteinlerin aktivasyonunu düzenlemek için onlarla etkileşime girmeye olanak sağlar (Lee ve ark., 2015).

tp53

tp53 geni hücrede ki genetik hasar ve stres koşullarına karşı yanıt veren kritik bir tümör baskılayıcı gendir. *tp53* geni *p53* adlı bir proteini kodlar. Bu protein hücre döngüsünü düzenler, dna hasarını onarır ve gerektiğinde apoptoz (programlanmış hücre ölümü) başlatarak, hasarlı hücrelerin çoğalmasını engeller. *p53*, bu özellikleriyle kanser gelişimini engellemeye yardımcı olur (Vousden ve Prives, 2009). Ancak *tp53* genindeki mutasyonlar *p53* proteinini işlevsiz hale getirebilir. Bu durum, hücrelerin dna hasarını onaramamasına ve kontrolsüz bir şekilde bölünmeye devam etmesine yol açar. *tp53* mutasyonları, birçok kanser türünde yaygın olarak bulunur ve kanserlerin yaklaşık %50'sinde tespit edilmiştir. Bu nedenle *tp53*, hem kanser biyolojisi hem de tedavi yaklaşımları açısından kritik bir genetik hedef olarak kabul edilmektedir (Kandoth ve diğerleri, 2013).

Ifng1

Interferon gamma 1, bağışıklık yanıtlarını düzenleyen bir sitokindir ve apoptozun indüklenmesinde rol oynar. *Ifng1* (interferon gamma), özellikle bağışıklık hücreleri tarafından salgılanır ve hücre içindeki stres durumlarını tespit ederek apoptozu tetikleyebilir (Mattyasovszky ve diğerleri, 2016). *Ifng1*, *fas* ve diğer ölüm reseptörlerinin ifade edilmesini artırarak apoptozun daha da güçlenmesine yol açabilir. *Ifng1* hem bağımsız yollarla hem de kaspazlarla hücre ölümüne yol açtığı görülmüştür. Bu mekanizmalar, bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde ve hücrel homeostazın korunmasında önemli rol oynamaktadır (Pedersen ve ark., 2004).

DNA onarımı (*rad51*)

rad51, çift sarmallı dna kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarımında görev alan temel bir proteindir (Bonilla et al., 2020). Bu protein, dna hasarı sonrası onarım bölgelerine yönelerek, homolog dna dizileriyle eşleşmeyi sağlar ve doğru onarım sürecini başlatır ve hücrel genomik bütünlüğün korunmasına katkıda bulunur. UV ışınları, kimyasallar, oksidatif stres gibi çevresel etkenler hücredeki dna da kırıklara yol açabilir. *rad51* geni dnadaki bu kırıkları onararak hücrenin hayatta kalmasına yardımcı olur. *rad51* dnadaki çift sarmallı kırıkları onarmak için homolog rekombinasyonu başlatır. Bu süreçte, *rad51*, hasar gören dnanın eşleşmiş dizileriyle sağlıklı bir dna dizisini kullanarak kırıkları onarır. *rad51* hücredeki genetik kararlılığın korunmasında önemli işlevi vardır (Bonilla et al., 2020).

Dopamin (*dat*, *drd1*, *drd3*)

Dopamin, beyin ve sinir sistemi üzerinde önemli bir nörotransmitterdir. Hem merkezi sinir sisteminde hem de periferik sistemde bir dizi biyolojik işlevi vardır. Dopamin, öğrenme, ödül, motive olma, hareket kontrolü ve duygusal düzenleme gibi fonksiyonlarda kritik bir rol oynar (Grace, 2000; Beaulieu ve Gainetdinov, 2011).

dat

Dopaminin nöronlar arasında doğru şekilde iletilmesini sağlayan (dopaminin sinaptik boşluktan presinaptik nörona geri alımını sağlayan) bir taşıyıcı proteindir. Dopamin taşıyıcı proteini (*dat*), dopaminin presinaptik hücrelere geri alımını sağlayarak sinaptik boşluktaki dopamin düzeylerini düzenleyen bir membran proteindir. *dat* dopaminin fazlalığının engellenmesinde kritik bir rol oynar, çünkü dopaminin aşırı birikmesi nörolojik ve psikiyatrik bozukluklara yol açabilir. *dat* dopaminin sinaptik boşluktan hücre içine geri taşınmasını sağlayarak dopamin düzeylerini kontrol eder (Chung ve Hwang, 2017).

drd1

drd1, dopamin sisteminde önemli bir rol oynayan bir reseptördür ve beyin çeşitli bölgelerinde bulunur. *drd1* geni, dopamin d1 reseptörünü kodlar ve dopaminin etkilerini başlatan sinyal yollarını aktive eder. Bu reseptör, özellikle bazal gangliyonlar ve prefrontal korteks gibi alanlarda yoğun bulunur ve hareket kontrolü, ödül mekanizmaları, bilişsel fonksiyonlar ve duygusal düzenleme ile ilişkilidir. *drd1* reseptörünün disfonksiyonu, Parkinson hastalığı, şizofreni ve bağımlılıklar gibi nörolojik ve psikiyatrik hastalıkların patogeneğinde yer alabilir. Ayrıca genetik varyasyonlar, bireylerin dopamin cevabını ve dolayısıyla psikolojik durumlarını etkileyebilir (Baik ve Son, 2009; Muneoka ve Takahashi, 2017).

drd3

drd3 dopaminin etkilerini ileten G proteinine bağlı bir reseptördür. Özellikle ruh hali, motivasyon, ödül işleme ve duygusal düzenleme gibi süreçlerde kritik bir rol oynar. Dopamin D3 reseptörü (*drd3*), beyin limbik sisteminde yoğunlaşan ve duygusal yanıtları, motivasyonu ve ruhsal dengeyi düzenleyen önemli bir moleküldür. *drd3*, dopaminin etkilerini gösterdiği bir başka reseptördür ve daha çok limbik sistem gibi duygusal ve motivasyonel işlevlerle ilişkili beyin bölgelerinde bulunur (Beaulieu ve Gainetdinov, 2011; Chung ve Hwang, 2017).

Serotonin/5-hidroksitriptamin (5ht1aa, 5ht1a, 5ht1b, 5ht2c)

5-Hidroksitriptamin (5-ht), saldırgan davranışı etkileyen en önemli nörotransmitterdir (Hu et al, 2015). Balıklarda, triptofan hidroksilaz 2 (*5-ht* hız sınırlayıcı enzim, *Tph2*) ve plazmasitoma ifadeli transkript (*5-ht* belirteç protein faktörü, *Pet1*), *5-ht* sentezi için önemli faktörlerdir (McGeer ve diğerleri, 1973). Çalışmalar, *Tph2* katalitik aktivitesinin kaybının ve *pet1* gen ifadesinin azalmasının, *5-ht* sentezi ve salınımının azalmasına yol açtığını ve bunun da üreme dışı davranışlarda (korku, endişe ve saldırgan davranış gibi) değişikliklere ve üreme davranışının bozulmasına neden olduğunu göstermiştir (Mosienko et al., 2012; Jacobsen ve diğerleri, 2011). Hidroksitriptamin (*5-hidroksitriptamin*) yada daha yaygın bilinen adıyla serotonin, merkezi sinir sistemi ve gastrointestinal sistemde önemli bir nörotransmitter olarak görev yapmaktadır. Serotonin, duygusal durum, uyku, iştah, sindirim, öğrenme ve hafıza gibi bir dizi biyolojik fonksiyonu düzenler (Müller ve Jacobs, 2014; Lesch, 2017).

5ht1aa

5ht1aa geni, serotonin 1a (*5ht1a*) reseptörünü kodlayan bir gendir. Bu reseptör, serotonin sisteminin önemli bir parçasıdır. *5ht1aa* reseptörü, başta duygu durum düzenleme, anksiyete, depresyon ve psikolojik durumların kontrolü olmak üzere birçok nöropsikiyatrik işlevi düzenler. Özellikle beynin limbik sisteminde, hipokampus ve prefrontal korteks gibi bölgelerde yoğun şekilde bulunur. *5ht1aa* reseptörünün aktivasyonu, genellikle sakinleştirici ve dengeleyici etkilerle ilişkilidir, ancak aşırı ya da yetersiz aktivite, psikiyatrik bozuklukların gelişimine yol açabilir. Genetik varyasyonlar ve polimorfizmler, bu reseptörün işlevini etkileyebilir ve anksiyete, depresyon, şizofreni gibi hastalıkların patogeneğinde rol oynayabilir. *5ht1a* reseptörleri, antidepresan ve anksiyolitik ilaçların hedefi olarak, tedavi süreçlerinde önemli bir rol oynar (He ve Li, 2012; Lanfumey ve Hamon, 2016).

5ht1a

5ht1a reseptörü, serotonin (*5-hidroksitriptamin*) reseptör ailesinin önemli bir üyesidir. Çoğunlukla beynin limbik sistemi, hipokampus ve prefrontal korteks gibi duygusal ve bilişsel işlevlerin yönetildiği bölgelerde bulunur (Hensler, 2006). G-protein bağlı bir reseptör olan *5ht1a*, ve genellikle hücre içi sinyal yollarını azaltarak nöronal aktiviteyi baskılar (Albert ve Vahid-Ansari, 2019). Bu mekanizma özellikle anksiyete ve depresyon gibi durumlarda önemli bir dengeleyici rol oynar (Savitz et al., 2009; Richardson-Jones et al., 2010).

5ht1b

5ht1b reseptörü, serotonin (5-hidroksitriptamin) ailesi içerisinde yer alır. G-protein bağlı bu reseptör, sinaptik iletimi düzenleyen önemli bir rol üstlenir ve genellikle presinaptik bölgelerde bulunur. *5ht1b* reseptörü, oto-reseptör olarak görev yaparak serotonin salınımını inhibe eder (Hoyer ve Martin, 1997). *5ht1b* reseptörlerinin, serotonin salınımını düzenleyerek ağrı algısını, iyi hissetme durumlarını ve duygusal dengeyi etkilediği düşünülmektedir. Migren tedavisinde, triptanlar gibi ilaçlar, *5ht1b* reseptörlerini hedef alarak, baş ağrılarını hafifletir (Lassen et al., 2002). Ayrıca *5htb* reseptörünün aşırı aktivitesinin depresyon gibi ruhsal bozukluklarla ilişkili olduğu bulunmuştur (Clarke et al., 2004).

5ht1b reseptörü, özellikle hipokampus, basal ganglionlar, kortikal bölgeler ve limbik sistem gibi beyin yapılarına yoğun şekilde lokalizedir. *5ht1b* reseptörlerinin aktifliği, serotonin salınımını dengeleyerek nörotransmisyonu düzenler. Bu mekanizma, nöronal inhibisyon sağlayarak, sinaptik iletimi sınırlar ve böylece nörotransmisyonun fazla uyarıcı etkilerini engeller (Millan, 2005). Bu özellik, reseptörün beyin fonksiyonlarında önemli bir dengeleme rolü oynamasına katkı sağlar. Bu reseptör, beyindeki bazı sinapslar ve damarlar gibi bölgelerde bulunur. *5ht1b* reseptörü, özellikle kan damarlarını etkileyerek vazokonstriksiyon (damarların daralması) yaratabilir (MacLean ve diğerleri, 1996)

5ht2c

5ht2c, serotonin reseptör ailesinin üyesi olup, G-proteine bağlı bir reseptördür. *5ht2c* reseptörleri; başta hipotalamus, beyin sapı ve limbik sistem gibi duygusal ve davranışsal işlevlerin düzenlendiği beyin bölgelerinde yoğun olarak bulunur (González-Maeso ve diğerleri, 2007). *5ht2c* reseptörlerinin etkinliği, genellikle uyarıcı etkilere yol açar ve serotonin ile diğer nörotransmitterlerin etkilerini modüle eder. *5ht2c* reseptörlerinin aktivasyonu, sinaptik plastisiteyi etkileyerek nörotransmitter salınımını düzenler, bu da ruh hali, anksiyete ve davranışsal düzenleme üzerinde belirleyici bir rol oynar. Özellikle bu reseptörler depresyon ve anksiyete gibi psikiyatrik bozuklukların tedavisinde hedef olarak kullanılmaktadır (Hoyer ve diğerleri, 2002; Millan, 2005).

Gama amino butirik asit (*gabra1*, *gat1*, *abat* ve *gad1b*)

Gama amino butirik asit, merkezi sinir sistemi içinde yer alan en önemli inhibitör nörotransmitterdir. Gama amino butirik asit, sinir hücreleri arasındaki iletişimi düzenler ve genellikle sinirsel aktiviteyi baskılar. Böylece beyin ve vücutta dengeyi sağlar. Gama amino butirik asit sistemi, anksiyete, depresyon, uyku düzeni, kas kontrolü gibi bir dizi önemli biyolojik süreçte rol oynar. Gama amino butirik asit nörotransmitterinin sentezi, dönüşümü

ve inaktivasyonu gibi ile gama amino butirik asit ilişkili başlıca aktivitelerinin düzenlenmesinde önemli roller oynamaktadır (Yan et al., 2017).

gabral

gabral, gama amino butirik asitin etkisini gösterdiği en yaygın reseptördür. *Gabral* (GABA-A reseptörünün alfa alt birimi), bu reseptörün bir parçasıdır ve sinir hücreleri arasındaki iletişimi düzenleyen önemli bir bileşendir. GABA-A reseptörleri, genellikle klor iyonlarının hücre içine girmesine izin vererek, hücreyi hiperpolarize eder ve bu da sinirsel aktivitenin inhibe olmasını sağlar. *gabral1*, heteropentamerik GABA-A reseptörlerinden biri olup, merkezi sinir sistemindeki inhibe edici sinyallemeği düzenleyen, iyon kanalı olan bir ligand-kapılı kanaldır ve nöronal hiperpolarizasyona ve nöronal sinyal iletimini inhibe etmeye neden olur (Steven ve Garrett, 2014).

gat1

gat1 gama-aminobütirik asidin sinaptik boşluktan presinaptik nöronlara geri alınmasını sağlayan bir taşıyıcı proteindir ve *gat1*, sinaptik aralıkta bulunan gama amino butirik asitin yaklaşık %85'inin geri alımından sorumludur (Chen et al., 2004). *gat1*'in rolü, gama amino butirik asitin düzgün bir şekilde geri alınarak nörotransmitterin etkilerinin sonlandırılmasıdır. Bu taşıyıcı, gama amino butirik asit sinyalinin sonlanmasına ve sinirsel iletişimin düzgün şekilde düzenlenmesine yardımcı olur (Liu et al., 2002).

abat

abat, gama amino butirik asitin sinaptik boşluktan presinaptik nöronlara geri alındıktan sonra, bu nörotransmitterin metabolizmasını düzenleyen bir enzimdir. *abat*, gama amino butirik asiti suksinik semialdehide dönüştürerek, bu metabolik yol aracılığıyla gama amino butirik asitin etkilerinin sonlanmasına yardımcı olur (Yu et al., 1984). Ayrıca, gama amino butirik asitin sinaptik boşluktan geri alınmasının ardından, *abat* enzimi, gama amino butirik asiti metabolize ederek nörotransmisyonun sonlanmasına katkıda bulunur. *abat*'ın bu işlevi gama amino butirik asit seviyelerinin sinaptik boşlukta doğru bir şekilde düzenlenmesine olanak tanır ve nörotransmisyonun düzgün bir şekilde sonlanmasını sağlar. gama amino butirik asitin nörotransmisyon üzerindeki etkisi, yalnızca onun salınımıyla sınırlı değildir; aynı zamanda, *abat* enziminin etkili çalışmasıyla gama amino butirik asitin doğru bir şekilde metabolize edilmesi, nöronal hiperpolarizasyona ve sinaptik iletimin sonlandırılmasına neden olur. *abat*, gama amino butirik asitin geri alımını ve metabolizmasını kontrol ederek, sinir hücreleri arasındaki iletişimin düzenli olmasını sağlar. Bu süreç, sinaptik

boşluktaki gama amino butirik asit seviyelerinin zamanında ve doğru bir şekilde azaltılmasını sağlayarak, nöronal aktivitenin aşırı artışı engeller (O'Neill ve Lajtha, 1991).

abat'ın işlevindeki bozukluklar, gama amino butirik asit metabolizmasının düzgün bir şekilde işleyememesiyle sonuçlanabilir. Bunun sonucunda sinaptik boşluktaki seviyeleri gama amino butirik asit anormal bir şekilde yüksek kalabilir, bu da nöronal hiperaktiviteye ve çeşitli nörolojik bozukluklara yol açabilir. *abat*'ın inhibisyonu ya da fonksiyon bozukluğu, depresyon, anksiyete, epilepsi gibi nörolojik hastalıkların gelişiminde önemli bir faktör olabilir (Sills ve Soares, 1997).

gad1b

gad1b, gama amino bütirik asitin sentezinden sorumlu bir enzimdir. Glutamat dekarboksilaz ailesine ait olan bu enzim, glutamatu gama amino butirik asite dönüştürür (Krueger ve diğerleri, 2007). *gad1b*'nin etkisi, özellikle beta alt birimi olarak, üretiminin gama amino butirik asit düzenlenmesinde önemlidir (Martin ve diğerleri, 1998). *gad1b*, gama amino butirik asitin üretildiği yerlerden biri olup, nörotransmitter dengesini sağlar ve sinir hücreleri arasındaki iletişimin düzgün bir şekilde devam etmesini sağlar (Higashijima ve diğerleri, 2004). Bu enzim, gama amino butirik asit sentezinin yanı sıra, gama amino butirik asitin sinaptik etkinliğini düzenlemekte de kritik bir rol oynar (Grone ve Maruska, 2016).

Davranış (*kiss2*, *gnrh3*, *gnrhr3*)

kiss2

Kisspeptinler, hipotalamustan salınan ve gonadotropin salgılatıcı hormon (*GnRH*) sisteminin başlıca düzenleyicileri olan nöropeptidlerdir. *kiss2* mRNA'sının özellikle hipotalamus, preoptik alan ve nükleus posterior gibi nöroendokrin bölgelerde yoğun olarak bulunduğu gösterilmiştir. *kiss2*, hipotalamustaki *GnRH* nöronlarını uyararak luteinleştirici hormon (*LH*) ve folikül uyarıcı hormon (*FSH*) salınımını tetikler. Böylece gonadal gelişim, gamet üretimi ve üreme davranışlarının düzenlenmesi sağlanır. Balıklarda yapılan deneysel çalışmalar, *kiss2*'nin hem ovulasyon hem de spermatogenezin düzenlenmesinde kritik rol oynadığını göstermektedir (Zhang et al., 2010). *kiss2*, yalnızca endokrin değil, aynı zamanda davranışsal düzeyde de etkilidir. *GnRH* sistemine etkisi sayesinde *kiss2*, balıklarda kur yapma, çiftleşme, saldırganlık gibi sosyal davranışların nörohormonal kontrolünde yer alır. Özellikle *GnIH* (gonadotropin inhibitör hormonu) ile karşıt etkiler oluşturarak, *GnRH* aktivitesini dengeleyen bir sistemin parçası olarak çalışır (Ogawa ve Parhar, 2014). Kisspeptin-2 (*kiss-2*), doğrudan *GnRH* nöronları üzerinde etki ederek *GnRH* salınımını

uyarırken (Shahjahan ve ark., 2013), GnIH, hipotalamus ve hipofiz tarafından GnRH sentezini ve salınımını azaltır (Tsutsui ve ark., 2007).

gnrh3

Gonadotropin salgılatıcı hormon 3 (*gnrh3*), omurgalılarda özellikle balık türlerinde bulunan bir nöropeptiddir. *GnRH* ailesinin bir üyesi olan *gnrh3*, başta üreme fonksiyonlarının düzenlenmesi olmak üzere, sosyal davranışların kontrolünde de önemli roller üstlenmektedir (Parhar et al., 2016). *gnrh3*, genellikle hipotalamusa bağlı terminal sinir çekirdeklerinde üretilir. Buradan salındığında hipofiz bezine etki ederek gonadotropin hormonlarının (*LH* ve *FSH*) salgılanmasını tetikler (Yamamoto et al., 1997). *gnrh3*, gonadotropinlerin salınımını uyararak, cinsel olgunlaşma ve gonad gelişimi gibi üreme süreçlerinin düzenlenmesinde temel rol oynar. Balıklarda yapılan çalışmalar, *gnrh3*'ün yokluğunda veya düzeylerindeki bozulmalarda üreme davranışlarında azalma gözlemlendiğini göstermiştir (Moussavi et al., 2007). *gnrh3* yalnızca hormonal düzeyde değil, aynı zamanda davranışsal düzeyde de etkilidir. Balıklarda kur yapma, çiftleşme, saldırganlık gibi sosyal davranışların ortaya çıkmasında *gnrh3*'ün düzeyleri belirleyici olabilir (Ubuka et al., 2011). Bu nedenle *gnrh3*, hem nöroendokrin hem de davranışsal sistemleri etkileyen çift yönlü bir faktör olarak değerlendirilmektedir. *gnrh3* 'ün etkileri, hücre yüzeyinde bulunan *gnrh* reseptör 3 (*gnrhr3*) aracılığıyla iletilir. *gnrhr3*, *gnrh3*'ün bağlanmasıyla hücre içi sinyal yollarını aktive eder ve hipofizden gonadotropin salınımını başlatır (Sower et al., 2006; Moussavi et al., 2007). *gnrh3*'ün etkileri, seks steroid hormonları olan testosteron, estradiol ve progesteron gibi hormonlarla birlikte çalışarak sosyal davranışların daha karmaşık şekilde düzenlenmesini sağlar. Bu etkileşimler sayesinde, hormonal dengeye bağlı olarak hayvanın sosyal tepkileri şekillenebilir (Adkins-Regan et al., 2005).

gnrhr3

gnrhr3 (Gonadotropin salgılatıcı hormon reseptörü 3), omurgalıların hipotalamus, hipofiz, gonad aksı boyunca kritik görevler üstlenen, G-protein bağlı reseptör ailesine ait bir yapıdır. Özellikle balıklarda bulunan bu reseptör, *gnrh3* (gonadotropin salgılatıcı hormon 3) nöropeptidinin etkilerini iletmekle sorumludur (Moussavi et al., 2007). *gnrhr3*, yedi transmembran domen içeren tipik bir G-protein bağlı reseptördür. Bu yapı, hücre zarında *gnrh3*'ü tanıyıp bağlayarak hücre içi sinyal iletimini başlatmasını sağlar. Reseptörün özellikle hipofiz bezinde ve bazı balık türlerinde beyin dokularında yoğun olarak ifade edildiği gösterilmiştir. Bu dağılım, *gnrhr3*'ün hem hormonal hem de nörolojik etkilerde rol oynadığını ortaya koymaktadır (Parhar et al., 2016; Ubuka et al., 2011). *gnrhr3*, *gnrh3*'ün hipofiz

üzerindeki etkilerini aracılık eder. Bu bağlanma sonucu luteinleştirici hormon (*LH*) ve folikül uyarıcı hormon (*FSH*) gibi gonadotropinlerin salgılanması tetiklenir. Bu hormonlar, gonadların gelişimini ve cinsiyet hücrelerinin üretimini başlatır. Balık türlerinde yapılan çalışmalarda, *gnrhr3*'ün bu süreçlerde vazgeçilmez bir rol oynadığı gösterilmiştir (Moussavi et al., 2007; Sower et al., 2006). *gnrhr3* sadece endokrin salınımında değil, aynı zamanda davranışsal düzenlemelerde de rol oynar. *gnrh3-gnrhr3* etkileşimi, balıklarda kur yapma, saldırganlık, eş seçimi gibi sosyal davranışların nörohormonal kontrolünü sağlar. Bu etkileşim, hayvanların çevresel ve sosyal uyarılara verdikleri tepkilerde belirleyici bir faktördür (Parhar et al., 2016; Ubuka et al., 2011). *gnrh* reseptörleri evrimsel olarak çeşitlenmiş bir ailedir. Özellikle teleost balıklarda *gnrhr1*, *gnrhr2* ve *gnrhr3* gibi çok sayıda alt tip tanımlanmıştır. Bu alt tiplerin varlığı, türler arası fizyolojik ve davranışsal farklılıkların nöroendokrin düzeyde kontrol edilebilmesini sağlar. *gnrhr3*, *gnrh3*'ün özgül reseptörü olarak, balıklarda adaptif davranışların ve üreme stratejilerinin şekillenmesinde evrimsel avantaj sağlamaktadır (Sower et al., 2006).

MATERYAL VE METOT

Kimyasallar ve Çözeltiler

CUMYL-4CN-BINACA (%98'den fazla saflıkta), Cayman Chemical Company (MI, ABD) tarafından temin edilmiştir. Bu kannabinoid, Mayıs 2016 ve Aralık 2016'da Türkiye'de en sık kötüye kullanılan ve bildirilen SK'ler arasında yer alması nedeniyle bu çalışmada seçilmiştir (Öztürk et al., 2018). Konsantrasyon seçimi, Chatzimitakos et al. (2022) ve Markin et al. (2021) tarafından yapılan çalışmalara dayanarak belirlenmiştir. CUMYL-4CN-BINACA, %1 DMSO içinde E3 (zebra balığı embriyo ortamı) içinde çözölmüştür. Ortam, 5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄ ve 0.001 mM metilen mavisi içermektedir. Tüm toksisite testleri E3 ortamında yapılmıştır. Ayrıca %1 DMSO'nun zebra balığı embriyo gelişim toksisite testinde bileşikleri çözmek için güvenle kullanılabileceği bilinmektedir (Hoyberghs et al., 2021).

Zebra Balığı Bakımı ve Embriyo Toplama

AB ırkı zebra balıkları, Atatürk Üniversitesi Su Ürünleri Deneysel Araştırma Birimi'nde (Erzurum, Türkiye) bulunan Aquatic Habitats Zebra Balığı Sistemi'nde bakılmıştır. Balıklar, sistemde 14 saat aydınlık:10 saat karanlık döngüsünde ve sabit bir su sıcaklığında (27±1,0 °C) tutulmuş, günde iki kez beslenmiştir. Üreme için, üç dişi ve iki erkek balık seçilmiş ve üreme akvaryumlarına yerleştirilmiştir. Akvaryumlar, sistem suyu ile doldurulmuş ve belirtilen koşullar sağlanmıştır. Ertesi sabah, ışıklar açıldıktan sonra tüm embriyolar toplanmıştır. Döllenmiş yumurtalar seçilip yıkanmış ve E3 ortamı ile petri tabakalarına aktarılmıştır.

Balık Embriyo Toksisite (FET) Testi

Toksisite testi, OECD test yönergesine (OECD, 2013) uygun olarak yapılmıştır. Zebra balığı embriyoları (3 hpf), steril edilmiş petri tabakalarına yerleştirilmiş ve her tedavi için 30 yumurta içeren 25 mL test kimyasalı veya E3 ile doldurulmuştur. Her CUMYL-4CN-BINACA konsantrasyonu (1,25, 2,50, 5,0, 10,0, 20,0 ve 40,0 mg/L), taşıyıcı kontrol (%1 DMSO) ve kontrol (E3) tabağa eklenmiş ve petri tabakaları 27±1,0 °C'de inkübe edilmiştir. Maruziyet süreleri, 24 saat (kısa süreli) ve 120 saat (uzun süreli) boyunca devam etmiştir. Deney boyunca, maruz kalma çözeltileri yenilenmemiştir (statik test). Kısa süreli maruziyetten sonra, embriyolar E3 ortamına aktarılmıştır. Her 24 saatte bir, tüm embriyolar, 120 hpf'ye kadar, bir stereomikroskop (Nikon SMZ1000) ve dijital kamera (Nikon DSLR

D70s) cihazı ile ölüm oranı ve gelişimsel anormallikler açısından gözlemlenmiştir. Ayrıca, 60-120 hpf arasında embriyoların çatlama zamanı izlenmiştir. Çatlama oranı şu formülle hesaplanmıştır: $HT = \frac{\text{Çatlayan embriyolar}}{\text{Yaşayan embriyolar}} \times 100$ [25] (Lee et al., 2013). Deneyin sonunda, larvaların vücut uzunluğu, baş alanı, göz alanı ve perikardiyal alanı ölçülmüş ve LEICA LAS EZ görüntü işleme yazılımı ile analiz edilmiştir. Medyan öldürücü konsantrasyon (LC_{50}) ve medyan etkili konsantrasyon (EC_{50}) değerleri, deneylerin sonunda biriken ölüm ve anormallikler dikkate alınarak hesaplanmıştır. TI (teratogenik indeks) değeri, LC_{50}/EC_{50} oranı olarak hesaplanmıştır. Buna göre, TI değeri 1 veya daha yüksekse, verilen bileşik teratogenik olarak kabul edilir (Selderslaghs et al., 2009). Zebra balığı embriyo ve larvalarının kalp atışları 48 ve 120 hpf'de izlenmiştir. Kalp atışı, LEICA DM750 mikroskobu altında HD kamera desteği ile dakikada sayılarak hesaplanmıştır. Her gruptan on embriyo rastgele seçilmiş ve kaydedilmiştir. Morfolojik değişiklikler, 24, 48, 72, 96 ve 120 hpf'de mikroskop altında belirlenmiştir. 24 hpf'deki değişiklikler, somitlerdeki kusurlar ve kuyruk kopmalarını içermektedir. Zayıf veya hiç pigmentlenmeyen göz ve vücut, anormal göz morfolojisi, yumurta kesesi ödemi, perikardiyal ödem, anormal kan akışı, gecikmiş çatlama ve gelişim (kuyruk hareketi yok, kısa uzunluk, çene oluşumu yok, yüzme kesesi oluşumu yok, yüzme yok vb.), kıvrılmış kuyruk, omurga deformiteleri ve anormal vücut morfolojisi 48-120 hpf arasında tespit edilmiştir. Farklı CUMYL-4CN-BINACA konsantrasyonlarına maruz kalan tüm embriyolar, tüm zaman dilimlerinde deformiteler açısından değerlendirilmiştir. Skorlama, normal için (0) ve anormal için (1) verilerek yapılmıştır. Deformite oranları, 24, 48, 72, 96 ve 120 hpf'deki anormal embriyoların veya larvaların, o zaman dilimindeki canlı embriyo/larva sayısına oranı olarak hesaplanmıştır. Özellikle, omurga deformiteleri, ödem, çatlamama ve anormal pigmentasyon gibi bazı morfolojik anormallikler, EC_{50} değerinin hesaplanmasında kullanılmıştır.

Davranışsal Analiz

Davranışsal değişikliklerin belirlenmesi, ilaçların ve benzeri kimyasalların biyolojik etkinliklerini araştırmada oldukça önemlidir. Kannabinoidin zebra balığı larvaları üzerindeki davranışsal etkileri, Dokunma-Tepkisi (TER) testi ile incelenmiştir. TER, bir şaşırtıcı uyarının cevabı olarak vücudun açılma ivmesi ve yer değiştirmesi olarak tanımlanmıştır (Kalueff et al., 2013). TER testi, Guzman et al. (2020) tarafından bildirilen yöntem revize edilerek uygulanmıştır. Uzun süreli maruziyetin sonunda, bir 120 hpf larva, 2 mL E3 ile doldurulmuş 3 cm çapında bir petri tabağına aktarılmıştır. Petri tabağı, dijital kamera cihazı (Nikon DSLR D70s) bulunan bir stereomikroskop (Nikon SMZ1000) altına yerleştirilmiştir. Bir dakika sonra, video kaydına başlanmış ve 10. saniyede larvanın rostral başı bir insülin

veya cam kapiler enjeksiyon iğnesi ile dokunulmuştur. Bu işlem, her larva için üç kez tekrarlanmıştır (video toplam süresi 40 saniye). Değerlendirme, her larvanın kat ettiği mesafe ölçülerek yapılmıştır. Dokunuşa verilen yanıtlar da niceliksel olarak değerlendirilmiştir: 0 puan, larva hareket etmedi; 1 puan, larva bir çeyrek çemberden daha az hareket etti; 2 puan, larva çeyrek ile yarım çember arasında yüzdü; 3 puan, larva yarım çember ile bir çember arasında yüzdü; 4 puan, larva bir çemberden daha fazla yüzdü. Her konsantrasyonda en az beş çatlama larva değerlendirilmiştir. Dijital kayıtlar, LEICA LAS EZ görüntü işleme yazılımı ile analiz edilmiştir.

Gen İfade Analizi

Subletal konsantrasyonlarla tedavi edilen 120 hpf zebra balığı larvaları (1,25 mg/L, 2,50 mg/L, 5,00 mg/L ve 10,0 mg/L) analiz için kullanılmıştır. Toplam RNA ekstraksiyonu için RNeasy Plus Kit (Bio-rad, California, ABD) kullanılmış ve üreticinin protokolü herhangi bir değişiklik yapılmadan takip edilmiştir. Toplam RNA konsantrasyon ölçümü, NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Massachusetts, ABD) ile yapılmıştır. Her bir deneysel gruptan alınan toplam RNA örnekleri, iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad) kullanılarak cDNA'ya dönüştürülmüştür. İfade analizleri, seçilen 18 gen seti üzerinde gerçekleştirilmiştir. Genlerin primer dizileri Tablo 1'de gösterilmektedir. Genler, apoptoz, DNA onarımı, nörotransmisyon (dopamin, 5-hidroksitriptamin ve γ -aminobütirik asit) ve davranışla ilişkili genler olarak seçilmiştir. qPCR reaksiyonu, CFX96 Touch Real-Time PCR Algılama Sistemi (Bio-Rad) kullanılarak ve SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) ile yapılmıştır. Veriler CFX Manager Yazılımı (Bio-Rad) ile analiz edilmiştir. Görelî gen ifadeleri, β -aktin genine normalize edilmiştir.

Tablo 1. qPCR Analizi İçin Tasarlanan 19 Genin Primerleri

Gene	Adverse outcome of action	Forward primer	Reverse primer
<i>casp8</i>	Apoptosis and DNA repair	AAGGACTTTGATCGCAGGAC	TAATCTGCGCAACTGTCTGG
<i>casp8</i>		TATTCAAGCCTGCCAAGGAG	CCGATCAGGAAATCAGCTTC
<i>ifng1</i>		CTGTTTTTCGGGATGGATGAC	AGCTTTGAGCTCTTCGATGC
<i>tp53</i>		GGGCAATCAGCGAGCAAA	ACTGACCTTCCTGAGTCTCCA
<i>rad51</i>		ACTAGCCGTCACCTGCCAGC	ACTGCCCACCAGACCATAACCGTT
<i>dat</i>	Dopamine	AGACATCTGGGAAGGTGGTG	ACCTGAGCATCATACAGGCG
<i>drd1</i>		ACGCTGTCCATCCTTATCTC	TGTCCGATTAAGGCTGGAG
<i>drd3</i>		ATCAGTATCGACAGGTATACAGC	CCAAACAGTAGAGGGCAGG
<i>5ht1aa</i>	5-hydroxytryptamine	ATGAGGATGAGCGGGATGTAG	CAATCAGCCAGGACCACG
<i>5ht1a</i>		ATGAGGATGAGCGGGATGTAG	CAATCAGCCAGGACCACG
<i>5ht1b</i>		CTGTGTCGCCTGCACTTTTC	CAGCCAGATGTCGCAGATG
<i>5ht2c</i>		GCGCTCTCTGTCCTATTTGG	GTAGCGGTTCGAGAGAAATGG
<i>gabral</i>	γ -aminobutyric acid	TCAGGCAGAGCTGGAAGGAT	TGCCGTTGTGGAAGAACGT
<i>gat1</i>		ATGCTGTTTATCCTGTTTCATCCG	TGTTGAAGGGGTTGTAGCTCC
<i>abat</i>		GCGTTCAGGCAAAGCTCT	GCAGGACGGAAACGGAT
<i>gad1b</i>		AACTCAGGCGATTGTTGCAT	TGAGGACATTTCCAGCCTTC
<i>gnrh3</i>	Behavior	TGGTCCAGTTGTTGCTGTTAGTT	CCTGAATGTTGCCTCCATTTC
<i>gnrhr3</i>		AACAGACATGATCCCGAAGG	AGGTTCCCGAACACAAACAG
<i>kiss2</i>		TCAATGGAGCGAAGGCAGTT	CTGTCAGAGTCGCTGGTTGT
<i>β-actin</i>	Housekeeping gene	ACACAGCCATGGATGAGGAAATCG	TCACTCCCTGATGTCTGGGTCGT

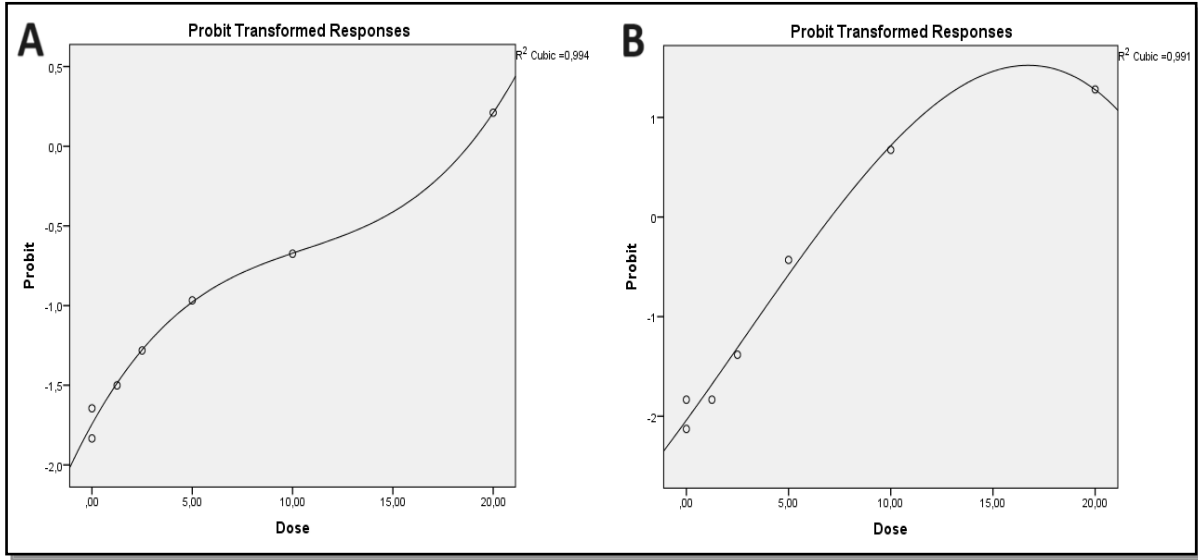
İstatistiksel Analiz

Veriler, ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuş ve betimleyici istatistikler olarak kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklar, kontrol ve sentetik kannabinoid ile tedavi edilen gruplar arasında tek yönlü ANOVA ardından Dunnett's-HSD ve Duncan's-HSD testleri ile belirlenmiştir. Davranışsal sonuçlar, uyarana tepki ve zaman değişkenleri için iki yönlü ANOVA ve ardından Tukey-HSD testi ile analiz edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık, $p < 0,05$ veya $p < 0,01$ olarak kabul edilmiştir. Sonuçlar, SPSS 21,0 yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

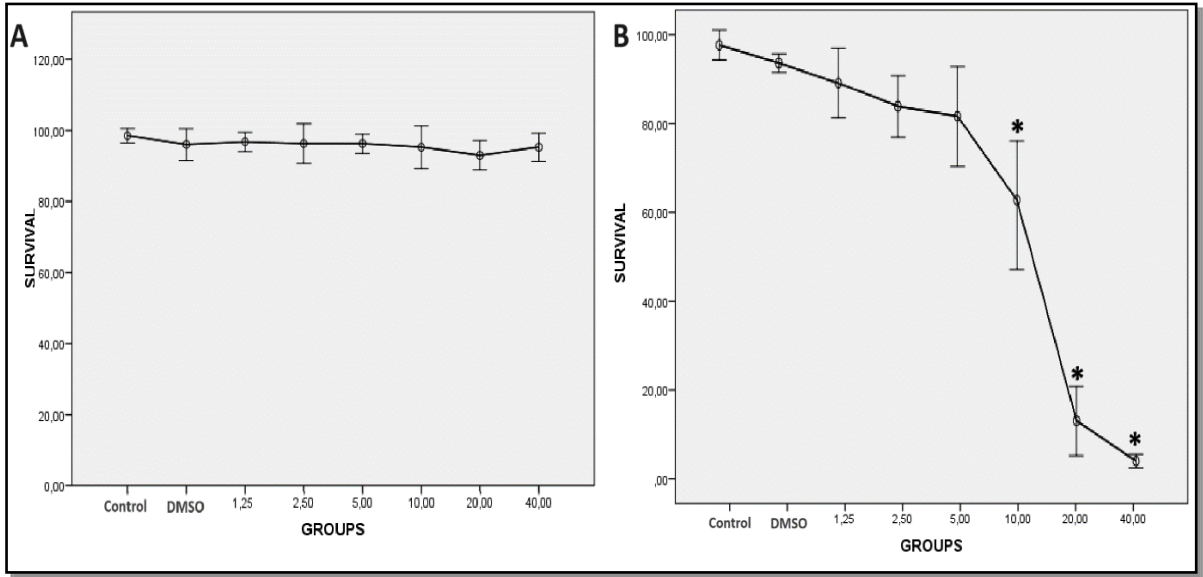
Mortalite

Kısa (24 saat) ve uzun (120 saat) süreli maruz kalma sonunda ölen embriyolar kaydedilmiştir. 24 hpf'de, kannabinoid, zebra balığı embriyolarında ölüm ve anormallik oluşturmamıştır. 120 hpf'de kannabinoidin LC₅₀ ve EC₅₀ değerleri sırasıyla 16,624 mg/L ve 9,083 mg/L olarak bulunmuştur (Şekil 3).



Şekil 3. CUMYL-4CN-BINACA'nın, LC₅₀ (A) ve EC₅₀ (B) değerlerinin hesaplanmasında kullanılan doz-cevap eğrileri (güven aralığı %95)

Kannabinoid maruziyeti sonrası sağ kalım oranları Şekil 4'de gösterilmiştir. Kısa süreli maruziyet (24 saat), sağ kalım oranı üzerinde olumsuz bir etki yaratmamıştır. 120 hpf'de, 10 mg/L'den düşük konsantrasyonlar, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında larvaların sağ kalım oranı üzerinde anlamlı etki göstermemiştir. Buna karşılık, 10,0 mg/L ve 20,0 mg/L konsantrasyonlarındaki kannabinoid, sağ kalım oranlarını düşürmüştür.



Şekil 4. Farklı CUMYL-4CN-BINACA konsantrasyonlarına maruz bırakılan zebra balığı larvalarının kısa süreli (A) ve uzun süreli (B) maruz kalma koşullarında kümülatif sağ kalım oranları (%) Veriler, ortalama $\pm$ standart hata olarak sunulmuştur ($n = 90$). * $p < 0,05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğunu gösterir.

Koryondan Çıkış Oranları

Zebra balığının erken yaşam evrelerinden biri olan koryondan çıkma süreci oldukça kritik bir aşamadır. Koryondan çıkış oranı, gelişimsel toksisiteyi değerlendirmede önemli bir gösterge olarak kabul edilir. Tablo 2, SK'in varlığında zebra balığı embriyolarının koryondan çıkma oranlarını göstermektedir. Kümülatif koryondan çıkma oranı, CUMYL-4CN-BINACA'ya kısa ve uzun süreli maruz kalma altında 60 ve 120 hpf'de gözlemlenmiştir. Kısa süreli maruziyet sürecinde, kannabinoide maruz kalan embriyoların koryondan çıkışı izlenmiş ve herhangi bir gecikme gözlemlenmemiştir. Aksine, uzun süreli maruziyette koryondan çıkma oranı düşük olmuştur. 60 hpf'de, 10,0 ve 20 mg/L CUMYL-4CN-BINACA konsantrasyonlarına maruz kalan embriyoların kümülatif koryondan çıkma oranları sırasıyla %38 ve %14 olarak gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, 10,0 ve 20 mg/L konsantrasyonlarına maruz kalmak, 120 hpf larvalarının koryondan çıkma oranını da azaltmıştır.

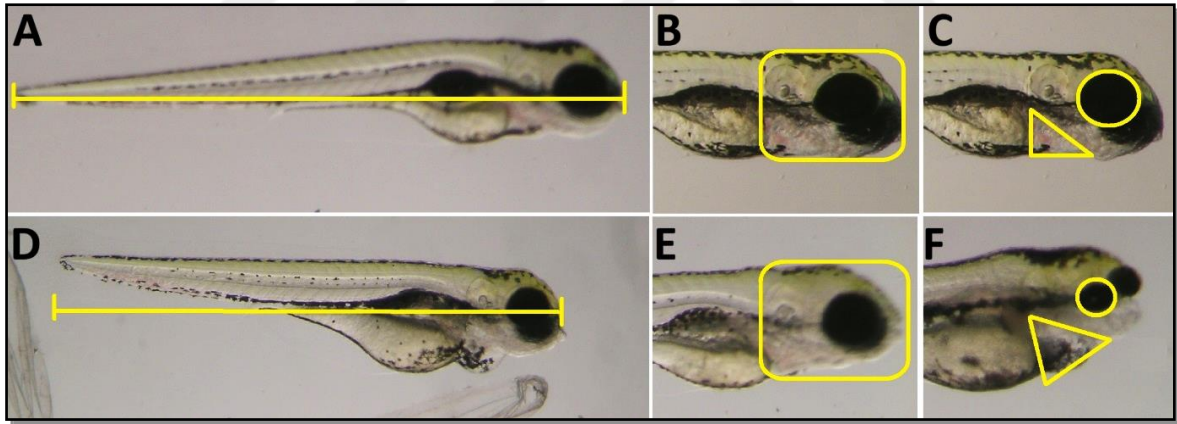
Tablo 2. Farklı Maruz Kalma Sürelerinde CUMYL-4CN-BINACA'nın Koryondan Çıkış Oranına (%) Etkisi

Gruplar	Kısa süreli maruziyet (24 s)		Uzun süreli maruziyet (120 s)	
	60 hpf	120 hpf	60 hpf	120 hpf
Kontrol	64,8±4,7 ^a	96,9±1,6 ^a	67,9±2,6 ^a	96,5±2,3 ^a
DMSO	67,0±2,6 ^a	93,0±3,6 ^a	65,4±4,5 ^a	96,8±0,8 ^a
1,25 mg/L	68,6±2,8 ^a	98,0±1,5 ^a	68,8±1,9 ^a	96,0±1,6 ^a
2,5 mg/L	67,2±2,0 ^a	95,6±3,5 ^a	62,9±3,6 ^a	97,8±0,9 ^a
5,0 mg/L	66,6±3,5 ^a	93,9±3,9 ^a	55,3±3,7 ^a	90,4±2,4 ^a
10,0 mg/L	66,2±2,8 ^a	97,7±1,0 ^a	38,0±4,6 ^{*, b}	49,9±6,5 ^{*, b}
20,0 mg/L	66,0±1,7 ^a	98,6±1,0 ^a	14,2±2,9 ^{*, c}	14,8±2,6 ^{*, c}
40,0 mg/L	68,7±2,0 ^a	97,9±1,3 ^a	0,0±0,0 ^{*, d}	0,0±0,0 ^{*, d}

Veriler, ortalama $\pm$ SD (n = 90) olarak sunulmuştur. Post-hoc Duncan testine göre, aynı sütundaki farklı harflerle belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0,05$). Dunnett testine göre ise, aynı sütundaki yıldız işareti (*) ile belirtilen gruplar ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0,05$).

Morfometrik Analiz

120 saat sonunda deney gruplarındaki larvaların vücut uzunluğu, göz alanı, baş alanı ve perikardiyal alan gibi bazı morfometrik parametreleri ölçülmüştür (Şekil 5).



Şekil 5. Kontrol (A, B ve C) ve maruziyet (D, E ve F) gruplarına ait 120 saat sonrası zebra balığı larvalarının morfometrik özellikleri; A ve D; vücut uzunluğu, B ve E; baş alanı, C ve F; göz alanı (daire) ve perikardiyal alan (üçgen).

Kısa süreli kannabinoide maruz kalan zebra balığı larvalarında, morfometrik parametrelerde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Ancak, uzun süreli kannabinoide maruz kalan zebra balığı larvalarında: vücut uzunluğunun kısaldığı, göz alanının azaldığı ve perikardiyal alanın arttığı gözlemlenmiştir. CUMYL-4CN-BINACA maruziyeti: uzun süreli uygulama gruplarının hiçbirinde larvaların baş alanı üzerinde anlamlı bir etki oluşturmazken, 10 mg/L ve 20 mg/L maruziyet gruplarında daha kısa vücut uzunluğu belirlenmiştir. Benzer şekilde 5,0 mg/L, 10,0 mg/L ve 20,0 mg/L uygulama gruplarında perikardiyal alan artışı ve 10,0 ile 20,0 mg/L uygulama gruplarında daha küçük göz alanı gözlemlenmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. CUMYL-4CN-BINACA Maruziyetinin, 120 hpf Embriyonik Gelişim Döneminde Zebra Balığı Larvalarının Vücut Uzunluğu, Baş, Göz ve Perikardiyal Alanları Üzerindeki Etkileri

Morfometrik parametreler				
Gruplar	Vücut uzunluğu(mm)	Baş alanı (mm ²)	Göz alanı (mm ²)	Perikardiyal alan (mm ²)
Kontrol	3,77±0,26 ^a	0,29±0,02 ^a	0,032±0,002 ^a	0,028±0,003 ^a
DMSO	3,77±0,26 ^a	0,27±0,02 ^a	0,031±0,002 ^a	0,028±0,000 ^a
1,25 mg/L	3,67±0,22 ^a	0,27±0,04 ^a	0,030±0,003 ^a	0,027±0,002 ^a
2,5 mg/L	3,68±0,17 ^a	0,28±0,03 ^a	0,029±0,001 ^a	0,029±0,003 ^a
5,0 mg/L	3,25±0,12 ^a	0,26±0,02 ^a	0,028±0,002 ^a	0,040±0,002 ^{*, b}
10,0 mg/L	2,92±0,13 ^{*, b}	0,29±0,01 ^a	0,021±0,001 ^{*, b}	0,044±0,001 ^{*, c}
20,0 mg/L	2,91±0,17 ^{*, b}	0,29±0,01 ^a	0,019±0,000 ^{*, b}	0,047±0,002 ^{*, c}
40,0 mg/L	0,00±0,00 ^{*, c}	0,00±0,00 ^{*, b}	0,000±0,000 ^{*, c}	0,000±0,000 ^{*, d}

Veriler, ortalama ± standart sapma (SD) (n = 30) olarak sunulmuştur. Post-hoc Duncan testine göre, aynı sütundaki farklı harflerle belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05). Post-hoc Dunnett testine göre ise, aynı sütundaki yıldız işareti (*) ile belirtilen gruplar ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05)

Kalp Atım Hızı

Larvaların kalp atım hızları 48 ve 120 hpf'de kaydedilmiştir. CUMYL-4CN-BINACA'ya kısa süreli maruziyet, kalp atım hızlarında herhangi bir değişikliğe neden olmazken uzun süreli maruziyet ise, 10,0 mg/L ve 20,0 mg/L uygulama gruplarında embriyo/larvaların kalp atım hızını kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azaltmıştır. Buna karşılık 1,25 mg/L, 2,50 mg/L ve 5,0 mg/L konsantrasyonlarındaki CUMYL-4CN-BINACA maruziyeti kalp atım hızlarında anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Tablo 4).

Tablo 4. CUMYL-4CN-BINACA'ya Maruz Kalan Zebra Balığı Embriyolarının, 48 ve 120 hpf Embriyonik Gelişim Dönemlerindeki Kalp Atım Hızları (dakikada atım sayısı)

Gruplar	Kısa Süreli Maruziyet (24 s)		Uzun Süreli Maruziyet (120 s)	
	48 hpf	120 hpf	48 hpf	120 hpf
Kontrol	66,7±1,4 ^a	158,8±2,9 ^a	66,9±2,7 ^a	156,7±1,4 ^a
DMSO	67,6±1,9 ^a	154,7±2,4 ^a	67,0±1,5 ^a	155,8±0,8 ^a
1,25 mg/L	66,9±1,4 ^a	157,6±2,8 ^a	66,5±1,7 ^a	153,8±1,9 ^a
2,5 mg/L	68,4±2,0 ^a	153,4±0,9 ^a	65,9±0,8 ^a	150,9±0,9 ^a
5,0 mg/L	68,2±1,1 ^a	154,5±2,0 ^a	63,4±0,7 ^a	149,4±2,3 ^a
10,0 mg/L	66,8±1,2 ^a	157,3±2,1 ^a	53,3±2,2 ^{*, b}	76,6±0,2 ^{*, b}
20,0 mg/L	66,4±1,5 ^a	150,4±2,0 ^a	44,6±3,3 ^{*, c}	64,5±4,0 ^{*, c}
40,0 mg/L	67,4±1,5 ^a	151,3±2,0 ^a	22,3±2,6 ^{*, d}	00,0±0,0 ^{*, d}

Veriler, ortalama ± SD (n = 10) olarak sunulmuştur. Post-hoc Duncan testine göre , aynı sütundaki farklı harflerle belirtilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05). Post-hoc Dunnett testine göre ise, aynı sütundaki yıldız işareti (*) ile belirtilen gruplar ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05).

Morfolojik Değişiklikler

CUMYL-4CN-BINACA için hesaplanan teratojenik indeks değeri 1,830'dur. Bu değer CUMYL-4CN-BINACA'nın zebra balığı üzerinde teratojen etkisinin olduğunu göstermektedir. Tablo 5 ve Şekiller 6-9, CUMYL-4CN-BINACA uygulamasının ardından 24-120 hpf embriyonik gelişim dönemi içinde gözlemlenen çeşitli teratojenik özellikleri göstermektedir. CUMYL-4CN-BINACA'ya, kısa süreli maruz kalan embriyolarda morfolojik veya gelişimsel herhangi bir anormallik bulunmamıştır. Benzer şekilde, 1,25 mg/L ve 2,5 mg/L konsantrasyonlarında, embriyolar uzun süreli maruz kalma süresince kontrol grubuna benzer şekilde normal gelişim göstermiştir. Diğer taraftan, 5,0 ile 20 mg/L arasındaki konsantrasyonlarda CUMYL-4CN-BINACA'ya uzun süreli maruz kalan embriyolarda, konsantrasyona bağlı olarak çeşitli morfolojik değişiklikler gözlemlenmiştir. En sık gözlemlenen malformasyonlar, omurga anormallikleri, dolaşım bozuklukları ve ödemlerdir (Tablo 5).

Tablo 5. CUMYL-4CN-BINACA Maruziyetinden 24-120 Saat Sonra Belirlenen Deformitelerin Yüzdesi

Maruz kalma süresi	Konsantrasyon (mg / L)	KAY (24 saat)	ASO (24 saat)	AKA (48 saat)	VKÖ (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	1,4±0,4	1,0±0,2	3,5±0,4	1,2±0,1	0,9±0,0	1,0±0,1	0,2±0,1	1,5±0,4	2,1±0,4	2,5±0,4	5,4±0,5
	DMSO	1,8±0,2	1,0±0,2	3,8±0,4	1,5±0,2	0,9±0,1	0,9±0,1	0,2±0,1	1,9±0,3	2,3±0,3	2,8±0,4	5,2±0,9
	1,25	1,1±0,2	1,2±0,2	3,7±0,6	1,3±0,3	1,0±0,3	1,0±0,3	0,1±0,0	1,9±0,4	2,0±0,4	2,6±0,4	5,9±0,7
	2,5	1,7±0,3	1,3±0,2	3,6±0,4	1,2±0,3	1,0±0,1	1,6±0,2	0,1±0,0	2,1±0,1	2,2±0,5	2,6±0,4	5,8±0,6
	5,0	1,4±0,3	1,0±0,3	4,3±0,3	1,3±0,2	1,3±0,3	1,5±0,1	0,1±0,0	2,4±0,2	2,2±0,3	3,3±0,3	5,7±0,5
	10,0	1,3±0,2	1,4±0,2	4,5±0,4	1,2±0,2	1,5±0,2	1,6±0,2	0,2±0,0	2,4±0,3	2,5±0,5	3,5±0,4	5,9±0,4
	20,0	1,6±0,4	1,7±0,2	4,4±0,3	1,4±0,1	1,3±0,3	1,5±0,2	0,2±0,0	2,6±0,4	2,4±0,3	3,8±0,3	6,3±0,4
	40,0	1,9±0,4	1,8±0,3	4,3±0,4	1,5±0,3	1,6±0,4	1,7±0,1	0,2±0,0	2,6±0,3	2,5±0,4	3,8±0,3	6,2±0,3
120s (Subakut)	Kontrol	1,4±0,3	1,2±0,2	4,3±0,4	1,0±0,0	1,1±0,1	1,3±0,2	0,1±0,0	2,3±0,3	2,3±0,1	2,9±0,5	4,5±0,1
	DMSO	1,8±0,1	1,1±0,3	4,7±0,9	1,2±0,1	1,0±0,1	1,5±0,1	0,2±0,0	2,2±0,2	2,4±0,2	3,0±0,3	4,0±0,3
	1,25	1,3±0,1	1,4±0,3	4,7±0,7	1,2±0,3	1,2±0,2	1,3±0,2	0,2±0,0	2,2±0,2	2,3±0,2	3,0±0,5	4,8±0,4
	2,5	1,7±0,2	1,3±0,2	5,4±0,4	1,3±0,1	15,5±0,4*	1,3±0,2	11,1±0,9*	2,2±0,2	2,3±0,5	2,9±0,4	5,7±0,4
	5,0	1,4±0,1	1,7±0,2	14,3±2,5*	13,5±2,8*	18,5±1,3*	1,7±0,2	13,0±1,8*	25,7±3,2*	38,7±4,5*	23,3±2,3*	38,3±4,6*
	10,0	1,5±0,3	1,4±0,2	18,3±1,4*	28,7±2,6*	34,4±3,2*	24,2±3,2*	26,7±2,5*	41,5±3,4*	47,0±6,3*	44,0±3,4*	60,5±4,8*
	20,0	1,7±0,3	1,8±0,2	39,8±4,4*	36,6±5,4*	49,7±6,2*	55,0±3,1*	34,3±3,3*	59,0±5,5*	68,0±3,5*	46,5±3,8*	75,5±4,8*
	40,0	1,6±0,3	1,7±0,3	63,8±3,9*	60,0±2,4*	65,7±5,1*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*

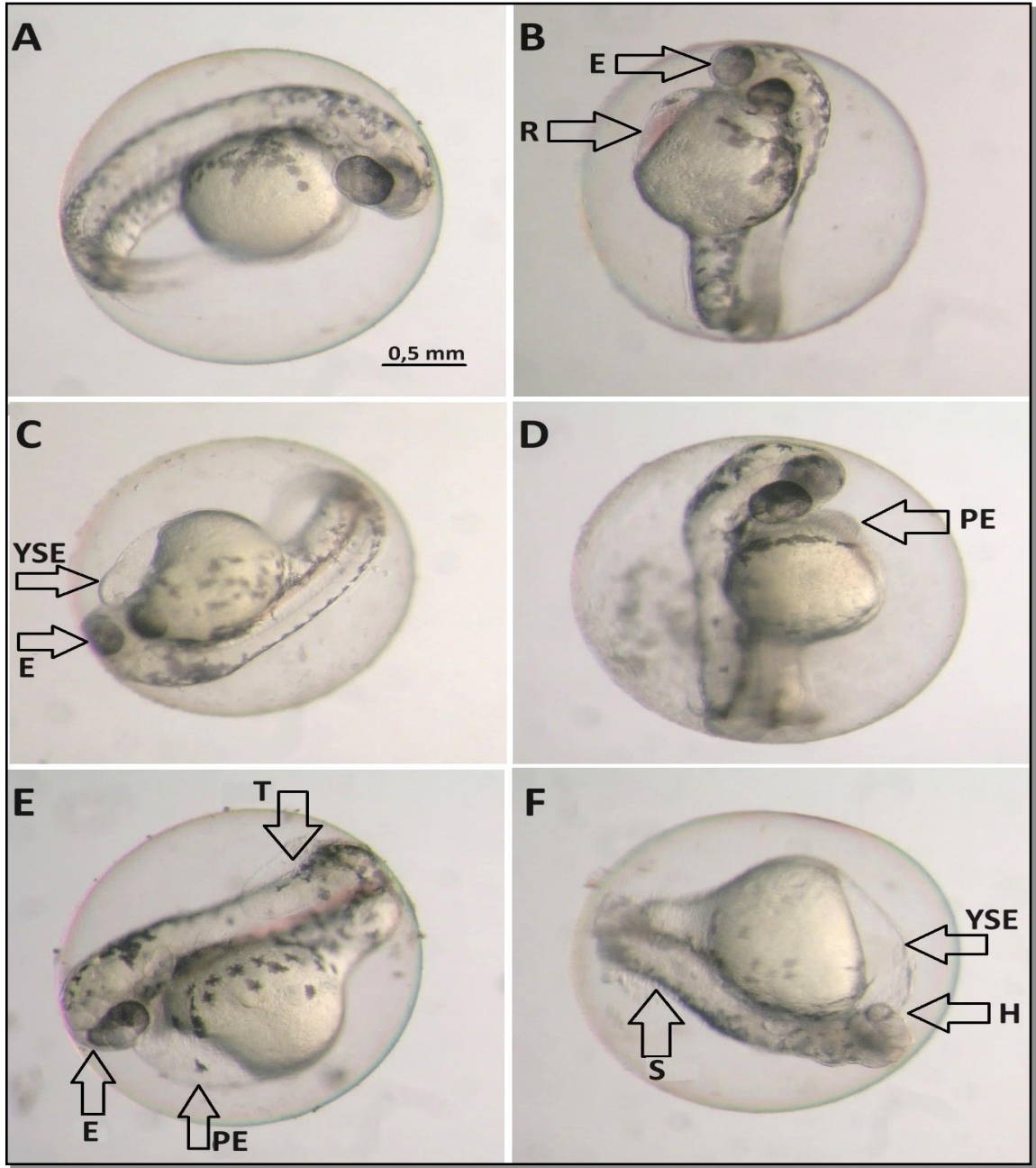
Tüm anormallikler, belirtilen zaman noktasındaki canlı embriyolara dayalı teratojenik etkileri gösterir. Veriler ortalama $\pm$ SD (n=90) olarak sunulmuştur. Tek yönlü Anova Dunnett'e göre, aynı sütunda yıldız işareti olan gruplar ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$). KAY; Kuyruk ayrılması yok, ASO; Anormal somit oluşumu, AKA; Anormal kan akışı, VKÖ; Vitellüs 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 deformiteleri.

Anormal fenotipler ve açıklamalar şekiller 6-9 'de gösterilmiştir. 48 hpf'de kontrol grubunda, kalp atımı kolayca izlenebilir. Göz ve vücutta pigmentasyon başlamış durumdadır (Şekil 6A). Uzun süreli maruziyet gruplarında, gözlerde küçülme (Şekil 6B, 6C, 6E), yumurta kesesinde biriken kırmızı kan hücreleri (Şekil 6B), yumurta kesesi ödemi (Şekil 6C, 6F), perikardiyal ödem (Şekil 6D, 6E), kısalmış kuyruk oluşumu (Şekil 6E), zayıf pigmentasyon, omurga ve kafa deformiteleri (Şekil 6F) gözlemlenmiştir.

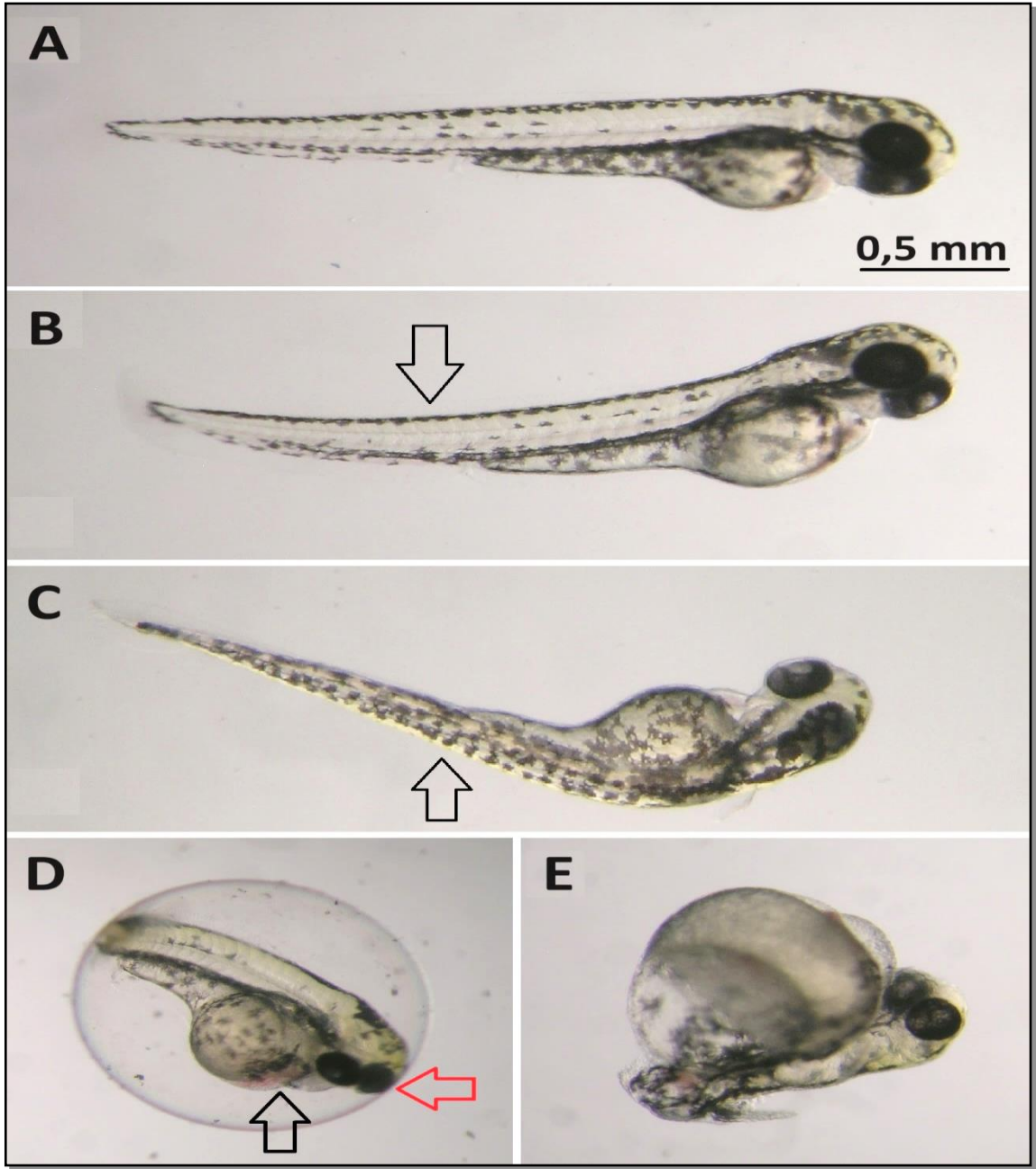
72 hpf'de kontrol grubundaki larvalar, normal yüzme aktiviteleri göstermiş ve kan dolaşımı çok belirgin bir şekilde izlenmiştir (Şekil 7A). Kanabinoide maruz kalan larvalarda, lordoz (Şekil 7B) ve skolyoz (Şekil 7C), yumurtadan çıkmada geçikme, yumurta kesesi ödemi, gözlerin küçülmesi (Şekil 7D) ve vücut şeklinde ciddi anormallikler tespit edilmiştir.

96 hpf'de kontrol, DMSO, 1.25 mg/L ve 2.5 mg/L kanabinoide maruz kalan larvalar normal gelişim gösterdi. Yani, yumurta kesesi azalmaya başladı, larvanın ksantofor renginin daha belirgin hale gelmiş ve larvanın çenesi ayrılmaya başlamıştır (Şekil 8A, 8B). CUMYL-4CN-BINACA, 96 saatteki larvalarda özellikle vücut eksenini etkileyen çeşitli deformiteler gözlemlenmiştir. Uzun süreli maruz kalma, bu larvalarda vücut uzunluğunda kısalma (Şekil 8C, 8D, 8G, 8H), kıvrık kuyruk (Şekil 8D), zayıf pigmentasyon (Şekil 8E), kifoz (Şekil 8F), omurga deformitesi (Şekil 8G), göz küçülmesi ve eğik eksen (Şekil 8H) gibi sorunlara yol açtı.

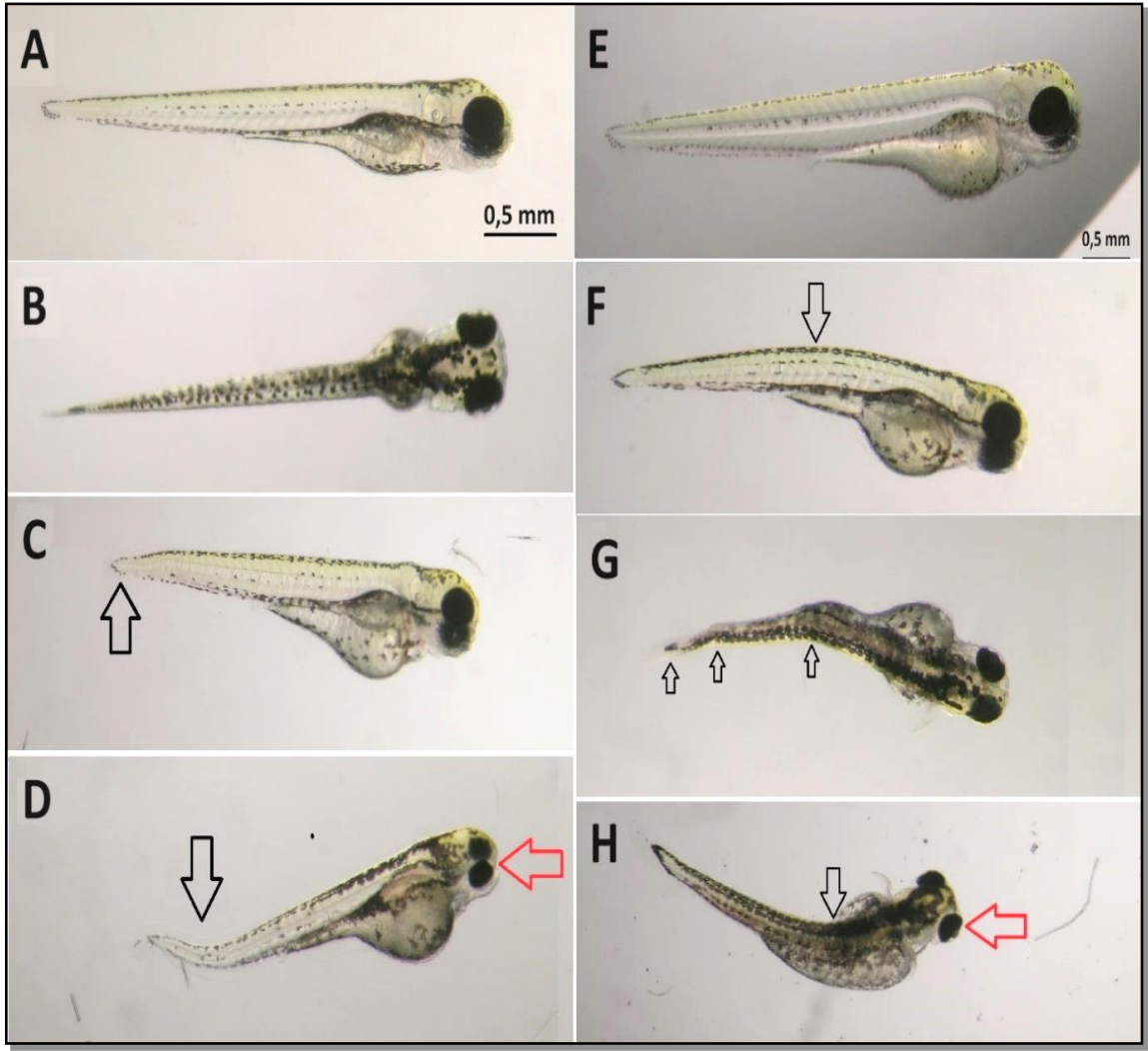
120 hpf'de kontrol grubundaki zebra balıklarının omurga şekli normal, yüzme kesesi şişmiş, pektoral yüzgeç gelişimi ve pigmentasyon tam olarak gözlenmiştir (Şekil 9A, 9B). Uzun süreli 10.0-20.0 mg/L CUMYL-4CN-BINACA 'ya maruz kalmış embriyoların çoğu 120 hpf'de çoğunlukla koryondan çıkmamıştır (Şekil 9C, 9D). Ayrıca CUMYL-4CN-BINACA'ya maruz kalan larvalarda çeşitli omurga deformiteleri gözlemlenmiştir (Şekil 9D, 9H). Omurga deformiteleri arasında kırık omurga (Şekil 9E), kıvrık kuyruk (Şekil 9H) ve lordoz (Şekil 9I) yer almaktadır. Bunların dışında, CUMYL-4CN-BINACA uygulanmış 120 hpf'deki larvalarda, kısalmış kuyruk yüzgeci (Şekil 9E), zayıf pigmentasyon (Şekil 9G), şişmemiş ve gelişmemiş yüzme kesesi (Şekil 9F, 9G) gibi anormallikler de tespit edildi.



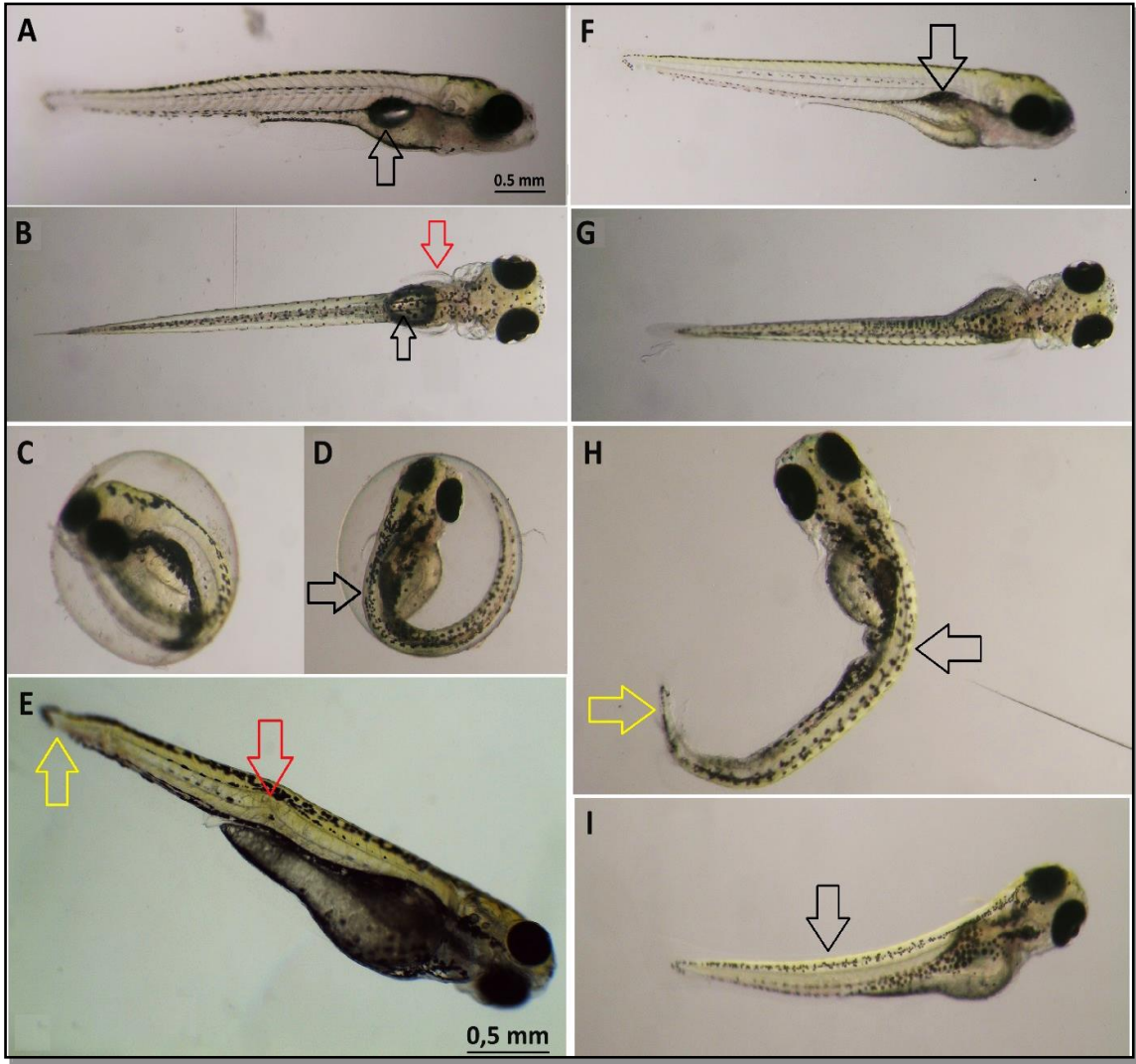
Şekil 6. 48 hpf zebra balığı larvalarının örnek görüntüleri: A) Kontrol grubu. B) 5,0 mg/L uygulama grubu: küçülmüş gözler (E) ve yumurta kesesinde biriken kırmızı kan hücreleri (R). C) 5,0 mg/L uygulama grubu: küçülmüş gözler (E) ve yumurta kesesi ödemi (YSE). D) 5,0 mg/L uygulama grubu: perikardiyal ödem (PE). E) 10,0 mg/L uygulama grubu: kısalmış kuyruk (T), küçülmüş gözler (E) ve perikardiyal ödem (PE). F) 10,0 mg/L uygulama grubu: şiddetli yumurta kesesi ödemi (YSE), zayıf pigmentasyon, deforme olmuş omurga (S) ve kafa (H).



Şekil 7. 72 hpf zebra balığı larvalarının örnek görüntüleri: A) Kontrol grubu. B) 5 mg/L uygulama grubu: lordoz (ok). C) 10,0 mg/L uygulama grubu: skolyoz (ok). D) 10,0 mg/L uygulama grubu: yumurta kesesi ödemi (siyah ok) ve küçülmüş göz (kırmızı ok) ile koryondan çıkmamış larva. E) 10,0 mg/L uygulama grubu: şiddetli vücut defekti (ödemler, kısa omurga, kıvrık kuyruk).



Şekil 8. 96 hpf zebra balığı larvalarının örnek görüntüleri: A) Kontrol grubu (yan görünüm).B) Kontrol grubu (dorsal görünüm) C) 5,0 mg/L uygulama grubu: kısalmış uzunluk (ok kuyruğu göstermektedir).D) 10,0 mg/L uygulama grubu: kısalmış uzunluk ve kıvrık kuyruk (ok).E) 5,0 mg/L uygulama grubu: zayıf pigmentasyon, F) 5,0 mg/L uygulama grubu: hafif kifoza (ok).G) 10,0 mg/L uygulama grubu: kısalmış uzunluk ve omurga deformitesi (oklar).H) 20,0 mg/L uygulama grubu: kısalmış uzunluk, küçülmüş gözler (kırmızı ok) ve eğik eksen (siyah ok).



Şekil 9. 120 hpf zebra balığı larvalarının örnek görüntüleri: A) Kontrol grubu (yan görünüm), şişmiş yüzme kesesi (ok). B) Kontrol grubu (dorsal görünüm), şişmiş yüzme kesesi (siyah ok) ve göğüs yüzgeci (kırmızı ok). C) 10,0 mg/L uygulama grubu: koryondan çıkmamış larva. D) 20,0 mg/L uygulama grubu: omurga deformitesi (ok) olan koryondan çıkmamış larva. E) 10,0 mg/L uygulama grubu: kırık omurga (kırmızı ok) ve kısalmış kuyruk yüzgeci (sarı ok). F) 5,0 mg/L uygulama grubu: zayıf pigmentasyon ve şişmemiş yüzme kesesi (ok). G) 10,0 mg/L uygulama grubu: gelişmemiş yüzme kesesi. H) 10,0 mg/L uygulama grubu: omurga deformitesi (siyah ok) ve kıvrık kuyruk (sarı ok). I) 5,0 mg/L uygulama grubu: lordoz (ok).

Davranışsal Analiz

CUMYL-4CN-BINACA'nın neden olduğu davranışsal anormallikler, TER testi ile niceliksel olarak milimetre (mm) cinsinden ve niteliksel olarak 4 puanlı puanlama sistemi kullanılarak değerlendirilmiştir. CUMYL-4CN-BINACA'ya kısa süreli maruz kalan larvalarda, TER değişiklikleri bulunmamıştır. 1,25 mg/L ve 2,5 mg/L konsantrasyonlarında, larvalar uzun süreli maruz kalmada kontrol grubuna benzer şekilde normal yüzme davranışı göstermiştir. Diğer taraftan, CUMYL-4CN-BINACA'ya uzun süreli maruz kalan larvalar, 5,0 mg/L ile 20 mg/L arasındaki konsantrasyonlarda yüzme mesafesinde anlamlı bir azalma göstermiştir (Tablo 6). Örneğin, 10 mg/L grubunun ortalama yüzme mesafesi, kontrol grubuna göre %79'luk anlamlı bir azalma göstermiştir. Benzer şekilde, 10 mg/L konsantrasyonundaki yüzme mesafesi, niceliksel analizde de anlamlı şekilde azalmıştır.

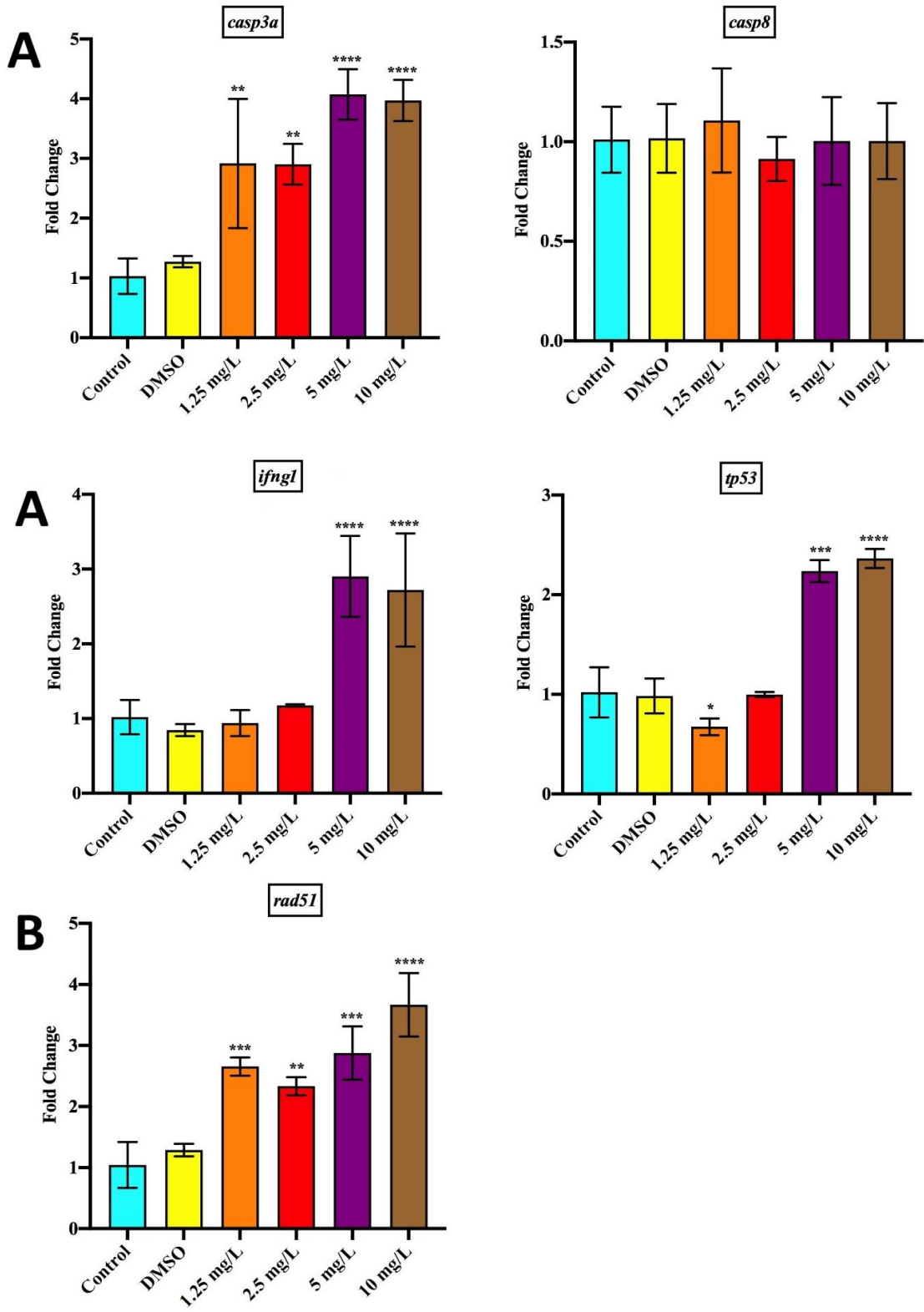
Tablo 6. CUMYL-4CN-BINACA'ya Maruz Kalan Zebra Balığı Embriyolarının TER Değerlendirmesi

Gruplar	Kısa Süreli Maruziyet (24 s)		Uzun Süreli Maruziyet (120 s)	
	Yüzme Mesafesi (mm)	Yüzme Mesafesi (puan)	Yüzme Mesafesi (mm)	Yüzme Mesafesi (puan)
Kontrol	42,75±1,70 ^a	2,35±0,19 ^a	42,00±2,58 ^a	2,30±0,21 ^a
DMSO	42,00±1,82 ^a	2,15±0,12 ^a	41,50±2,38 ^a	2,15±0,12 ^a
1,25 mg/L	40,25±1,25 ^a	2,45±0,12 ^a	39,50±4,20 ^a	2,10±0,14 ^a
2,5 mg/L	42,75±1,70 ^a	2,27±0,17 ^a	36,50±4,54 ^a	1,95±0,12 ^a
5,0 mg/L	43,00±1,82 ^a	2,35±0,20 ^a	17,50±6,45 ^{b,*}	1,57±0,43 ^{b,*}
10,0 mg/L	42,75±1,70 ^a	2,22±0,22 ^a	8,75±1,50 ^{c,*}	0,47±0,27 ^{c,*}
20,0 mg/L	41,00±2,70 ^a	2,20±0,18 ^a	0,90±0,80 ^{d,*}	0,08±0,00 ^{d,*}
40,0 mg/L	42,75±1,70 ^a	2,32±0,17 ^a	nd	nd

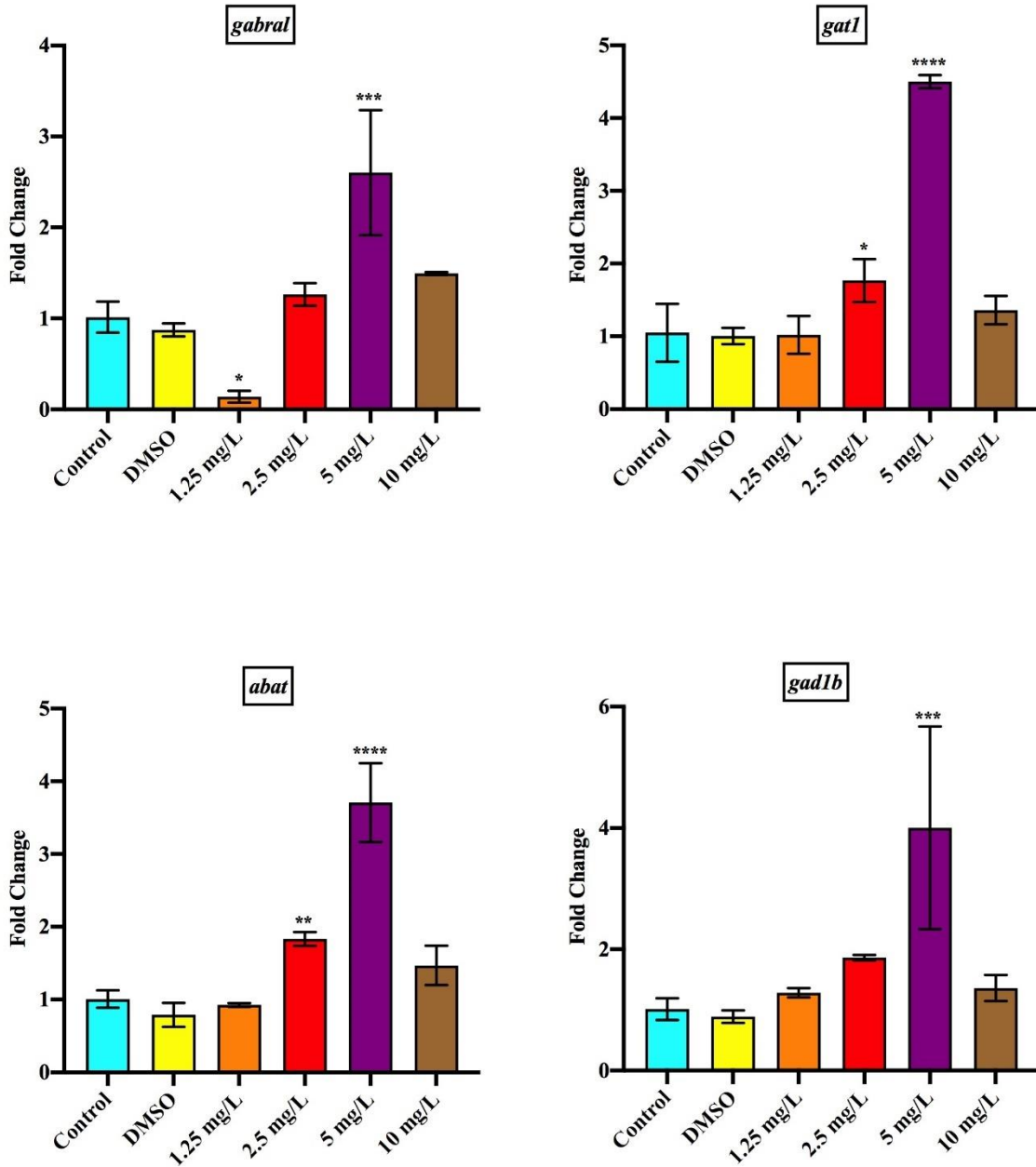
Veriler ortalama ± SD (n = 6) olarak sunulmuştur. Post-hoc Duncan testine göre, aynı sütunda farklı harfler ile gösterilen gruplar arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05). Post-hoc Dunnett testine göre, aynı sütunda yıldız işareti ile belirtilen gruplar ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05). Nd: belirlenmedi.

İlgili Genlerin Ekspresyonları

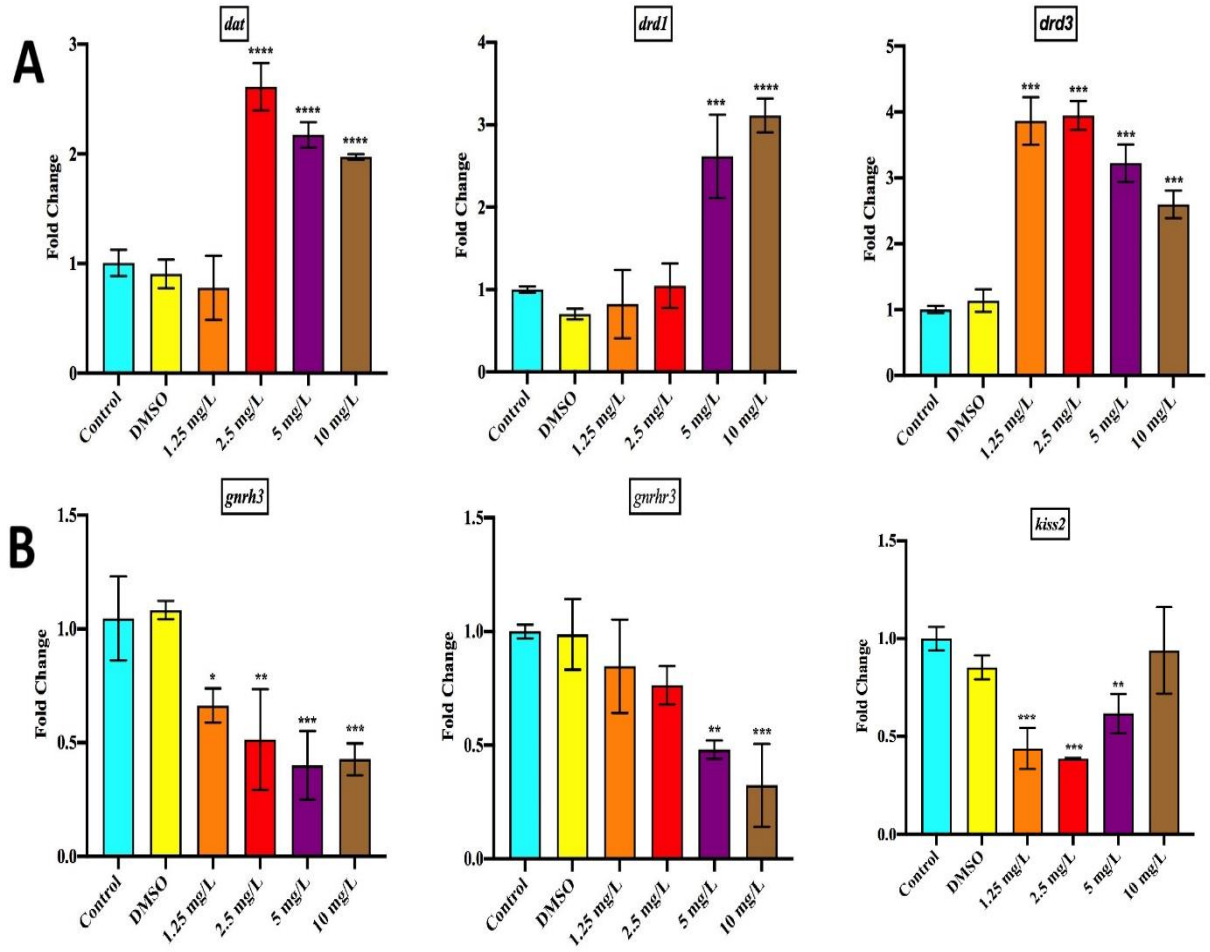
Şekil 10-13'de gösterildiği gibi, dopamin (DA), 5-hidroksitriptamin (5-HT), γ -aminobutirik asit (GABA), davranış, apoptoz ve DNA onarımı ile ilgili genlerin mRNA seviyeleri, 120 saat boyunca (uzun süreli) kannabinoid subletal dozlarına maruz bırakılan zebra balığı larvalarında değerlendirilmiştir. 24 saatlik (kısa süreli) maruziyet sonrası ilgili genlerde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Apoptoz ve DNA onarımı ile ilgili genlerin, (*casp3a*, *casp8*, *ifng1*, *tp53* ve *rad51*) ekspresyonu da anlamlı şekilde değişmiştir (Şekil 10). Örneğin, *casp3a*, *ifng1*, *tp53* ve *rad51* mRNA seviyeleri, kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde artmıştır. *casp8* seviyesindeki artış ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Nörotransmisyon ile ilgili genlerin, ekspresyon seviyelerinde de anlamlı farklar bulunmuştur (GABA; *gabral*, *gat1*, *abat*, *gad1b*, DA; *dat*, *drd1*, *drd3*, 5-HT; *5ht1aa*, *5ht1b*, *5ht2c*). *Gabra1*, *gat1*, *abat* ve *gad1b* mRNA'ları, 2,5 ve 5,0 mg/L gruplarında artmış ve sonra 10.0 mg/L grubunda azalmıştır (Şekil 11). Maruz kalan gruplardaki DA ile ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri, kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde artmıştır (Şekil 12A). Diğer yandan, yüksek konsantrasyonlardaki CUMYL-4CN-BINACA ile maruziyet sonrasında davranışla ilgili genler olan *gnrh3* ve *gnrhr3*'ün ekspresyon seviyeleri anlamlı şekilde azalmıştır. *kiss2* ekspresyon seviyeleri, 2,5 ve 5,0 mg/L konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre daha düşük olmuştur (Şekil 12B). *5ht1a*, *5ht1b* ve *5ht2c* genlerinin mRNA seviyeleri anlamlı şekilde artarken, *5ht1aa* mRNA'sı azalmıştır (Şekil 13). DMSO grubunda hiçbir genin ekspresyonunda kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Şekil 10-13).



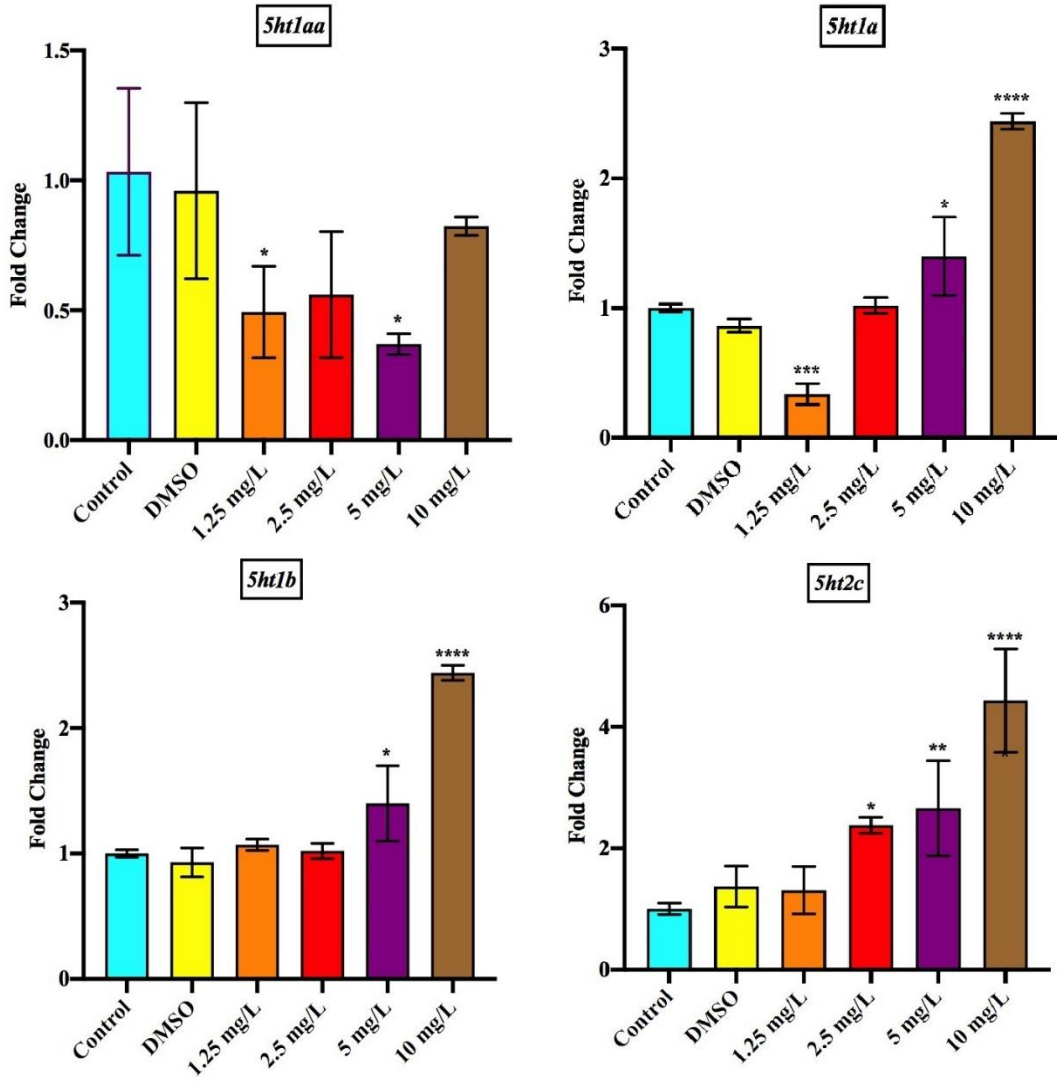
Şekil 10. CUMYL-4CN-BINACA maruziyetinin 120 hpf zebra balığı larvalarındaki apoptoz (A) ve DNA onarımı (B) ile ilgili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri, Veriler, ortalama $\pm$ standart sapma (n=25) olarak gösterilmiştir. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı fark.



Şekil 11. CUMYL-4CN-BINACA maruziyetinin 120 hpf zebra balığı larvalarındaki, GABA ile ilgili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri. Veriler, ortalama $\pm$ standart sapma (n=25) olarak gösterilmiştir.*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı fark.



Şekil 12. CUMYL-4CN-BINACA maruziyetinin 120 hpf zebra balığı larvalarındaki, dopamin (A) ve davranış (B) ile ilgili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri. Veriler, ortalama $\pm$ standart sapma (n=25) olarak gösterilmiştir. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı fark.



Şekil 13. CUMYL-4CN-BINACA maruziyetinin 120 hpf zebra balığı larvalarındaki, 5-hidroksitriptaminle ilgili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkileri. Veriler; ortalama $\pm$ standart sapma (n=25) olarak gösterilmiştir. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı fark.

Tartışma

Bu çalışma, CUMYL-4CN-BINACA'nın zebra balığı embriyoları üzerindeki etkilerini, kısa ve uzun süreli maruziyet sonrası çeşitli parametre ile incelemiştir. Sonuçlar, CUMYL-4CN-BINACA'nın embriyonik gelişim bozukluklarına, larvalarda davranış değişikliklerine ve bazı önemli genlerin ekspresyonunda değişikliklere yol açabileceğini göstermiştir. Kannabinoide 120 saat boyunca maruz bırakılan embriyolar, bir dizi gelişimsel değişiklik sergilemiştir. Mevcut bulgular şu şekilde özetlenebilir: CUMYL-4CN-BINACA uygulanan embriyolar, 1) daha kısa larva vücut boyları, 2) azalmış kalp atım hızı, 3) sağ kalım oranlarında azalma, 4) hafif morfolojik anormallikler, 5) koryondan çıkmamış larvalar, 6) dokunma uyarılarına azalmış tepki oranları ve 7) bazı önemli genlerin ekspresyonundaki değişiklikler sergilemiştir. CUMYL-4CN-BINACA, zebra balığı embriyolarında ölüm ve morfolojik değişikliklere yol açmış ve bu olumsuz etkiler, konsantrasyon ve zamanla orantılı olarak artmıştır. 120 hpf'de CUMYL-4CN-BINACA'nın LC50 ve EC50 değerleri sırasıyla 16,624 mg/L ve 9,083 mg/L olarak belirlenmiştir. CUMYL-4CN-BINACA üzerine yapılan çok az sayıda toksisite çalışması bulunmaktadır (Lafzi et al., 2024a; Lafzi et al., 2024b) ve LC50 değeri hakkında herhangi bir veri bulunmamaktadır. LC50 değeri, bu çalışmada ilk kez verilmiştir. Benzer sonuçlar, tetrahidrokanabinol (THC) ve kannabidiol (CBD) gibi diğer yaygın kannabinoidler ile yapılan çalışmalarda da gözlemlenmiştir. Ancak, THC ve CBD'nin etkilerinin daha olumsuz olduğu görülmektedir. CUMYL-4CN-BINACA'nın LC50 değeri (16,624 mg/L), THC (3,65 mg/L) ve CBD (0,53 mg/L) ile karşılaştırıldığında daha yüksek bulunmuştur (Carty et al., 2019).

Bu sonuçlar özellikle morfolojik ve gelişimsel değişiklikler açısından CUMYL-4CN-BINACA'nın embriyotoksitelerine dair ilk raporu sunmaktadır. Bu durum kannabimimetiklerin olumsuz etkilerini araştıran zebra balığı çalışmalarında da gözlemlenmiştir. THC/CBD ile tedavi edilen zebra balığı embriyoları, larva uzunluklarında kısalması, yaşam süresi, koryondan çıkış ve kalp atım hızlarında azalma göstermiştir (Ahmet et al., 2018). Akhtar et al., (2013), Ayrıca THC, SK'ler CP 55940 ve WIN'in zebra balığı embriyolarında omurga eğriliği, vitellus kesesi ve perikardiyal ödemler, yüzme kesesi şişmemesi ve çeşitli deformitelere neden olduğu belirtilmiştir (Chatzimitakos et al.,2022), THC'nin akut toksisitesinin LC₅₀ olarak 1,54 mg/L olduğunu ve fenotip üzerinde kuyruk eğriliği, perikardiyal ödem gibi olumsuz etkilerin gözlemlendiğini belirlemiştir. CBD ve THC, benzer olumsuz morfolojik etkiler (ödemler, omurga eğriliği, göz/çene/burun/gövde/yüzgeç anormallikleri, yüzme kesesi şişmemesi ve davranışsal bozukluklar) göstermiştir (Carty et al., 2018). Ayrıca, zebra balığı embriyolarının embriyonik

gelişim sırasında kodein ve morfine maruz kalması durumunda göz boyutunda azalma tespit edilmiştir (Cadena et al., 2021). Sentetik kannabinoid 5F-APINAC, zebra balığı larvalarında koryondan çıkamamış larvalar, kıvrık kuyruk ve hiperpigmentasyon gibi çeşitli morfolojik ve gelişimsel değişikliğe neden olmuştur (Markin et al., 2021). Ayrıca, (Chousidis et al., 2020) CBN'ye maruz kalan zebra balığı embriyolarında doza bağımlı bir şekilde perikardiyal ödem, yumurta kesesi deformiteleri, kuyruk bükülmesi, kan akışında azalma ve ip benzeri kalp oluşturduğunu bildirmiştir. İlk oluşan organ kalptir ve kalp, embriyo gelişiminde kritik bir rol oynar (Liu ve Stainer, 2012), kalp atış hızının kalp fonksiyonunda önemli bir parametre olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada CUMYL-4CN-BINACA, zebra balığı embriyolarında perikardiyal ödem oluşturmuş ve kalp atış hızını azaltmıştır. Benzer sonuçlar, diğer çalışmalardan da elde edilmiştir (Chousidis et al., 2020). CBN'ye maruz kalan zebra balığı embriyolarının kalp atış hızının doz bağımlı olarak azaldığını rapor etmiştir. Bu durum perikardiyal ödemden kaynaklanan artan basınca bağlıdır. Çünkü, artan basınç kalbi sıkıştırır ve kalp atım hızı düşer. Perikardiyal ödemin varlığı doz bağımlıdır ve kalp atış hızındaki azalma ile orantılıdır (Chousidis et al., 2020). Diğer araştırmacılar da THC ve CBD'ye maruz kalmanın ardından kalp atım hızında anlamlı bir azalma bulmuşlardır (Ahmed et al., 2018).

Kannabimimetiklerin embriyo gelişimi üzerindeki olumsuz etkileri farklı hayvan modelleriyle de gösterilmiştir. THC'ye maruz kalan gebe tavşanlarda, embriyo ölüm oranlarını artırdığı bulunmuştur (Rosenkrantz et al., 1986). Ayrıca, (Rosenkrantz, 1999), THC ve marihuananın, kemik gelişim bozuklukları, fetal rezorbsiyon, hidronefroz, hidrosefali ve yarı damak oluşumunu artırdığını rapor etmiştir. Sentetik bir kannabinoid olan HU 210, civciv embriyolarında ölüm oranlarında artış ve vücut uzunluğu, embriyo ve beyin ağırlığında azalmaya yol açmıştır (Gustafsson ve Jacobson, 2019). Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 1997), esrar tüketiminin doğumda boy kısalığı, kilo kaybına neden olabileceğini rapor etmiştir. Gilbert et al., (2016), sentetik kannabinoidlerin potansiyel teratojenik etkisi olduğunu belirtmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz gelişimsel bulgular, yukarıda bahsedilen çalışmaların sonuçlarıyla tutarlı görünmektedir. Bu çalışma, CUMYL-4CN-BINACA maruziyetinin embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin olduğunu göstermektedir.

120 hpf zebra balığı larvalarında, sindirim sistemi tamamen gelişmiş ve yüzme kesesi şişmiştir (Vaz et al., 2019). Larvaların davranışları da gelişimin ilk 120 saati boyunca hızla değişir (Guzman et al., 2020). Bu nedenle, larvalar, zebra balığındaki kannabinoidlerin etkilerine yönelik davranışsal çalışmalarda tercih edilmektedir. Bu çalışmada, CUMYL-4CN-BINACA'ya uzun süre maruz bırakılan larvalarda TER davranışında kat edilen mesafe de bir değişiklik gözlemlenmiştir. Bulgularımız, zebra balığında kannabinoidleri test eden önceki

çalışmalarla iyi bir uyum içindedir. Chatzimitakos et al., (2022), THC konsantrasyonu arttıkça hareket edilen mesafenin azaldığını kanıtlamıştır. Başka bir çalışmada, THC'nin 5 günlük larvalarında lokomotor aktiviteyi azalttığı gözlemlenmiştir (Achenbach et al., 2018). CBN ile muamele edilen 5-7 günlük zebra balığı, mekanik kaçış tepki testinde hareket mesafesinin azaldığını göstermiştir (Chousidis et al., 2020). Ayrıca, Hasumi et al., (2020), CBD'nin 4-6 günlük zebra balığı larvalarında hareket hızı ve toplam hareket mesafesini azalttığını bildirmiştir. Başka bir çalışmada, zebra balığı embriyoları kodein ve morfin uygulanmış ve 7 günlük larvaları, ışık:karanlık döngüsü testlerinde yüzme hareketinin azaldığı davranışsal bozukluklar göstermiştir (Cadena et al., 2021). THC ve CBD, 4-5 günlük larvalarda sinirsel aktiviteyi ve lokomotor aktiviteyi belirgin şekilde azaltmıştır (Carty et al., 2019). Bu bulgular, yetişkin zebra balığı üzerinde bildirilen sonuçlarla tutarlıdır (Connors et al., 2014; Jensen et al., 2018; Dahlen et al., 2021).

CUMYL-4CN-BINACA maruziyetinin zebra balığı embriyolarında yol açtığı gelişimsel toksisitenin moleküler mekanizmasını daha iyi araştırmak amacıyla, apoptoz, DNA onarımı, davranış ve nörotransmisyonla ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. GABA'daki anormalliklerin nörolojik bozukluklarla ilişkili olduğu bilinmektedir (Fontes et al., 2018). *gat1*, *gabra1*, *gad1b*, *abat* ve *glra* genleri, GABA nörotransmitterinin sentezi, dönüşümü ve inaktivasyonunun düzenlenmesinde önemli roller oynamaktadır (Yan et al., 2017). Bu çalışmada, CUMYL-4CN-BINACA maruz kalan 120 hpf zebra balığı larvalarında *gabra1*, *gat1*, *abat* ve *gad1b* mRNA ekspresyonlarının önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir, bu artış GABA'nın taşınması ve dönüşümündeki bozulmanın nedeni olabilir. *gad1b*, glutamati GABA'ya dönüştürür (Krueger et al., 2007). *gabra1*, heteropentamerik GABAA reseptörlerinden biri olup, merkezi sinir sistemindeki inhibe edici sinyallemeği düzenleyen, iyon kanalı olan bir ligand-gated kanaldır. Nöronal hiperpolarizasyona ve nöronal sinyal iletimini inhibe etmeye neden olur (Steven ve Garrett, 2014). *gat1*, sinaptik aralıkta bulunan GABA'nın yaklaşık %85'inin geri alımından sorumludur (Chen et al., 2004). *abat*, toplanan GABA'yı süksinik semialdehide metabolize eder ya da sinaptik veziküllere geri dönüştürür (Yu et al., 1984). CUMYL-4CN-BINACA maruziyeti sonucu nöronların hiperpolarizasyonu nedeniyle GABA'daki kontrolsüz artış, larvalarda gözlenen davranış değişikliklerini açıklayabilir.

Dopamin, önemli sinirsel düzenleyici işlevlere sahiptir. Dopamin taşıyıcısı (*dat*) ve dopamin reseptörleri (*drd1* ve *drd3*), dopamin sinyal yollarında önemli bir rol oynamaktadır. Dopaminergik yolaktaki anormallikler, zebra balığında nöro-gelişimsel toksisiteye yol açmaktadır (Liu et al., 2021). Bu araştırmada, maruziyet gruplarındaki

dopaminle ilgili genlerin ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. Genlerin artan ekspresyonu, dopamin aktivitesindeki artışla ilişkilendirilebilir. Zebra balığındaki bu durumu doğrulayan çalışmalar mevcuttur. Önceki çalışmalarda, zebra balığı embriyoları THC ve AM-251'e 24 hpf'de maruz bırakılmış ve bileşiklerin dopamin öncüsünün sentezini artırdığı bulunmuştur (Akhtar et al., 2016). Markin et al. (2021), 5F-APINAC maruziyet sonrası dopamin artışına yol açtığını ve bu kannabinoidin merkezi sinir sistemi üzerindeki etkilerini dopaminerjik sistem aracılığıyla gösterdiğini bildirmiştir. Birçok bağımlılık yapıcı maddenin dopamin salınımını artırdığı veya dopaminin nöronlara geri alımını engellediği bilinmektedir (Bloomfield et al., 2016). Bu çalışmada, dopaminin geri alımından sorumlu olan *dat* geninin ekspresyondaki artış bu durumu doğrulamaktadır (Meiser et al., 2013). Metamfetamin alımında artan dopamin seviyeleri de *dat* ile ilişkilendirilmiştir (Ares-Santos et al., 2013).

Apoptoz ve dopamin yolağı nörotoksisite üzerinde önemli rol oynar. Kaspazlar, apoptozun temel bileşenidir. Apoptozda en önemli terminal kesim enzimi kaspaz-3'tür (Salvesen, 2002). Zebra balığı embriyolarında *casp3* geninin ifadesinin yoğun apoptoza yol açtığı bilinmektedir (Yamashita et al., 2008). *casp8*, ölüm reseptörlerine bağlı apoptoz sinyallerini iletir (Wyllie, 2010). Kaspaz-3, *casp3* geni tarafından kodlanan ve kaspaz-8 ile etkileşen bir kaspaz proteindir (Ates-Kalkan et al., 2021). *tp53*, tümör baskılayıcı bir gendir ve birçok omurgalı türünde tümör duyarlılığını etkiler (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). İnterferon- γ (*ifng*), zebra balığında makrofaj yeniden programlaması, serebrovasküler yeniden şekillenmeyi ve bilişsel bozulmayı tetiklediği bilinen bir moleküldür (Apayadin et al., 2023). *rad51*, çift iplikli DNA kırıklarının onarımında görev alan bir gendir (Bonilla et al., 2020). CUMYL-4CN-BINACA maruziyetinin zebra balığı larvalarında *casp8* geni ekspresyon seviyesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, *casp3a*, *ifng1*, *tp53* ve *rad51* genlerinin ifadeleri anlamlı şekilde artmıştır. Bu genlerdeki anormal ifade değişimi, anormal apoptoza yol açarak zebra balığı embriyoları ve larvalarında hem bilişsel hem de morfolojik anormalliklere neden olmuş olabilir. Ayrıca, *rad51* geninin ekspresyonundaki artış, embriyonik hücrelerde DNA hasarının arttığına da işaret etmektedir.

Agresif davranışı etkileyen en önemli nörotransmitter serotonin/5-hidroksitriptamin (5-HT)'dir (Guo et al., 2015). Merkezi sinir sisteminde yaygın olarak bulunan 5-HT/serotonin, duyguların, iştahın, uyku ve birçok fizyolojik sürecin düzenlenmesinde rol oynar. Serotonin ayrıca omurgalıların embriyonik gelişiminde de rol oynar (Buznikov et al., 2001). Serotonin, balıklarda gelişim, hareket ve anksiyeteyi düzenleyebilir (Shi et al., 2022). Bu çalışmada, serotonin sinyallemede yer alan *5ht1aa*, *5ht1a*, *5ht1b* ve *5ht2c* olmak üzere

dört ana genin ifade düzeyleri ölçülmüştür. *5ht1a*, *5ht1b* ve *5ht2c* genlerinin ifade düzeyleri anlamlı şekilde artarken, *5ht1aa* mRNA düzeyi azalmıştır. CUMYL-4CN-BINACA, zebra balığında serotoninle ilişkili gen ekspresyon miktarını etkileyerek anormal nörotransmisyonu neden olmuştur. Serotonin ekspresyonundaki bu değişiklikler, çalışmada tespit edilen anormal gelişim ve davranışların nedenlerinden biri olabilir.

gnrh3, *gnrhr3* ve *kiss2* genleri, kisspeptin-GnIH sinyal yolu içinde rol oynamaktadır (Guo et al., 2023). İlginç bir şekilde, gonadotropin salgılatıcı hormon (*gnrh3*) gen ifadesi zebra balığının 24-26 saat sonra koku çukurunda başlamakta ve erken larva evresinde koku soğanına doğru genişlemektedir. *gnrh3* geninin zebra balığı larvalarının farklı beyin bölgelerinde ifade edilmesi ve farklı işlevler gerçekleştirmesi beklenmektedir (Kuo et al., 2005). Cinsiyet farklılaşmasında rol oynayan *gnrh3* geni, beyin gelişimi ve kamera tipi göz gelişimi üzerinde de etkili olup (NCBI, 2025), primer germ hücrelerinin çoğalmasını düzenler (Feng et al., 2020). *Gnrhr3* geni, gonadotropin salgılatıcı hormon reseptörüdür (NCBI, 2025). Kisspeptin2, bir nöropeptid olup zebra balığı beyninde ve çeşitli periferik dokularda bulunmuştur. *kiss2*'nin zebra balığındaki etkileri tam olarak bilinmemekle birlikte, *kiss2*'nin, hipofizde *gnrh3* salınımını uyararak hormone ifadesini dolaylı olarak etkilediği tahmin edilmektedir (Song et al., 2020). Yüksek konsantrasyonlarda CUMYL-4CN-BINACA maruziyeti *gnrh3* ve *gnrhr3* ekspresyonu azalırken, *kiss2* geninin ifadesi 2.5 ve 5.0 mg/L konsantrasyonlarında azalmıştır. Bu doğrultuda *gnrhr3* ve *kiss2*'deki gen ifadesindeki azalma, gonadotropin salgısını da etkilemiştir. Gonadotropin azalması, larvalarda gözlerin küçülmesi ve merkezi sinir sistemiyle ilişkili diğer anormallikleri açıklayabilir.

SONUÇLAR

Sonuç olarak CUMYL-4CN-BINACA'ya kısa ve uzun süreli maruziyet, önemli gelişimsel değişimlere yol açmıştır. Kısa süreli maruziyet, zebra balığı larvalarında herhangi bir anormalliğe neden olmamıştır. Ancak uzun süreli maruziyet; vücut boyunun kısılmasına, kalp atım hızının düşmesine, sağ kalım oranında azalmaya, koryondan çıkmanın gecikmesine ve teratojenik anormalliklere yol açmıştır. CUMYL-4CN-BINACA maruziyeti 120 hpf zebra balığı larvalarında yüzme davranışlarını değiştirmiştir. Tüm bu değişiklikler, gen ifadelerindeki artışlar ve azalmalarla desteklenmiştir. Apoptozisdeki artış, nörotransmitter ifadelerindeki değişim ve davranışsal genlerdeki farklılıklar bu durumu açıkça doğrulamaktadır. CUMYL-4CN-BINACA' nın gelişimsel toksisitesi ek çalışmalarla daha iyi açıklığa kavuşturulabilir. Çalışmamızın, SK kullanımının ve doğum öncesi maruziyete bağlı bağımlılığın çocukların yaşamları üzerindeki etkilerini anlamak için ilk araştırma olarak değerlendirilebileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Abbate, V., Schwenk, M., Presley, B.C., Uchiyama, N., 2018. The ongoing challenge of novel psychoactive drugs of abuse. Part I. Synthetic cannabinoids (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, 90 (8), 1255–1282.
- Achenbach, J.C., Hill J., Hui J.P., Morash, M.G., Berrue, F., Ellis, L.D., 2018. Analysis of the uptake, metabolism, and behavioral effects of cannabinoids on zebrafish larvae. *Zebrafish*, 15(4):349-360.
- Adkins-Regan, E., 2005. Hormonal regulation of social behaviors in vertebrates. *Hormones and Behavior*, 47(2), 214–222
- Adkins-Regan, E., 2005. *Hormones and Animal Social Behavior*. Princeton University Press, Princeton, NJ, USA.
- 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.
- Agetsuma, M., Aizawa, H., Aoki, T., Nakayama, R., Takahoko, M., Goto, M., Sassa, T., Amo, R., Shiraki, T., Kawakami, K., 2010. The Habenula Is Crucial for Experience-Dependent Modification of Fear Responses in Zebrafish. *Nature Neuroscience*, 13, 1354–1356.
- Akhtar, M.T., Ali, S., Rashidi, H., van der Kooy, F., Verpoorte, R., 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: 1-11.
- Aksakal, F.İ., Sisman, T., 2020. Developmental toxicity induced by Cu (OH)₂ nanopesticide in zebrafish embryos. *Environmental Toxicology*, 35(12), 1289-1298.
- Albert, P.R., Vahid-Ansari, F., 2019. The 5-HT_{1A} receptor: signaling to behavior. *Brain Structure and Function*, 224(2), 395–416.
- Anderson, D.J., 2000. Genes, lineages and the neural crest: a speculative review. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1399), 953-964.
- Aoyama, H., 1993. Developmental plasticity of the prospective dermatome and the prospective sclerotome region of an avian somite. *Dev Growth Differ*, 35: 507–519.
- 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., 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.
- Arasu, U.T., Kärjä, V., Miinalainen, I., Jänis, J., Soini, Y., 2018. Proteolytic landscape of Casp3a in zebrafish: Substrate specificity and biological consequences. *Protein Science*, 27(7), 1230–1243.

- 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.
- Armenian, P., Darracq, M., Gevorkyan, J., Clark, S., Kaye, B., Brandehoff, N.P., 2018. Intoxication from the novel synthetic cannabinoids AB-PINACA and ADB-PINACA: a case series and review of the literature. *Neuropharmacology*, 134, 82-91.
- Artuç, S., Doğan, K.H., Demirci, Ş., 2014. Uyuşturucu maddelerde yeni trend: sentetik kannabinoidler. *Adli Tıp Bulteni*, 19: 198-205.
- Aşıcıoğlu, F., 2013. Yeni nesil psiko-aktif maddeler. *Yeni Nesil Psiko-Aktif Maddeler Sempozyumu Kitabı* (Ed Y Küçük):3-5. İstanbul, Adli Tıp Kurumu.
- 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.
- Aulehla, A., Herrmann, B.G., 2003. Segmentation in vertebrates: clock and gradient mechanisms. *Developmental Cell*, 4(3), 423–435.
- Aybar, M.J., Mayor, R., 2002. Early induction of neural crest cells: lessons learned from frog, fish and chick. *Current opinion in genetics and development*, 12(4), 452-458.
- Bailey, J.R., Cunny, H.C., Paule, M.G., Slikker W., 1987. Fetal disposition of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) during late pregnancy in the rhesus monkey. *Toxicology and applied pharmacology*, 90(2), 315-321.
- Baik, J.H., Son, G.H., 2009. Dopamine D1 receptor signaling in the brain. *Journal of Neurochemistry*, 110(4), 1043–1056.
- Beal, J.E., Olson, R., Laubenstein, L., Morales, J.O., Bellman, P., Yangco, B., Shepard, K.V., 1995. Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *Journal of pain and symptom management*, 10(2), 89-97.
- Beaulieu, J.M., Gainetdinov, R.R., 2011. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 63(1), 182-217
- Behl, M., Hsieh, J.H., Shafer, T.J., Mundy, W.R., Rice, J.R., Boyd, W.A., Tice, R.R., 2015. Use of alternative assays to identify and prioritize organophosphorus flame retardants for potential developmental and neurotoxicity. *Neurotoxicology and teratology*, 52, 181-193.
- Bellairs, R., 1986. The primitive streak. *Anat. Embryo*, 174,1-14.
- Bhat, P.V., Palaniappan, M., 2006. Development of the Human Heart and Vascular System. *Developmental Biology*, 299(2), 405-423.
- Bileck, A., Ferk, F., Al-Serori, H., Koller, V.J., Muqaku, B., Haslberger, A., Knasmüller, S., 2016. Impact of a synthetic cannabinoid (CP-47,497-C8) on protein expression in human cells: evidence for induction of inflammation and DNA damage. *Archives of toxicology*, 90, 1369-1382.
- Bilici, R., 2014. Synthetic cannabinoids. *Nothern Clinics of İstanbul* 1 (2),121.
- Billon, N., Iannarelli, P., Monteiro, M.C., Glavieux-Pardanaud, C., Richardson, W.D., Kessaris, N., Dupin, E., 2007. The generation of adipocytes by the neural crest. *Development*, 134 (12): 2283–2292.
- Birleşmiş Milletler, 2016. Birleşmiş Milletler Dünya Uyuşturucu Raporu 2015. New York, NY.

- 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.
- Bonilla, B., Hengel, S.R., Grundy, M.K., Bernstein, K.A., 2020. RAD51 gene family structure and function. *Annual review of genetics*, 54(1), 25-46.
- Bowden, M., Williamson, J., 2014. Cannabinoid compounds. Patent WO/2014/167530 (A1)
- Bovens, M., Bissig, C., Staeheli, S.N., Poetzsch, M., Pfeiffer, B., Kraemer, T., 2017. Structural characterization of the new synthetic cannabinoids CUMYL-PINACA, 5F-CUMYL-PINACA, CUMYL-4CN-BINACA, 5F-CUMYL-P7AICA and CUMYL-4CN-B7AICA. *Forensic science international*, 281, 98-105.
- Bozkurt, M., 2014. Sentetik kannabinoidler: artık herkesin sorunu. *Psikiyatride Güncel*, 4: 165-177.
- Brent, A.E., Tabin, C.J., 2002. Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12(5), 548–557.
- 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.
- Brents, L., 2017. Correlates and consequences of Prenatal Cannabis Exposure (PCE): Identifying and Characterizing Vulnerable Maternal Populations and Determining Outcomes in Exposed Offspring In: Preedy V.R (eds.) *Handbook of Cannabis and Related Pathologies: Biology, Pharmacology, Diagnosis and Treatment*. London: Academic Press, pp: 160-170.
- Brewer, T.L., Collins, M., 2014. A review of clinical manifestations in adolescent and young adults after use of synthetic cannabinoids. *Journal for Specialists in Pediatric Nursing*, 19(2), 119-126.
- Brown, H.L., Graves, C.R., 2013. Smoking and marijuana use in pregnancy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 56(1), 107-113.
- Buznikov, G.A., Nikitina, L.A., Voronezhskaya, E.E., Bezuglov, V.V., Dennis Willows, A. O., Nezlin, L.P., 2003. Localization of serotonin and its possible role in early embryos of *Tritonia diomedea* (Mollusca: Nudibranchia). *Cell and tissue research*, 311, 259-266.
- Cadena, M.R.S., Cadena, P.G., Watson, M.R., Sarmah, S., Boehm II, 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.
- Calienni, M.N., Feas, D.A., Igartua, D.E., Chiaramoni, N.S., Alonso, S.V., Prieto, M.J., 2017. Nanotoxicological and teratogenic effects: A linkage between dendrimer surface charge and zebrafish developmental stages. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 337, 1–11.
- Calvigioni, D., Hurd, Y.L., Harkany, T., Keimpema, E., 2014. Neuronal substrates and functional consequences of prenatal cannabis exposure. *European child and adolescent psychiatry*, 23, 931-941
- Carlson, B.M., 2013. *Human Embryology and Developmental Biology*. Professor Emeritus, Department of Cell and Developmental Biology, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan
- Carpio, Y., Estrada, M.P., 2006. Zebrafish as a Genetic Model organism. *Biotechnología Aplicada*, 23(4), 265-270.

- 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.
- 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.
- 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, 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.
- Chahardehi, A.M., Arsad, H., Lim, V., 2020. Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. Integrative Medicine Cluster, Advanced Medical and Dental Institute, Universiti Sains Malaysia, Bertam, Kepala Batas 13200.
- Chatzimitakos, T., Chousidis, I., Leonardos, D., Stalikas, C., Leonardos, I., 2022. In the Swim of Cannabis: Developmental Toxicity and Metabolomic Pathway Alterations of Zebrafish Larvae Exposed to THC for the Assessment of Its Potential Environmental and Human Health Impact. *Molecules*, 27, 5506.
- 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* 2004, 447:519-531.
- Chin, W.C., Hayward, M.D., 2004. Apoptosis and its role in disease. *Cell Death and Differentiation*, 11(9), 1024-1031.
- Christ, B., Jacob, H.J., Jacob, M., 1972. Experimentelle Untersuchungen zur Somitenentstehung beim Hühnerembryo. *Z Anat Entwickl-Gesch*, 138: 82–97.
- Christ, B., Jacob, H.J., Jacob, M., 1979b. Über Gestaltungsfunktionen der Somiten bei der Entwicklung der Körperwand von Hühnerembryonen. *Verh Anat Ges*, 73: 509–518.
- Christ, B., Brand-Saberi, B., Grim, M., Wilting, J., 1992. Local signalling in dermomyotomal cell type specification. *Anat Embryol*, 186: 505–510.
- Christ, B., Ordahl, C.P., 1995. Early stages of chick somite development. *Anatomy and Embryology*, 191(5), 381–396.
- Christ, B., Schmidt, C., Huang, R., Wilting, J., Brand-Saberi, B., 1998. Segmentation of the vertebrate body. *Anat Embryol*, 197: 1-8.
- Christ, B., Huang, R., Scaal, M., 2004. Formation and differentiation of the avian sclerotome. *Anat Embryol*, 2004;208:333–350
- 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.
- Christ, B., Ordahl C.P., 1995. Early stages of chick somite development. *Anat Embryol*, 191: 381–396.
- Chung, J.M., Hwang, I.S., 2017. Dopamine transporter and receptor interactions and their relevance to psychiatric disorders *Frontiers in Pharmacology*, 8, 214.

- Clarke, W.P., Barnett, A., 2004. 5-HT1B receptors: Their role in neuropsychiatric disorders. *Neuropharmacology*, 46(4), 517-529.
- Cohen, J., Morrison, S., Greenberg, J., Saidinejad, M., 2012. Clinical presentation of intoxication due to synthetic cannabinoids. *Pediatrics*, 129 (4):e1064–1064-7.
- 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, 162.
- Connors, S.L., Levitt, P., Matthews, S.G., Slotkin, T.A., Johnston, M.V., Kinney, H.C., Johnson, W.G., Dailey, R.M., Zimmerman, A.W., 2008. Fetal mechanisms in neurodevelopmental disorders. *Pediatric Neurology*, 38(3):163– 176.
- 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.
- Constam, D.B., ve Robertson, E.J., 2000. Tissue-specific requirements for the proprotein convertase furin/SPC1 during embryonic turning and heart looping. *Development*, 127(2), 245-254.
- Cottencin, O., Rolland, B., Karila, L., 2014. New designer drugs (synthetic cannabinoids and synthetic cathinones): review of literature. *Current pharmaceutical design*, 20 (25), 4106-4111.
- Çınar, R., Çınar, Ö.G., 2012. Kannabinoid tip 1 reseptör (CB1) ve terapötik yaklaşımlara genel bakış-2. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1:149-154.
- Dahlen, A., Zarei, M., Melgoza, A., Wagle, M., Guo, S., 2021. THC-induced behavioral stereotypy in zebrafish as a model of psychosis-like behaviour. *Scientific reports*, 11(1):15693.
- Dard, N., Breuer, M., Maro, B., Louvet-Vallée, S., 2008. Morphogenesis of the mammalian blastocyst. *Molecular and cellular endocrinology*, 282(1-2), 70-77.
- d’Amora, M., Giordani, S., 2018. The utility of zebrafish as a model for screening developmental neurotoxicity. *Frontiers in neuroscience*, 12, 976.
- Dawid, I.B., 2004. Developmental biology of zebrafish. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1038, 88–93.
- De la Paz, J.F., Beiza, N., Paredes-Zúñiga, S., Hoare, M.S., Allende, M.L., 2017. Triazole fungicides inhibit zebrafish hatching by blocking the secretory function of hatching gland cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (4):710.
- Derungs, A., Schwaninger, A. E., Mansella, G., Bingisser, R., Kraemer, T., Liechti, M.E., 2013. Symptoms, toxicities, and analytical results for a patient after smoking herbs containing the novel synthetic cannabinoid MAM-2201. *Forensic Toxicology*, 31, 164-171.
- Dequeant, M.L., Pourquie, O., 2008. Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. *Nat. Rev. Genet.*, 9: 370-382
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P. , Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*, 30 (4):293-342.
- Diekmann, H., Hill, A., 2013. ADMETox in zebrafish. *Drug discovery today: disease models*, 10(1), e31-e35.

- Dix, M.M., Simon, G.M., Cravatt, B.F., 2014. Global mapping of the topography and magnitude of proteolytic events in apoptosis. *Cell*, 156(5), 1122–1136.
- Doss S.H. nd Sneddon S.H., 2019. *Clinical Embryology An Atlas of Congenital Malformations. General Embryology*, (11-30). Switzerland; Springer Cham.
- Dresen, S., Ferreirós, N., Pütz, M., Westphal, F., Zimmermann, R., Auwärter, V., 2010. Monitoring of herbal mixtures potentially contain ing synthetic cannabinoids as psychoactive compounds. *Journal of mass spectrometry*, 45: 1186-94.
- Engeszer, R.E. , Patterson, L.B., Rao, A.A., Parichy, D.M., 2007. Zebrafish in the wild: A review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*, 4(1), 21-40.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Parhology*, 35 (4),495-516.
- Ellis, L., 2018. Zebrafish as a High-Throughput in vivo Model for Testing the Bioactivity of Cannabinoids. In *Recent Advances in Cannabinoid Research*; IntechOpen: London, UK, 2019.
- EUDA, 2017. Europol Joint Report on a new psychoactive substance: 1-(4-cyanobutyl)-N-(2-phenylpropan-2-yl) indazole-3-carboxamide (CUMYL-4CN-BINACA) In accordance with Article 5 of Council Decision 2005/387/JHA on the information exchange, risk assessment and control of new psychoactive substances.
- EUDA, 2017. Report on the risk assessment of methyl 2-[[1-(cyclohexylmethyl)-1H-indole-3-carbonyl]amino]-3,3-dimethylbutanoate (MDMB-CHMICA) in the framework of the Council Decision on new psychoactive substances, Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- EUDA, 2023. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. *European Drug Report 2023: Trends and Developments*.
- Fattore, L. , Fratta, W., 2011. Beyond THC: the new generation of cannabinoid designer drugs. *Frontiers Behavioral Neuroscience*, 5: 6.
- Fehrenbach, M.j., Popowich, T., 2020. *Illustrated Dental Embryology. Histology and Anatomy*, (5ht Edition). Saunders.
- Feng, K., Cui, X., Song, Y., Tao, B., Chen, J., Wang, J., Liu, S., Sun, Y., Zhu, Z., Trudeau, V.L., 2020. Gnrh3 regulates PGC proliferation and sex differentiation in developing zebrafish. *Endocrinology*, 161 (1):bqz
- Fleming T.P., 1987. A quantitative analysis of cell allocation to trophectoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Dev Biol* 119: 520–531.024
- 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., Patel, K.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.
- Foyle, K.L., Chin, P.Y., Merkwirth, C., Wilson, J., Hosking, S.L., Green, E.S., Robertson, S. A., 2024. IL-2 Complexed With Anti-IL-2 Antibody Expands the Maternal T-Regulatory Cell Pool and Alleviates Fetal Loss in Abortion-Prone Mice. *The American Journal of Pathology*, 194(11), 2128-2149.
- Garcia, G.R., Noyes, P.D., Tanguay, R.L., 2016. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology. *Pharmacology therapeutics*, 161, 11–21.

- Gardner, R.L., 1983. Origin and differentiation of extraembryonic tissues in the mouse. *Int Rev Exp Pathol*, 24, 63-133.
- Gardner, A.J., Williams, C.J., Evans, J.P., 2007. Establishment of the mammalian membrane block to polyspermy: evidence for calcium-dependent and-independent regulation. *Reproduction*, 133(2), 383-393.
- Geisler, R., Köhler, A., Dickmeis, T., Strähle, U., 2017. Archiving of zebrafish lines can reduce animal experiments in biomedical research . *EMBO report*, 18(1), 1-2.
- Gendron-Maguire, M., Mallo, M., Zhang, M., Gridley, T., 1993. Hoxa-2 mutant mice exhibit homeotic transformation of skeletal elements derived from cranial neural crest. *Cell*, 75(7), 1317-1331.
- Gerra, G., Zaimovic, A., Gerra, M. L., Ciccocioppo, R., Cippitelli, A., Serpelloni, G., Somaini, L., 2010. Pharmacology and toxicology of Cannabis derivatives and endocannabinoid agonists. *Recent Patents on CNS Drug Discovery (Discontinued)*, 5(1), 46-52.
- Gibson, G.T., Baghurst, P.A., Colley, D.P., 1983. Maternal alcohol, tobacco and cannabis consumption and the outcome of pregnancy. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 23(1), 15-19.
- 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.F., 2006. *Developmental biology* (8th ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Gilbert, S.F., 2010. *Developmental Biology* (9th ed.). Sinauer Associates.
- Gilbert, S.F., Barresi, M.J.F., 2020. *Developmental Biology* (12th ed.).
- González-Maeso, J., Weisstaub, N.V., Zhou, M., Chan, P., Ivic, L., Ang, R., Sealton, S.C., 2007. Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT_{2A} receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. *Neuron*, 53(3), 439–452.
- González-Maeso, J., 2007. 5-HT_{2C} receptors: Implications in psychiatric and neurological disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31(4), 474-489.
- Grace, A.A., 2000. Gating of dopamine systems by the mesocortical and mesolimbic pathways. *Neuroscience*, 96(3), 227-235
- Graham, A., Begbie, J., McGonnell, I., 2004. Significance of the cranial neural crest. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 229(1), 5-13.
- Griffin, A., Anvar, M., Hamling, K., Baraban, S.C., 2020. Phenotype-Based Screening of Synthetic Cannabinoids in a Dravet Syndrome Zebrafish Model. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 464.
- Grone, B.P., Maruska, K.P., 2016. Three distinct glutamate decarboxylase genes in vertebrates. *Scientific Reports*, 6, 30507
- Grotenhermen, F., 2003. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cannabinoids. *Clinical Pharmacokinetics*, 42: 327 -360.
- Guler E.M., Bektay M.Y., Akyildiz A.G., Sisman B.H., Izzettin F.V., Kocyigit A., 2020. Investigation of DNA damage, oxidative stress, and inflammation in synthetic cannabinoid users. *Hum Exp Toxi col.* 39(11):1454–62.

- Guo, X., Zhang, R., Jin, Q., Cao, N., Shi, J., Zong, X., Chen, X., Wang, C., Li, X., Pang, S., 2023. The kisspeptin-GnIH signaling pathway in the role of zebrafish courtship and aggressive behavior induced by azoxystrobin. *Environmental Pollution*, 325: 121461.
- Gurdal, F., Asirdizer, M., Aker, R.G., Korkut, S., Gocer, Y., Kucukibrahimoglu, E.E., Ince, C.H., 2013. Review of detection frequency and type of synthetic cannabinoids in herbal compounds analyzed by Istanbul Narcotic Department of the Council of Forensic Medicine, Turkey. *Journal of forensic and legal medicine*, 20(6), 667-672.
- 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*, 26:53-78.
- 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., 2020. Evaluation of the effects of acetylcholinesterase inhibitors in the zebrafish touch-evoked response: quantitative vs. qualitative assessment. *Environmental Sciences Europe*, 32:1-12.
- Hasumi, A., Maeda, H., Yoshida, K.I. 2020. Analyzing cannabinoid-induced abnormal behavior in a zebrafish model. *PLoS One*, 15(10):e0236606.
- He, L., Li, S., 2012. Serotonin receptor subtypes and their roles in mood regulation. *Journal of Molecular Neuroscience*, 48(1), 96–107.
- Hensen, V.V., 1876. Beobachtungen über die Befruchtung und Entwicklung des Kaninchens und Meerschweinchens. (No Title).
- Hensler, J.G., 2006. Serotonergic modulation of the limbic system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30 (2), 203–214.
- Higashijima, S.I., Mandel, G., Fetcho, J.R., 2004. Distribution of prospective glutamatergic, glycinergic, and GABAergic neurons in embryonic and larval zebrafish. *The Journal of Comparative Neurology*, 480(1), 1-18.
- Hingson, R., Alpert, J.J., Day, N., Dooling, E., Kayne, H., Morelock, S., Zuckerman, B., 1982. Effects of maternal drinking and marijuana use on fetal growth and development. *Pediatrics*, 70(4), 539-546.
- Hiruma, T., Watanabe, S., 2017. Cardiac development in the human embryo and fetus. *Seminars in Cell, Developmental Biology*, 70, 106-114.
- Holbrook, B.D., Rayburn, W.F., 2014. Teratogenic risks from exposure to illicit drugs. *Obstetrics and Gynecology Clinics*, 41(2), 229-239.
- Homberg, J.R., Kyzar, E.J., Nguyen, M., Norton, W.H., Pittman, J., Poudel, M.K., Gaikwad, S., Nakamura, S., Koshiba, M., Yamanouchi, H., Scattoni, M.L., Ullman, J.F.P., Diamond, D.M., Kaluyeva, A.A., Parker, M.O., Klimenko, V.M., Apryatin, S.A., Brown, R.E., Kalueff, A.V., 2016. Understanding autism and other neuro developmental disorders through experimental translational neurobehavioral models. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, 65, 292-312.
- 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.
- Hoyer, D., Martin, G.R., 1997. 5-HT_{1B} receptors: Their role in neuropsychiatric disorders. *Neuropharmacology*, 36(4), 435-445

- Hoyer, D., Hannon, J.P., Martin, G.R., 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71(4),
- Hoyte, C.O., Jacob, J., Monte, A.A., Al-Jumaan, M., Bronstein, A.C., Heard, K.J., 2012. A characterization of synthetic cannabinoid exposures reported to the national poison data system in 2010. *Annals of Emergency Medicine*, 60(4), 435–438.
- Howe, K., Clark, M.D., Torroja, C.F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato M., Collins J.E., Humphray S., McLaren K., Matthews L., 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 4; 496 (7446):498.
- Hu, C., Ma, Z., Feng, X., Luo, Q., 2015. About the research progress of the relation between the aggressive behavior and 5-hydroxytryptamine and dopamine. *Liaoning Sport Science and Technology*, 37 (1), 32–35.
- Huang, M.M., Jiao, J.J., Wang, J., Xia, Z.D., Zhang, Y., 2018a. Characterization of acrylamide-induced oxidative stress and cardiovascular toxicity in zebrafish embryos. *Journal of Hazardous Materials*, 347,451–460
- Huang, M.M., Jiao, J.J., Wang, J., Xia, Z.D., Zhang, Y., 2018b. Exposure to acrylamide induces cardiac developmental toxicity in zebrafish during cardiogenesis. *Environmental Pollution* 234,656–666.
- Jacob, H.J., Christ, B., Jacob, M., 1974. Die Somitogenese beim Hühnerembryo. Experimente zur Lageentwicklung des Myotom. *Verh. Anat. Ges.*, 68: 581–589.
- Jacobsen, A., Haig, D., Lloyd, M., 2005. Allantois and placental development in mammals. *Developmental Biology*, 287(2), 347–355.
- Jacobsen, K.X., Czesak, M., Deria, M., Le François, B., Albert, P.R., 2011. Region-specific regulation of 5-HT_{1A} receptor expression by Pet-1-dependent mechanisms in vivo. *Journal of neurochemistry*, 116 (6), 1066-1076.
- Jayasinghe, C.D., Jayawardena, U.A., 2019. Toxicity Assessment of Herbal Medicine Using Zebrafish Embryos: A Systematic Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 7272808.
- 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.
- Jones, K.L., Smith, D.W., 1975. Recognition of the fetal alcohol syndrome. *Lancet*, 2(7903), 999–1001.
- 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., 2013. Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish*, 10 (1), 70-86.
- Kalueff, A.V., Stewart, A.M., Gerlai, R., 2014. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(2), 63-75.
- Kamel, M., Ninov, N., 2017. Catching new targets in metabolic disease with a zebrafish. *Current opinion in pharmacology*, 37, 41 - 50.
- Kanyo, R., Amin, M.R., Locskai, L.F., Bouvier, D.D., Olthuis, A.M., Allison, W.T., Ali, D.W., 2021. Medium-throughput zebrafish optogenetic platform identifies deficits in subsequent neural activity following brief early exposure to cannabidiol and 9-tetrahydrocannabinol. *Scientific Reports*, 11(1), 11515.
- Kanungo, J., Cuevas, E., F Ali, S., Paule, M.G., 2014. Zebrafish model in drug safety assessment. *Current pharmaceutical design*, 20(34), 5416-5429.

- Kayaalp, O., 2002. İlaçların toksik tesirleri ve toksikolojinin temel kavramları. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 10. baskı, Ankara, Hacettepe,
- Kayaalp, S.O., Uzbay, İ.T., 2012. Santral sinir sistemini etkileyen ilaçlar ve anesteziyoloji de kullanılan diğer bazı ilaçlar. Akılcı Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 13. Baskı, cilt 1 (Ed SO Kayaalp):685-689. Ankara, Pelikan Yayıncılık.
- Keller, R., 2005. Mechanisms of elongation and bending of the primitive streak in the avian embryo: An analysis of the role of cell movements and cell shape changes. *Developmental Biology*, 290(1), 26–39.
- Keller, R., 2005. Early embryonic development of *Xenopus laevis*: a practical approach. Oxford University Press.
- Kelly, R.G., Brown, N.A., Buckingham, M.E., 2001. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Developmental cell*, 1(3), 435-440.
- Kenney, J.W., Scott, I.C., Josselyn, S.A., Frankland, P.W., 2017. Contextual Fear Conditioning in Zebrafish. *Learning Memory*, 24, 516–523.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257.
- Khan, F.R., Alhewairini, S.S., 2018. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism. In: *Current Trends in Cancer Management*, 27, 3-18.
- Khullar, V., Jain, A., Sattari, M., 2014. Emergence of new classes of recreational drugs Synthetic cannabinoids and cathinones. *Journal of general internal medicine*, 29 (8), 1200-1204.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ulimann, B., Schilling, T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics*, 203 (3), 253–310.
- King-Heiden, T.C., Mehta, V., Xiong, K.M., Lanham, K.A., Antkiewicz, D.S., Ganser, A., Heideman, W., Peterson, R.E., 2012. Reproductive and developmental toxicity of dioxin in fish. *Molecular and cellular endocrinology*, 354(1-2), 121-138.
- 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, 977–1008.
- Koller, V.J., Zlabinger, G.J., Auwärter, V., Fuchs, S., Knasmueller, S., 2013. Toxicological profiles of selected synthetic cannabinoids showing high binding affinities to the cannabinoid receptor subtype CB 1. *Archives of toxicology*, 87(7), 1287-1297.
- Kota, S.K., Feil, R., 2010. Epigenetic transitions in germ cell development and meiosis. *Developmental cell*, 19(5), 675-686.
- Kronstrand, R., Guerrieri, D., Vikingsson, S., Wohlfarth, A., Green, H., 2018. Fatal poisonings associated with new psychoactive substances. *Pharmacology, Clinical, Forensic and Analytical Toxicology*, 495-541.
- Krueger, B.K., Meier, C.A., Thompson, P.S., Wilson, M.S., Liu, H.Z., 2007. Glutamate decarboxylase (GAD) expression in the central nervous system: Implications for GABAergic neurotransmission. *Journal of Neurochemistry*, 102(4), 1014-1023.
- Krueger, C., Stöcker, W., Schlosser, M., 2007. Glutamic acid decarboxylase autoantibodies. In: *Autoantibodies*. Elsevier, 369-378.

- 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: 629-639.
- Lafzi, A., Yeşilyurt, F., Demirci, T., Hacımüftüoğlu, A., Şişman, T., 2024. Acute and subacute toxic effects of CUMYL-4CN-BINACA on male albino rats. *Forensic Toxicology*, 42 (2):125-141.
- 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*, 67: 102389.
- Lanfume, L., Hamon, M., 2016. 5ht1a receptor and serotonergic dysfunction in depression: The role of genetic variation. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 41(3), 161–174.
- Lambert, J.G.D., 1970. The ovary of the guppy *Poecilia reticulata* cells as sites of steroid biosynthesis. *General and Comparative endocrinology*, 15(3), 464-476.
- Lammer, E., Wendler, K., Rawling, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T., 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology Pharmacology*, 149(2), 196-209.
- Lassen, L.H., 2002. The role of 5-HT_{1B} receptor agonists in the treatment of migraine. *Cephalalgia*, 22(5), 366-371.
- Lawson, K.A., Meneses, J.J., Pedersen, R.A., 1986. Cell fate and cell lineage in the endoderm of the presomite mouse embryo, studied with an intracellular tracer. *Developmental biology*, 115(2), 325-339.
- Le Douarin, N., Kalcheim, C., 1999. *The Neural Crest* (2nd ed.). Cambridge University Press
- 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.
- Lee H., Park S., Kang Y., Park S., 2015. EphA reseptor form a complex with Caspase-8 to induce apoptotic cell death. *Molecules and Cells*, 38(4):349-355.
- Lesch, K.P., 2017. The Serotonin Transporter: Role in Psychopathology and Pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, 35, 81-90.
- Lescroart, F., Heffernan, C., Rodeck, U., 2014. The role of endoderm in the specification of the primitive streak. *Developmental Biology*, 396(2), 292-304.
- Levin M., 2005. Left-right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review. *Mech. Dev.*, 122:3–25.
- Liechti, M., 2015. Novel psychoactive substances (designer drugs): overview and pharmacology of modulators of monoamine signaling. *Swiss Medical Weekly*, 14 (145):w14043.
- Liu, Y., 2002. GABA transporter 1 (GAT1) expression in the brain. *Journal of Neurochemistry*, 81(5), 1011-1020.
- Liu, J., 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, Q., Zhang, Y., Liu, K.C., 2021. Involvement of dopamine signaling pathway in neuro developmental toxicity induced by isoniazid in zebrafish. *Chemosphere*, 265:129109.

- Longworth, M., Banister, S.D., Boyd, R., Kevin, R.C., Connor, M., McGregor, I.S., Kassiou, M., 2017. Pharmacology of cumyl-carboxamide synthetic cannabinoid new psychoactive substances (NPS) CUMYL-BICA, CUMYL-PICA, CUMYL-5F-PICA, CUMYL-5F-PINACA, and their analogues. *ACS Chemical Neuroscience*, 8 (10), 2159-2167.
- Ma, K., Yang, L.M., Chen, H.Z., Lu, Y., 2013. Activation of muscarinic receptors inhibits glutamate-induced GSK-3 β overactivation in PC12 cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(7), 886-892.
- 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 Part C: Toxicology Pharmacology*, 243, 109000.
- Martin, S.C., Heinrich, G., Sandell, J.H., 1998. Sequence and expression of glutamic acid decarboxylase isoforms in the developing zebrafish. *The Journal of Comparative Neurology*, 396(2), 253-266.
- Maccarrone, M., Wenger, T., 2005. Effects of cannabinoids on hypothalamic and reproductive function. *Cannabinoids*, 555-571.
- Mackie, K., 2005. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. *Cannabinoids*, 299-325.
- Mattyasovszky S., Mausbach S., Ritz U., Wollstadter J., Schmidtmann I., Baranowski A., Drees P., Rommens P., Hoffman A., 2017. Cytokine interferon gamma supresses the function of capsule myofibroblasts and induces cell apoptosis. *Journal Of Orthopaedic Research*, 35(11):2524-2533.
- McGeer, E.G., Fibiger, H.C., McGeer, P.L., Brooke, S., 1973. Temporal changes in amine synthesizing enzymes of rat extrapyramidal structures after hemitransections or 6-hydroxydopamine administration. *Brain Research*, 52, 289-300.
- McGrath, J., Somlo, S., Makova, S., Tian, X., Brueckner, M., 2003. Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse. *Cell*, 114 (1), 61-73.
- McGuinness, T.M., Newell, D., 2012. Risky recreation: synthetic cannabinoids have dangerous effects. *Journal of psychosocial nursing and mental health services*, 50 (8), 16-18.
- Meiser, J., Weindl, D., Hiller, K., 2013. Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling*, 11: 1-18.
- Meshalkina, D.A., Kizlyk, M.N., Kysil, E.V., Collier, A.D., Echevarria, D.J., Abreu, M.S., Barcellos, L.J.G., Song, C., Warnick, J.E., Kyzar, E.J., Kalueff, A.V., 2018. Zebrafish models of autism spectrum disorder. *Experimental neurology*, 299, 207-216.
- Millan, M.J., 2005. Serotonin 1B receptors and the regulation of emotional states. *The European Journal of Pharmacology*, 528(1-3), 27-42.
- Mosienko, V., Bert, B., Beis, D., Matthes, S., Fink, H., Bader, M., Alenina, N., 2012. Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. *Translational psychiatry*, 2(5), e122-e122.
- Moore, K.L., Persaud, T.V.N., 2009. *Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri*. (2nd Edition).
- Moore, K.L., Persaud, T.V.N., 2015. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology* (10th ed.). Elsevier.

- Moore, K.L., Persaud, T.V.N., Torchia, M.G., 2016. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. Elsevier, 3 (4); 51-67.
- Moore, K.L., Persaud, T.V.N., Torchia, M.G., 2020. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology* (11th ed.). Elsevier.
- Morris, C.V., DiNieri, J.A., Szutorisz, H., Hurd, Y.L., 2011. Molecular mechanisms of maternal cannabis and cigarette use on human neurodevelopment. *European Journal of Neuroscience*, 34(10), 1574-1583.
- Moussavi, M., 2007. Molecular cloning and functional characterization of GnRH3 receptor in fish. *Endocrinology*, 148(9), 4363–4373.
- Murata, H., Tanaka, S., Okada, H., 2021. Immune Tolerance of the Human Decidua. *J Clin Med.*, 10(2):351.
- Muneoka, K., Takahashi, T., 2017. Dopamine D1 receptor-mediated signaling: Implications for addiction and neurodegenerative diseases. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 11, 65.
- Musshoff, F., Madea, B., Kernbach-Wighton, G., Bicker, W., Kneisel, S., Hutter, M., Auwärter, V., 2014. Driving under the influence of synthetic cannabinoids (“Spice”): a case series. *International journal of legal medicine*, 128, 59-64.
- Müller, C.P., Jacobs, B.L., 2014. Serotonin and the Regulation of Mood. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 3.
- Müller, F., O’Rahilly, R., 1987. The prechordal plate, the rostral end of the notochord and nearby median features in staged human embryos. *Cells Tissues Organs*, 129(2), 125–137.
- Müller, F., O’Rahilly, R., 2003. The prechordal plate, the rostral end of the notochord and nearby median features in staged human embryos. *Cells Tissues Organs*, 174(1), 1–11.
- Nagel, R., 2002. DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio*—a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX*, 19, 38–48.
- NCBI, 2025. *gnrhr3* gonadotropin releasing hormone receptor 3 [*Danio rerio* (zebrafish)]. (National Center for Biotechnology Information), (Accessed date 03 02 2025).
- New Zealand Patent No: 615938, 2014. Cannabinoid compounds and their uses. Intellectual Property Office of New Zealand.
- Nishimura, Y., Inoue, A., Sasagawa, S., Koiwa, J., Kawaguchi, K., Kawase, R., Tanaka, T., 2016. Using zebrafish in systems toxicology for developmental toxicity testing. *Congenital Anomalies*, 56(1), 18-27.
- Nishimura, Y., Murakami, S., Ashikawa, Y., Sasagawa, S., Umemoto, N., Shimada, Y., Tanaka, T. 2015. Zebrafish as a systems toxicology model for developmental neurotoxicity testing. *Congenital anomalies*, 55(1), 1-16.
- OECD, 2013. Test No: 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, Section, 2:1-22.
- Ohta S., 2007. Cessation of gastrulation is mediated by suppression of epithelial mesenchymal transition at the ventral ectodermal ridge and others. *Development*, 134: 4315–4324.
- O'Neill, M.J., Lajtha, A., 1991. The role of ABAT in the regulation of GABA metabolism and neurotransmission. *Journal of Neurochemistry*, 56(6), 1689-1697.

- O'Rahilly, R., Müller, F., 2010. Human Embryology and Teratology (3rd ed.). Wiley-Blackwell
- Ordahl, C.P., Le Douarin, N.M., 1992. Two myogenic lineages within the developing somite. *Development*, 114: 339–353.
- Ota, S., Kawahara, A., 2014. Zebrafish: a model vertebrate suitable for the analysis of human genetic disorders. *Congenital anomalies*, 54 (1), 8-11.
- Otte, J.C., Schultz, B., Fruth, D., Fabian, E., Van, B.R., Hidding, B., Salinas, E.R., 2017. Intrinsic xenobiotic metabolizing enzyme activities in early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicological Sciences*, 159, 86–93.
- Öztürk, Y.E., Yeter O., Öztürk S., Karakus G., Ates I., Buyuk Y., Yurdun T., 2018. Detection of metabolites of the new synthetic cannabinoid CUMYL-4CN-BINACA in authentic urine samples and human liver microsomes using high-resolution mass spectrometry. *Drug testing and analysis*, 10 (3), 449–459.
- Papaseit, E., Farré, M., Schifano, F., Torrens, M., 2014. Emerging drugs in Europe. *Current opinion in psychiatry*, 27(4), 243-250.
- Parhar, I.S., Ogawa, S., Ubuka, T., 2016. Reproductive neuroendocrine pathways of social behavior. *Frontiers in endocrinology*, 7, 28.
- Parhar, I.S., Ogawa, S., Ubuka, T., 2016. Gonadotropin-releasing hormones and their role in the regulation of reproductive behaviors in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 230, 1–7.
- Parng, C., Seng, W.L., Semino, C., McGrath, P., 2002. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. *Assay and drug development technologies*, 1(1), 41-48.
- Pertwee, R.G., 1997. Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Therapeutics*, 74(2), 129-180
- Pertwee, R.G., 2006. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. *International journal of obesity*, 30(1), S13-S18.
- Peterson, R.T., Link, B.A., Dowling, J.E., Schreiber, S.L., 2000. Small molecule developmental screens reveal the logic and timing of vertebrate development. *Proceedings of the national academy of sciences*, 97(24), 12965-12969.
- Peterson, R.T., Fishman, M.C., 2011. Designing zebrafish chemical screens. In *Methods in Cell Biology*, vol. 105, pp. 525–541. Academic Press.
- Primakoff, P., Myles D.G., 2002. Penetration, adhesion and fusion in mammalian sperm egg interaction. *Science*, 296:2183–2185.
- Puelles, L., 2018. An update on the molecular mechanism of the vertebrate isthmus organizer development in the context of the neuromeric model. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12, 1–15
- Randlett, O., Wee, C.L., Naumann, E.A., Nnaemeka, O., Schoppik, D., Fitzgerald, J.E., Schier, A.F., Lacoste, A.M.B., Riegler, C., Engert, F., 2015. Whole-brain activity mapping onto a zebrafish brain atlas. *Nature methods*, 12(11), 1039-1046.
- Reddy, U.M., Davis, J.M., Ren, Z., Greene, M.F., 2017. Opioid Use in Pregnancy, N.A.S, Childhood Outcomes Workshop Invited, S, 2017. Opioid use in pregnancy, neonatal abstinence syndrome, and childhood outcomes: executive summary of a joint workshop by the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, American College of Obstetricians and Gynecologists, American Academy

- of pediatrics, society for maternal-fetal medicine, centers for disease control and prevention, and the march of dimes foundation. *Obstet. Gynecol.* 130, 10–28.
- Richards, J.S., Pangas, S.A., 2010. The ovary: basic biology and clinical implications. *The Journal of clinical investigation*, 120(4), 963-972.
- Richardson-Jones, J.W., 2010. 5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron*, 65(1), 40–52.
- Rijli F.M., Mark M., Lakkaraju S., Dierich A., Dolle P., Chambon P., 1993. A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of *Hoxa-2*, which acts as a selector gene. *Cell*, 75, 1333-1349.
- Roberts, A.C., Bill, B.R., Glanzman, D.L., 2013. Learning and Memory in Zebrafish Larvae. *Frontiers in neural circuits*, 7, 126.
- Roper, C., Tanguay, R.L., 2018. Zebrafish as a model for developmental biology and toxicology. In *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, 143–151. Academic Press.
- 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., Grant, R.J., Fleischman, R.W., Baker, J.R., 1986. Marijuana-induced embryotoxicity in the rabbit. *Fundamental and applied Toxicology*, 7(2):236-243.
- Rosenkrantz, H., 1999. Effects of cannabis on fetal development of rodents. In *Marijuana and Medicine*, 411-430. Totowa, NJ: Humana Press.
- Saint-Amant, L., Drapeau, P., 1998. Time Course of the Development of Motor Behaviors in the Zebrafish Embryo. *Journal of Neurobiology*, 37, 622–632.
- Sadler, T.W., 2011. *Langman's Medical Embryology* (12th ed.). Wolters Kluwer.
- Sadler, T.W., 2012. *Langman's Medical Embryology* (12th ed.). Lippincott Williams and Wilkins.
- Sadler, T.W., 2019. *Langman's Medical Embryology* (14th ed.). Wolters Kluwer
- Sarmah, S., Sales Cadena, M.R., Cadena, P.G., Marrs, J.A., 2020. Marijuana and opioid use during pregnancy: using Zebrafish to gain understanding of congenital anomalies caused by drug exposure during development. *Biomedicine* 8, 279.
- Savitz, J., Lucki, I., Drevets, W.C., 2009. 5-HT_{1A} receptor function in major depressive disorder. *Progress in Neurobiology*, 88 (1), 17–31.
- Schoenwolf, G.C., Smith, J.L., 1990. Cellular mechanisms of neural fold formation and morphogenesis in the chick embryo. *The Anatomical Record*, 262(2), 153–167.
- Schoenwolf, G.C., Larsen, W.J., 2009. *Larsen's Human Embryology* (4th ed.). Churchill Livingstone.
- Schoenwolf G.C., Bleyl S.B., Brauer P.R., Francis-West, P.H., 2015. *Larsen's Human Embryology*, (5th Edition). China; Elsevier Inc.
- Schmidt, R., Strähle, U., Scholpp, S., 2013. Neurogenesis in zebrafish—from embryo to adult. *Neural Development*, 8 (1), 1–13.
- Schneir, A.B., Cullen, J., Ly, B.T., 2011. “Spice” girls: synthetic cannabinoid intoxication. *The Journal of emergency medicine*, 40(3), 296-299.
- Schröter, C., 2009. A molecular clock regulates the periodicity of somitogenesis. *Development*, 136(9), 1473-1481.

- Seely, K.A., Brents, L.K., Radominska-Pandya, A., Endres, G.W., Keyes, G.S., Moran, J.H., Prather, P.L., 2012. A major glucuronidated metabolite of JWH-018 is a neutral antagonist at CB1 receptors. *Chemical research in toxicology*, 25(4), 825-827.
- 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., Prather, P.L., James, L.P., Moran, J.H., 2011. Marijuana-based drugs: innovative therapeutics or designer drugs of abuse?. *Molecular interventions*, 11(1), 36.
- Selçukbiricik, S., 2007. Fizyoloji-Histoloji Embriyoloji. *Tus-Data A.Ş.* 147; 15; 278-279
- 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.
- Selman, K., Wallace, R.A., Sarka, A., Qi, X., 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of morphology*, 218(2), 203-224.
- Shahjahan, M., Kitahashi, T., Ogawa, S., Parhar, I.S., 2013. Temperature differentially regulates the two kisspeptin systems in the brain of zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, 193, 79-85.
- 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.
- Shim, W.S., Oh, U., 2008. Histamine-induced itch and its relationship with pain. *Molecular pain*, 4, 1744-8069.
- Sills, M.A., Soares, M.J., 1997. ABAT enzyme activity and its role in GABAergic neurotransmission: Implications for neuropsychiatric disorders. *Brain Research Reviews*,
- Silva, J.P., Carmo, H., Carvalho, F., 2017. In vitro nephrotoxicity of synthetic cannabinoids. *Toxicology Letters*, 280, S137.
- Spicer, O.S., Zmora, N., Wong, T.T., Golan, M., Levavi-Sivan, B., Gothilf, Y., Zohar, Y., 2017. The gonadotropin-inhibitory hormone (Lpxrfa) system's regulation of reproduction in the brain-pituitary axis of the zebrafish (*Danio rerio*). *Biology of reproduction*, 96(5), 1031-1042.
- Sipes, N.S., Padilla, S., Knudsen, T.B., 2011. Zebrafish-as an integrative model for twenty-first century toxicity testing. *Birth Defects Research Part C Embryo Today: Reviews*, 93, 256-267.
- Smith, S.B., 2003. The role of allantois in mammalian embryology. *Journal of Developmental Biology*, 85(2), 120-128.
- Smith, L.A., Storch, L.L., 2014. Development of the urogenital system in mammals. *Journal of Morphology*, 275(10), 1011-1023.
- 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.
- Sower, S.A., 2006. The molecular evolution of GnRH and its receptors: Evidence for the evolution of a complex regulatory system in vertebrates. *General and Comparative Endocrinology*, 146(2), 13-25.

- Sower, S.A., Freamat, M., Kavanaugh, S.I., 2006. The origins of the vertebrate hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) and hypothalamic–pituitary–thyroid (HPT) endocrine systems: New insights from lampreys. *General and Comparative Endocrinology*, 148(1), 20–23.
- Spemann, H., Mangold, H., 1924. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology*, 100(5), 599–638.
- Spaderna, M., Addy, P.H., D'Souza, D.C., 2013. Spicing things up: synthetic cannabinoids. *Psychopharmacology*, 228, 525–540.
- Staeheli, S.N., Poetzsch, M., Veloso, V.P., Bovens, M., Bissig, C., Steuer, A.E., Kraemer, T., 2018. In vitro metabolism of the synthetic cannabinoids CUMYL-PINACA, 5F-CUMYL-PINACA, CUMYL-4CN-BINACA, 5F-CUMYL-P7AICA and CUMYL-4CN-B7AICA. *Drug testing and analysis*, 10(1), 148–157.
- Stemple, D.L., 2005. Structure and function of the notochord: An essential organ for chordate development. *Development*, 132(11), 2503–2512
- Steven, N.T., Garrett, E.S., 2014. *Molecular Mechanisms Underlying the Development of Functional and Behavioral Tolerance to Alcohol.* Editor(s): Antonio, B.C., Noronha, Changhai Cui, R., Adron Harris, John, C., Crabbe, *Neurobiology of Alcohol Dependence*, Academic Press, Pages 321–346.
- Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., Braunbeck, T., 2012. Zebrafish Embryos as an Alternative to Animal Experiments—A Commentary on the Definition of the Onset of Protected Life Stages in Animal Welfare Regulations. *Reproductive Toxicology*, 33, 128–132
- Streisinger, G., Walker, C., Dower, N., Knauber, D., Singer, F., 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature*, 291(5813), 293–296.
- Sezer, Y., 2018. Sentetik kannabinoid JWH-018'in toksikolojik özelliklerinin in vitro araştırılması. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
- Şeftalioğlu, A., 1998. Genel ve Özel İnsan Embriyoloji. Tıp ve Teknik Yayıncılık Ltd. Şti. 3.Baskı. 5: 101–118.
- Şişman, T., 2007. Poliklorlu bifenil bileşiklerinin *Danio rerio*'nun (Zebra balığı) gelişimi üzerine etkileri. *Biyoloji Anabilim Dalı. Atatürk Üniversitesi: Erzurum*.
- Şişman, T., Geyikoğlu, F., 2008. The teratogenic effects of polychlorinated naphthalenes (PCNs) on early development of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and pharmacology*, 25(1), 83–88.
- Tam P.P.L., Behringer R.R., 1997. Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. *Mech Dev.*, 68: 3–25.
- Tai, S., Fantegrossi, W.E., 2016. 'Pharmacological and toxicological effects of synthetic cannabinoids and their metabolites', *Current Topics in Behavioral Neurosciences* 32, 249–262.
- Tait, R.J., Caldicott, D., Mountain, D., Hill, S.L., Lenton, S., 2016. A systematic review of adverse events arising from the use of synthetic cannabinoids and their associated treatment. *Clinical Toxicology (Philadelphia)*, 54(1), pp. 1–13.
- Teixidó, E., Barenys, M., Piqué, E., Llobet, J. M., Gómez-Catalán, J., 2019. Cardiovascular effects of PCB 126 (3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl) in zebrafish embryos and

- impact of co-exposure to redox modulating chemicals. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1065.
- Teraoka, H., Dong, W., Hiraga, T., 2003. Zebrafish as a novel experimental model for developmental toxicology. *Congenital anomalies*, 43(2), 123-132.
- Tierney, K.B., 2011. Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1812(3), 381-389.
- Trecki, J., Gerona, R.R., Schwartz, M.D., 2015. Synthetic cannabinoid-related illnesses and deaths. *New England Journal of Medicine*, 373(2), 103-107.
- Tsutsui, K., Bentley, G.E., Ubuka, T., Saigoh, E., Yin, H., Osugi, T., Wingfield, J.C., 2007. The general and comparative biology of gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). *General and comparative endocrinology*, 153(1-3), 365-370.
- TUBİM, 2014. Emniyet Genel Müdürlüğü Kaçakçılık ve Organize Suçlarla Mücadele Daire Başkanlığı EMCDDA 2014 Ulusal Raporu (2013 Yılı Verileri) : Reitox Ulusal Temas Noktası Türkiye: Yeni Gelişmeler, Trendler, Seçilmiş Konular. Ankara, Türkiye Uyuşturucu ve Uyuşturucu Bağımlılığı İzleme Merkezi.
- Ubuka, T., 2011. GnRH and its receptors in non-mammalian vertebrates: Evolution of reproductive and behavioral roles. *General and Comparative Endocrinology*, 172(2), 258-268.
- Yamamoto, K., 1997. Role of GnRH in the regulation of reproductive behavior in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 17(4), 229-240.
- Yamamoto, I., Watanabe, K., Matsunaga, T., Kimura, T., Funahashi, T., Yoshimura, H., 2003. Pharmacology and toxicology of major constituents of marijuana on the metabolic activation of cannabinoids and its mechanism. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 22(4), 577-589.
- Vakaet, L., 1984. The initiation of gastrula ingression in the chick blastoderm, *Am. Zool*, 24, 555-562.
- van Jan, A.J., Brunt, T., van den Brink, W., 2015. The adverse health effects of synthetic cannabinoids with emphasis on psychosis-like effects. *J Psychopharmacol*. 29 (3): 254-63.
- Vargas, R., Ponce-Canchihuamán, J., 2017. Emerging various environmental threats to brain and overview of surveillance system with zebrafish model. *Toxicology reports*, 4, 467-473.
- 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.
- Veldman, M.B., Lin, S., 2008. Zebrafish as a developmental model organism for pediatric research. *Pediatric research*, 64(5), 470-476.
- Wassarman, P.M., Litsher, E.S., 2008. Mammalian fertilization: the egg's multifunctional zona pellucida. *Int.J.Dev.Biol.*, 52: 665-676.
- Weaver, M.F., Hopper, J.A., Gunderson, E.W., 2015. Designer drugs 2015; assessment and management. *Addiction Science Clinical Practice*. 10,1-9.
- Westerfield, M., 2000. The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) (4th edition). University of Oregon Press.
- World Health Organization, 1997. Cannabis: a health perspective and research agenda.

- WHO, 2010. World Drug Report. New York, NY, World Health Organization.
- Williams L.W., 1910. The somites of the chick. *Am J Anat*, 11: 55–100.
- Wilson, J.G., 2005. Environmental Toxicology: Teratology and Toxicology of the Developing Embryo. Cambridge University Press.
- Wilson, V., Olivera-Martinez, I., Storey, K.G., 2009. Stem cells, signals and vertebrate body axis extension. *Development*, 136 (10), 1591–1604.
- 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.
- Wittler L., Kessel M., 2004. The acquisition of neural fate in the chick. *Mech Dev.*, 121:1031–1042
- Wyllie, A.H., 2010. “Where, O death, is thy sting?” A brief review of apoptosis biology. *Molecular neurobiology*, 42, 4-9.
- 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(12), 1874-1881.
- Yamamoto, N., Oka, Y., Kawashima, S., 1997. Lesions of gonadotropin-releasing hormone-immunoreactive terminal nerve cells: Effects on the reproductive behavior of male Dwarf Gouramis. *Neuroendocrinology*, 65(6), 403-412.
- Yan, W., Li, L., Li, G., Zhao, S., 2017. Microcystin-LR induces changes in the GABA neurotransmitter system of zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 188, 170-176.
- Yargıç, İ., 2013. Sentetik kannabinoidler. *Yeni Nesil Psiko-Aktif Maddeler Sempozyumu Kitabı* (Ed Y Küçük): 9-11. İstanbul, Adli Tıp Kurumu.
- Yeter, O., 2017. Identification of the Synthetic Cannabinoid 1-(4-cyanobutyl)-N-(2-phenylpropan-2-yl)-1H-indazole-3-carboxamide (CUMYL-4CN-BINACA) in Plant Material and Quantification in Post-Mortem Blood Samples. *Journal of analytical toxicology*, 41(9), 720-728.
- Yoo, S.K., Huttenlocher, A., 2009. Caspase activation and apoptosis in zebrafish development. *Developmental Biology*, 328(1), 13–25.
- Yu, A.C.H., Fisher, T.E., Hertz, E., Tildon, J.T., Schousboe, A.A., Hertz, L., 1984. Metabolic fate of [14C]-glutamine in mouse cerebral neurons in primary cultures. *Journal of neuroscience research*, 11(4), 351-357.
- Zanda, M.T., Fattore, L., 2018. Old and new synthetic cannabinoids: lessons from animal models. *Drug metabolism reviews*, 50(1), 54-64.
- 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 Ärzteblatt International*, 106(27), 464.
- Zuba, D., Byrska, B., Maciow, M., 2011. Comparison of “herbal highs” composition. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400, 119-126.
- Zumbrun, E.E., Sido, J.M., Nagarkatti, P.S., Nagarkatti, M., 2015. Epigenetic regulation of immunological alterations following prenatal exposure to marijuana cannabinoids and its long term consequences in offspring. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 10, 245-254.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Derya YILMAZTÜRK
Doğum tarihi:	
Doğum Yeri:	
Uyruğu:	
Adres:	
Tel:	
E-mail:	
Eğitim	
Önlisans:	Kırıkkale Üniversitesi, Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri,
Lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,
Yüksek lisans:	Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
Yabancı Dil Bilgisi	
Tezden Üretilmiş Yayınlar	
1. Derya Yılmaztürk, Ömercan Alat, Özkan Aksakal, Berşan Kullebi, Ayşe Lafzi, Turgay Şişman. Developmental, Molecular And Behavioral Consequences Of CUMYL-4CN-BINACA Exposure Zebrafish Embryos (Oral presentation). ERZURUM 1ST INTERNATIONAL CONFERENCE ON APPLIED SCIENCES, May 9 - 11, 2025, ERZURUM	