

## REKOMBİNANT MAYA TESTİ İLE *KANNABİS* REÇİNESİNİN DUMANINDA ÖSTROJENİK AKTİVİTE TAYİNİ

### DETECTION OF ESTROGENIC ACTIVITY IN SMOKE OF *CANNABIS* RESIN BY USING RECOMBINANT YEAST ASSAY

**Yalçın DUYDU**

<sup>2</sup> Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Toxicology,06100  
Tandoğan- Ankara, TURKEY

#### ÖZET

*Bu çalışmada Cannabis reçinesinin dumanının östrojenik aktiviteye sahip olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla Dünya'da bir kimyasal maddenin östrojenik aktiviteye sahip olup olmadığının gösterilmesinde en çok kullanılan in-vitro test olan Rekombinant Maya Testi (Recombinant Yeast Assay) kullanılmıştır. Cannabis reçinesi günümüzde illegal olarak en fazla tüketilen Cannabis ürünlerindedir. Sert tabletler halinde hazırlanan Cannabis reçinesi, genelde kırılıp ufalanarak tütün ile birlikte sigara gibi içilerek tüketilmektedir. Bilindiği gibi östrojenik aktif maddelerin, üreme ve gelişim bozuklukları, öğrenme problemleri ve immun sistem bozuklukları gibi olumsuz sağlık sorunlarına sebep olduğu düşünülmektedir. Ayrıca çocuklarda davranış bozuklukları, genç erkeklerde testis kanseri sıklığının artması, erkek üreme organlarında doğuştan meydana gelen bozuklukların sıklığının artması, kadınlarda göğüs kanseri sıklığının artması ve erkeklerde sperm sayılarının azalması çevrede yaygın olarak bulunan östrojenik aktif maddelerin varlığı ile ilişkilendirilmektedir. Bu durumda Cannabis reçinesi dumanının östrojenik aktivite gösteren maddeler içermesi kullanıcılar için ek bir sağlık riski oluşturabilecektir.*

*Rekombinant maya testi sonuçlarına göre Cannabis reçinesi dumanının östrojenik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Cannabis reçinesinin dumanında tespit edilen östrojenik aktivite negatif kontrol olarak kullanılan dimetilsulfoksit (DMSO) dan ( $p<0.05$ ) ve pozitif kontrol olarak kullanılan 0.3 nM 17\_ östradiol den yüksek bulunmuştur ( $p<0.01$ ).*

**Anahtar Kelimeler:** Maya testi, östrojenik kimyasal maddeler, Cannabis Reçinesi

#### ABSTRACT

*Cannabis resin is among the most used illegal Cannabis products over the world. Cannabis resin prepared usually as hard tablets or blocks and can be smoked by crumbling small amounts into a tobacco containing hand-rolled cigarette. The estrogenic activity of smoke of Cannabis resin has been tested in this study. The estrogenic activity in smoke samples has been detected by using the Recombinant*

*Yeast Assay, which is the most widely used in-vitro test method to detect the estrogen-like activity in new chemicals. As well known estrogenic active chemicals have been suspected of contributing to a range of adverse health effects in humans, including reproductive and developmental disorders, learning problems, and immune system dysfunction. Several recent trends in human health may be related to endocrine disruptors in the environment: widespread occurrence of neurobehavioral dysfunction at birth and in childhood; an increasing incidence of testicular cancer in young men; an increasing incidence of congenital malformations of the male reproductive tract; the increasing incidence of breast cancer; and declining sperm counts. Because of the above mentioned adverse health problems, the presence of the estrogenic active chemicals in the smoke of Cannabis resin should also be taken into consideration as an additional health risk for the users of Cannabis products.*

*Consequently, the estrogenic activity of smoke samples was statistically higher ( $p < 0.05$ ) than the negative control (DMSO) and 0.3 nM 17 $\beta$ -estradiol according to our results.*

**Key Words:** *Yeast Assay, estrogenic chemicals, Cannabis Resin*

## GİRİŞ

Östrojenik aktivite gösteren kimyasal maddeler, endokrin sisteminin normal fonksiyonunu bozan kimyasal maddelerdir ve günümüzde pek çok farklı isim ile tanımlanmaktadır. Bu isimlerden en çok kullanılanlar; Çevresel Östrojenler, Hormon etkilerini taklit eden maddeler, Ksenoöstrojenler, Endokrin sistemini bozan maddeler, Endokrin aktif maddeler şeklinde sıralanabilir. Buna rağmen; "*Endokrin sistemini bozan maddeler*" (*Endocrine disrupting Chemicals, "EDCs"*), bu kimyasal madde grubunu tanımlamada en çok kullanılan isimdir (1).

Bugüne kadar yapılmış olan araştırmalar çevremizde her gün karşılaşılabileceğimiz pek çok kimyasal maddenin endokrin sistemi ile etkileşebildiğini göstermektedir. Kısaca EDCs olarak tanımladığımız bu kimyasal maddeleri temel olarak aşağıdaki şekilde sınıflamak mümkündür;

1) Bazı pestisitler 2) Endüstriyel deterjanlar (özellikle nonilfenol yapısındakiler) 3) Plastikler ve plastik üretiminde kullanılan bazı maddeler 4) Bazı ilaçlar (özellikle oral kontraseptifler) 5) Bazı ağır metaller 6) Doğal kaynaklı fitoöstrojenler ve mikoöstrojenler 7) Poliklorobifeniller (PCB) 8) Dioksin ve türevleri.

Bu sınıflamadan da anlaşılacağı gibi oldukça geniş bir kimyasal madde grubunun endokrin sistem ile etkileşebildiği kanıtlanmış ve bu gruplardaki kimyasal maddeler EDCs olarak tanımlanmıştır (1,2).

Son yıllarda bu grup kimyasal maddelerle ilgili çevre ve sağlık sorunları giderek daha büyük önem kazanmaktadır. Buna bağlı olarak da bu etkilere sahip kimyasal maddelerin kullanımlarının yasaklanması yönünde çalışmalar başlatılmıştır.

EDCs ların yarattığı en önemli sorunlar, özellikle balıklarda dişi erkek oranlarının dişiler lehine değişmesi, başta kuşlar olmak üzere bazı hayvanların yumurtalarının yumurta kabuklarının incilmesi (bu nedenle yavrunun ölü doğması) ve bazı hayvanların genital

organlarında deformasyonlar olarak karşımıza çıkmaktadır (2,3,4). Tüm bu olumsuzluklar sonuçta bu tip sorunların görüldüğü canlı türünün neslinin tükenmesi ile sonuçlanabilecek bir sürecin başlangıcı olarak değerlendirilebilir.

EDCs ların çevrede kalıcı olmaları ve biyokonsantrasyona uğrayabilmeleri nedeni ile sonunda besin zinciri ile insanlara da ulaşabildiği bilinmektedir. Buna bağlı olarak da insanlarda da önemli sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Bu sorunlardan en önemlileri özellikle bazı kanser türlerinin insidasındaki artış (kadınlarda göğüs kanseri, erkeklerde testis kanseri), üreme sistemindeki gelişme bozuklukları ve erkelerde görülen sperm sayılarındaki azalmalar olarak karşımıza çıkmaktadır (1,5).

Tüm bu olumsuzluklar Dünya'da bu tip kimyasal maddelerin kolayca tayin edilmesinde kullanılabilir *in-vivo* ve *in-vitro* test sistemlerinin geliştirilmesine büyük hız kazandırmış ve bu testler sayesinde tüm çevre kirleticilerinin test edilmesi ve endokrin sistem ile etkileşim etkileşmediklerinin belirlenmesi hedeflenmiştir (5,6). Dünyada bu amaç doğrultusunda yapılan yoğun çalışmalar neticesinde hem yeni test yöntemleri geliştirilmekte hem de bazı yeni test edilen kimyasal maddelerinde endokrin sistemini etkilediği görülmekte ve yukarıdaki listeye ilave edilmektedir (5,6). Sonuçta bu kimyasal maddelerin sayısı da her geçen gün artmaktadır.

Bu çalışmada, Dünya'da bugün bir kimyasal maddenin östrojenik aktiviteye sahip olup olmadığının gösterilmesinde en yaygın olarak kullanılan *in-vitro* test olan Rekombinant Maya Testi (Recombinant Yeast Assay) ile *Kannabis* reçinesinin dumanının östrojenik aktiviteye sahip olup olmadığı araştırılmıştır. Diğer bir deyişle *Kannabis* reçinesi dumanının EDC olarak tanımlanan kimyasal maddeler içerip içermediği araştırılmıştır. Bu test için özel olarak hazırlanmış olan maya hücresinde bazı genetik modifikasyonlar yapılmıştır. Yapılan bu modifikasyonlar sayesinde *Saccaromyces Cerevisiae* östrojenik aktivite gösterebilen kimyasal maddelere duyarlı hale getirilmiştir. Buna göre genom üzerine entegre edilmiş olan insan östrojen reseptörü geni, plasmid üzerindeki östrojen yanıt elemanına (ERE) bağlanabilecek formda tanımlanmakta ve sonuçta ERE üzerine bağlanmaktadır. Östrojen veya benzeri etki gösterebilen maddeler reseptöre bağlandığında reseptör aktive olmakta ve *Lac-Z* reporter geninin ekspresyonuna ve sonuçta *-galaktozidaz* enziminin sentezlenmesine neden olmaktadır. Bu enzim test ortamına geçtiğinde ortama ilave edilen 2 nitrofenol *-D* galaktopiranozid i (ONPG) o-nitrofenol e (ONP) metabolize edeceğinden test ortamında sarı bir renk oluşmaktadır. Test ortamında sarı renk oluşması test edilen kimyasal maddenin östrojenik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 2).

Bilindiği gibi *Cannabis Sativa* Dünya üzerinde sıcak bölgelerde çok yaygın olarak yetişen ve içerdiği psikoaktif maddeler nedeni ile üretimi kontrol altında tutulan bir bitkidir (7). Günümüzde *Kannabis* bitkisinden temel olarak; marihuana (*Kannabis*"in herbal ürünleri), haşış (*Kannabis* reçinesi), haşış yağı olarak bilinen ürünler elde edilmekte ve yasa dışı olarak pazarlanmaktadır (7). *Kannabis* reçinesi üretildiği ülkelerde genelde sert ve büyük tabletler halinde hazırlanmakta ve kullanılacağı zaman kırılıp ufalandıktan sonra çoğu zaman tütün içine sarılarak sigara gibi içilmektedir. <sup>9</sup> - THC (tetrahidrokannabinol) *Kannabis* ürünlerinin içerdiği

majör psikoaktif maddedir ve genelde *Kannabis* reçinesindeki *J* - THC miktarı (üretildiği bölgeye göre değişmesine rağmen) % 2-10 arasındadır (7,8).

*Kannabis* ürünleri başlangıçta özellikle rahatlık hissi vermesi ve medeni cesareti arttırması gibi etkileri nedeni ile kullanılmaktadır. Fakat kullanım sıklığının ve dozun arttırılması ile birlikte koordinasyon bozuklukları, dikkat de azalma, zamanı algılayamama, kronik kullanımlarda kronik bronşit ve akciğer kanserine kadar varabilen solunum yolu hastalıklarına (*Kannabis* sigara gibi içildiğinde solunum yollarındaki iritan etkisi tütünden çok daha yüksektir) neden olabilmektedir (9,10).

*Kannabis* reçinesinin dumanının östrojenik aktiviteye sahip olup olmadığı ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda böyle bir aktivitenin varlığının gösterilmesi, *Kannabis* ürünlerinin kullanılması nedeni ile oluşabilecek ve yukarıda da kısaca belirtilmiş olan sağlık risklerine bir yenisini daha ekleyebilecektir.

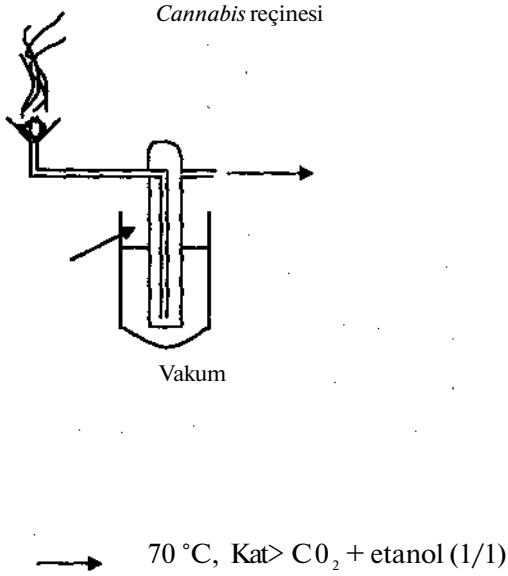
Bu çalışmanın temel amaçlarından biride bitki veya çevresel numunelerden uygun bir yöntemle elde edilecek ekstrelerin östrojenik aktiviteye sahip olup olmadığının gösterilmesini sağlayacak bir test yöntemi geliştirmektir. Dünyada saf kimyasal maddelerin östrojenik aktivitelerinin gösterilmesinde kullanılan pek çok yöntem ve çalışma bulunmaktadır (1,4). Ancak bitki veya çevresel ekstrelerin test edildiği çalışma ve yöntemlerin sayısı sınırlıdır (6). Bu çalışmamızda kullanılan rekombinant maya testi *Kannabis* dumanındaki östrojenik aktivitenin test edilmesinde kullanılmış olsa da, bitki veya çevresel ekstrelerin kolaylıkla test edilebileceği şekilde düzenlenmiştir. Bu nedenle bundan sonra yapılacak olan çevresel ve bitkisel ekstrelerdeki östrojenik aktivite tayinlerinde güvenle kullanılabilir bir test yöntemi olarak düşünülebilir.

## **MATERYAL VE YÖNTEM**

### ***Kannabis* reçinesinin test için hazırlanması**

#### *Kannabis* reçinesinin yakılması:

13.6384 gr *Kannabis* reçinesi tartıldı ve ağzı cam pamuğu ile kapatılmış bir huninin ağzına ufalanarak aktarıldı. Huninin ağzı Şekil 1 de görüldüğü gibi bir vakum pompasına bağlandı. *Kannabis* reçinesi yakıldıktan sonra vakum ile dumanın -70 °C lik katı CO<sub>2</sub> + etanol (1/1) karışımına daldırılan cam tüpün içinde toplanması ve burada tekrar yoğunlaşması (kondanse olması) sağlandı. Sonuçta elde edilen 0.16 g *Kannabis* reçinesi kalıntısı (CRK) 1 ml DMSO içinde çözüldü ve aşağıdaki şekilde seyreltilmiş numunelerin östrojenik aktiviteye sahip olup olmadıkları rekombinant maya testi ile test edildi.



**Şekil 1.** *Kannabis* Reçinesinin yakılması ve dumanının yoğunlaştırılarak toplanmasında kullanılan düzenek.

*Numunelerin seyreltilmesi:*

Yukarıdaki açıklandığı şekilde 1 mi DMSO içinde çözülerek hazırlanmış olan kalıntı aşağıdaki şekilde seyreltilerek farklı konsantrasyonlarda test edilmiştir.

Numune 1: Seyreltilmemiş numune = 1 mi

Numune 2: 350/d seyreltilmemiş numune 1 + 350/d DMSO = 700//1 (2 kat seyreltildi)

Numune 3: 350 *fil* seyreltilmiş numune 2 + 350 *fil* DMSO = 700 *fil* (4 kat seyreltildi)

Numune 4: 350 *fil* seyreltilmiş numune 3 + 350 *fil* DMSO = 700 *fil* (8 kat seyreltildi)

Numune 5: 350 *fil* seyreltilmiş numune 4 + 350/d DMSO = 700 *fil* (16 kat seyreltildi)

Numune 6: 350 *fil* seyreltilmiş numune 5 + 350 *fil* DMSO = 700 *fil* (32 kat seyreltildi)

Numune 7: 350 *fil* seyreltilmiş numune 6 + 350 *fil* DMSO = 700 *fil* (64 kat seyreltildi)

Numune 8: 350 *fil* seyreltilmiş numune 7 + 350 *fil* DMSO = 700 *fil* (128 kat seyreltildi)

### 17 \_ Östradiol standartlarının hazırlanması

Hazırlanacak olan 10 mi lik çalışma kültürlerinde sırası ile 0.3 nM, 3 nM, 5 nM, 10 nM, 100 nM, 300 nM ve 1000 nM lık 17 \_ Östradiol konsantrasyonları oluşturabilmek için 1 mM lık stok 17 \_ Östradiol çözeltisinden hareketle DMSO ile seyreltilerek yeni standartlar hazırlandı ve Maya Testinde pozitif kontrol olarak kullanıldı.

#### \_ -Galaktozidaz tampon çözeltisinin hazırlanması

16.1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5.5 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.75 g KCl ve 0.25 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  tartıldı ve distile su ile 1000 mi e tamamlandıktan sonra pH sı 7.00 ye ayarlandı (NaOH/HCl). Bu çözeltiden 100 mi alınıp üzerine 3.2 mi (% 0.1) sodyum dodesil sülfat (Merck, 1.12533) ve 270  $\mu\text{A}$  merkapto etanol (Merck, 1.15433) ilave edilerek \_-Galaktosidaz tampon çözeltisi hazırlandı.

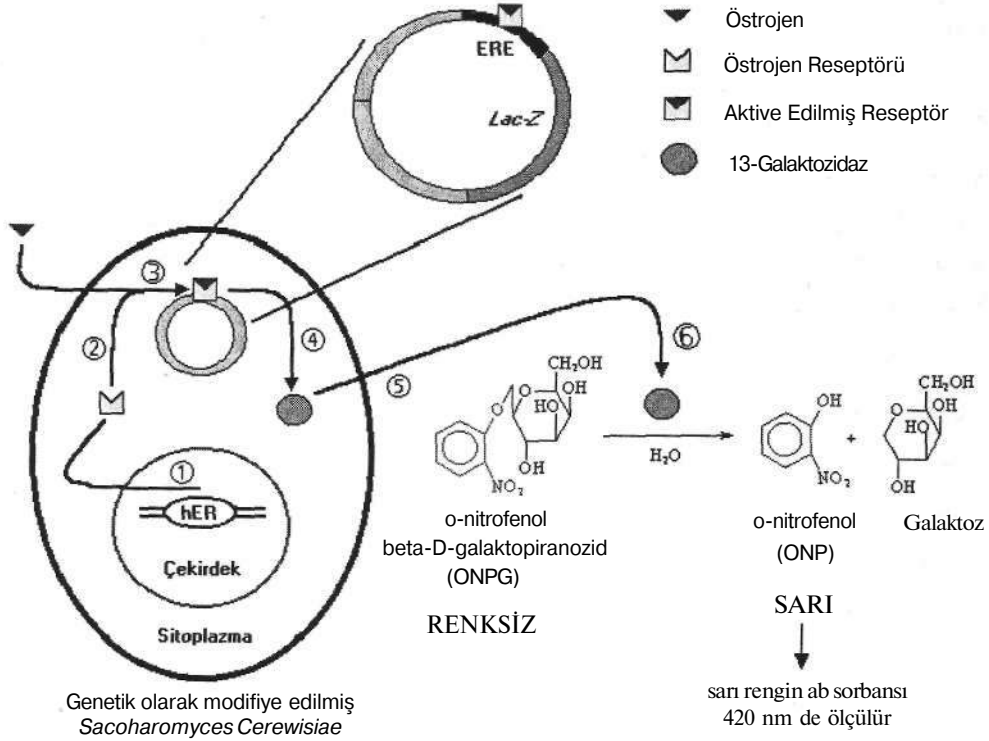
#### \_ -Galaktozidaz substrat çözeltisinin hazırlanması

30 mi yukarıdaki şekilde hazırlanmış olan \_-Galaktozidaz tampon çözeltisi alındı ve içerisinde 0.12 g 2 nitrofenol \_ D galaktopiranozid (Merck, 1.06791) çözülerek \_-Galaktozidaz substrat çözeltisi hazırlandı.

### Rekombinant maya testi

#### Rekombinant mayanın özellikleri:

Bu test, Almanya da GSF (GSF-Institut für Ökologische Chemie, Neuherberg, Germany) laboratuvarlarından temin edilen ve insan östrojen reseptörü ile etkileşebilen kimyasal maddeleri tayin edebilecek genetik düzenlemelere sahip olan bir rekombinant maya (*Saccharomyces Cerevisiae*) örneği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Maya hücrelerinde normalde östrojen reseptörü bulunmadığı için insan östrojen reseptörünün (human estrogen receptor, "hER") DNA dizilimi maya hücresinin ana kromozomu içerisine entegre edilmiştir. Bu maya hücresinde aynı zamanda \_-galaktozidaz enzimini kodlayan *lac-Z* genini içeren plazmidler de bulunmaktadır. Böyle bir düzenlemeyle ostojen reseptör aktivitesinin ölçümü Şekil 2 de görüldüğü gibi mümkün hale getirilmiştir (2,6).



Şekil 2. Maya hücresinde genom üzerine entegre olmuş olan insan östrojen reseptörü geni, plasmid üzerindeki östrojen yanıt elemanına (ere) bağlanabilecek formda tanımlanır 1 ve ere üzerine bağlanır 2. Östrojen veya benzeri etki gösterebilen maddeler reseptöre bağlandığında 3 reseptör aktive olur ve *lac-z* reporter geninin ekspresyonuna neden olur 4. Sonuçta  $\beta$ -galaktozidaz enzimi sentezlenmiş olur. Bu enzim test ortamına geçer 5 ve onpg'yi onp'ye (sarı renkli) metabolize eder 6. Oluşan sarı rengin absorbansı 420 nm de ölçülür (2).

Bu sistemde, sentezlenen insan östrojen reseptörü (hER) plazmid üzerine yerleştirilmiş olan östrojen yanıt elemanına (estrogen response elements, "ERE") bağlanır. Östrojenin veya östrojenik aktiviteye sahip bir kimyasal maddenin reseptöre bağlanması ile aktive olan reseptör *Lac-Z* geninin ekspresyonunu ve sonuçta  $\beta$ -galaktozidaz enziminin sentezini sağlar. Bu enzim test ortamına geçer ve renksiz olan o-nitrofenol-beta-D-galaktozidaz'ı sarı renkli o-nitrofenol'e metabolize eder (Şekil 2). Sarı rengin oluşması ve neticede absorbansın yükselmesi test edilen kimyasal maddenin östrojenik aktiviteye sahip olduğunun bir göstergesidir. Sonuçta oluşan sarı rengin absorbansı 420 nm de ölçülerek test edilen kimyasal maddenin östrojenik aktivitesi değerlendirilmiştir (2,6).

*Rekombinant maya testinde kullanılacak Temel Büyüme Ortamı nın hazırlanması:*

Temel Büyüme Ortamı (Basic Growth Medium, "BGM") aşağıdaki kimyasal maddelerin 700 ml aminoasit karışımına steril koşullarda eklenmesi ile hazırlandı.

*Amino asit karışımının hazırlanması:*

Adenin 0,05 g., Arjinin 0,02 g., Aspartik asit 0,0947 g., Glutamik asit 0,1 g., Histidin 0,05 g., İzölösün 0,03 g., Lösin 0,05 g., Lizin 0,03 g., Metiyonin 0,02 g., Fenilalanin 0,025 g., Serin 0,375 g., Treonin 0,182 g., Tirozin 0,03 g., Valin 0,15 g. Tartıldı ve 700 ml bidistile suda çözüldü ve otoklavda sterilize edildi.

Kimyasal Maddeler	Çözücü
Yeast Nitrogen Base* (1.7 g) + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (5 g)	100 ml suda çözülür
Glukoz, (20 g)	100 ml suda çözülür
L-Leucine, (0.39 g)	20 ml suda çözülür
L-Histidin, (0.05 g)	10 ml suda çözülür
Aminoasit Karışımı	700 ml suda çözülür
*YNB, (DIFCO, 0335-15-9)	

Yukarıdaki çözeltiler steril koşullarda karıştırıldı ve hacmi 1000 ml ye tamamlamak için 70 ml steril su ilave edildi. Bu şekilde hazırlanan BGM testlerde gerekli miktarlarda kullanıldı.

*Rekombinant maya testinde kullanılacak stok kültürün hazırlanması:*

Daha önceden genetik olarak modifiye edilmiş maya hücreleri, bir erlenmeyer de içine 10 ml BGM ilave edilerek çalkalayıcı bir inkübatör içinde 30 °C ve 130 devir/dakika da çoğalmaya bırakıldı. Daha sonra bu ortama %15 oranında DMSO ilave edilerek 0.5 ml lik bölümler halinde -80 °C de saklandı. Bu şekilde hazırlanan stok kültürü (Stock Culture, "SC") testlerde gerekli miktarlarda kullanıldı. Yapılan tüm işlemler steril koşullarda yapıldı.

*Rekombinant maya testinde kullanılacak başlangıç kültürünün hazırlanması:*

10 ml BGM steril koşullarda 100 ml lik bir erlenmeyer içine aktarılıp ve 40 \_1 SC ile inokule edildikten sonra çalkalayıcı bir inkübatörde 30 °C ve 130 devir/dakika da 24 saat bekletildi. Bu şekilde steril koşullarda çalışılarak başlangıç kültürü hazırlandı.

*Rekombinant maya testinde kullanılacak çalışma kültürünün hazırlanması:*

BGM'dan test süresince yetecek miktarda alındı ve bu ortama başlangıç kültüründen yeterli miktarda (sonuçta elde edilecek olan çalışma kültürünün optik dansitesi "OD<sub>600</sub>" 0.75 olacak miktarda) ilave edildi. Daha sonra 1 ml başına 1 \_1 olmak üzere % 1.25 lik CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O ilave edildi ve 30 °C ve 130 devir/dakika da 16 saat daha bekletildi. Süre sonunda ölçülen OD<sub>600</sub>



=  $0.75 \pm 0.05$  olmalıdır. Bu değerin üzerindeki okumalarda BGM ilave edilerek seyreltme yapılmalıdır. Süre sonunda testde kullanılacak çalışma kültürü (Working Culture, "WC") steril koşullarda hazırlandı.

Bu aşamadan sonra standartlar için 24 adet 100 ml lik steril erlenmeyer hazırlandı ve steril koşullarda yukarıda hazırlanmış olan çalışma kültüründen (WC) her birine 10 ml ve standartların hazırlanması bölümünde verilen konsantrasyonlar elde edilecek şekilde daha önce DMSO ile seyreltilerek hazırlanan 17  $\mu$  östradiol standartlarından 100'er/ilave edildi. Ayrıca DMSO ile bir seri negatif kontrol hazırlandı (her konsantrasyon için 3 ayrı erlenmeyer hazırlandı). *Kannabis* reçinesinden hazırlanan numuneler içinde 24 adet erlenmeyer yukarıdaki koşullarda hazırlandı ve bu toplam 48 erlenmeyer çalkalayıcı bir inkübatörde 2 saat 30°C de 130 devir/dakika de inkübe edildi (Hazırlanan 48 erlenmeyere ilave edilenler aşağıda gösterilmiştir).

#### STANDARTLAR için hazırlanan steril erlenmeyerler

	DMSO	03 nM	3 nM	5 nM	10 nM	100 nM	300 nM	1000 nM
I	10mlWC+ 100/1 DMSO	10mlWC+ 100/d std.	10 ml WC+ 100/d std.	10 ml WC+ 100/d std.	10mlWC+ 100/d std.	10 ml WC+ 100/d std.	10 ml WC+ 100/d std.	10 ml WC+ 100/d std.
II	10mlWC+ 100/d DMSO	10mlWC+ 100/d std.	10 ml WC+ 100/d std.	10mlWC+ 100/1 std.	10mlWC+ 100/d std.	10mlWC+ 100/d std.	10 ml WC+ 100/d std.	10mlWC+ 100/d std.
III	10mlWC+ 100/d DMSO	10mlWC+ 100/d std.	10mlWC+ 100/d std.	10mlWC+ 100/d std.	10mlWC+ 100/d std.	10mlWC+ 100/d std.	10mlWC+ 100/d std.	10mlWC+ 100/d std.

#### NUMUNELER için hazırlanan steril erlenmeyerler

	Numune 1	Numune 2	Numune 3	Numune 4	Numune 5	Numune 6	Numune 7	Numune 8
I	10mlWC+ 100/d CRK*	10mlWC+ 100/d CRK	10 ml WC+ 100/d CRK	10mlWC+ 100/d CRK	10 ml WC+ 100/dCRK	10 ml WC+ 100/dCRK	10 ml WC+ 100/dCRK	10mlWC+ 100/d CRK
II	10mlWC+ 100/dCRK	10mlWC+ 100/dCRK	10 ml WC+ 100/d CRK	10mlWC+ 100/d CRK	10mlWC+ 100/1 CRK	10mlWC+ 100/1 CRK	10mlWC+ 100/dCRK	10mlWC+ 100/d CRK
III	10mlWC+ 100/dCRK	10mlWC+ 100/dCRK	10mlWC+ 100/dCRK	10mlWC+ 100/dCRK	10mlWC+ 100/dCRK	10 ml WC+ 100/dCRK	10mlWC+ 100/dCRK	10mlWC+ 100/dCRK

\* CRK: *Kannabis* Reçinesi Kalıntısı (Hazırlanış *Kannabis* reçinesinin yakılması bölümünde anlatılmıştır)

Inkübasyon sonrasında tüm erlenmeyerlerden 200  $\mu$ l alınıp kendisine karşılık gelen bir eppendorf reaksiyon tüpünün içerisine aktarıldı. Böylece 48 adet eppendorf reaksiyon tüpü hazırlanmış oldu. Bu tüplerin her birine 620  $\mu$ l  $\beta$ -Galaktosidaz tampon çözeltisi ve 50  $\mu$ l kloroform ilave edildikten sonra 30 °C lik su banyosunda 5 dk bekletildi ve üzerine 200  $\mu$ l  $\beta$ -Galaktosidaz substrat çözeltisi ilave edildi. Tüpler 30 °C lik su banyosunda tekrar 30 dk

bekletildikten sonra üzerlerine 500 *µl* Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (% 10.6) ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Bütün eppendorf reaksiyon tüpleri 17000 devir/dakika de 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantın absorbanı 420 nm de suya karşı okundu.

## SONUÇ VE TARTIŞMA

Materyal ve yöntem bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanan *Kannabis* reçinesi numunesinin östrojenik aktiviteye sahip olup olmadığı rekombinant maya testi ile araştırılmış ve Tablo 1 deki sonuçlar elde edilmiştir.

**Tablo 1.** Maya testinde Standart ve Numuneler için elde edilen absorban değerleri

### STANDARTLAR İÇİN ELDE EDİLEN ABSORBANS DEĞERLERİ

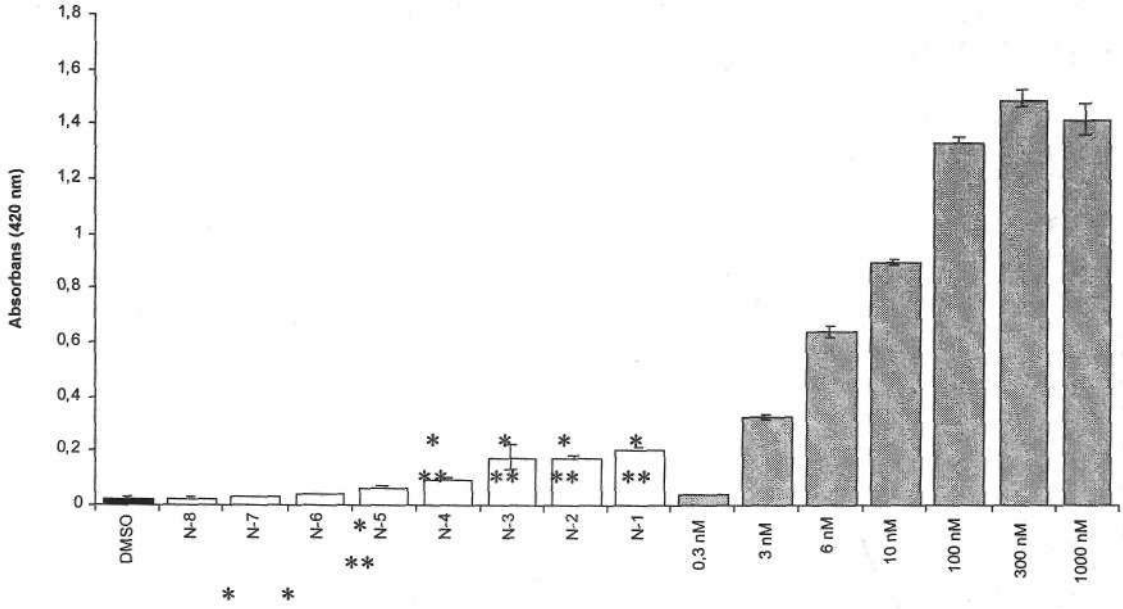
	DMSO	03 nM	3nM	5nM	10 nM	100 nM	300 nM	1000 nM
I	0,023	0,042	0,322	0,622	0,905	1,345	1,457	1,463
II	0,024	0,041	0,338	0,642	0,885	1,348	1,515	1,362
III	0,021	0,036	0,316	0,666	0,9	1,333	1,507	1,441
Ort.	0,0227	0,0397	0,3253	0,6433	0,8967	1,3420	1,4930	1,4220
St. Sp.	0,0015	0,0032	0,0114	0,0220	0,0104	0,0079	0,0314	0,0531

### NUMUNELER İÇİN ELDE EDİLEN ABSORBANS DEĞERLERİ

	Numune 8 (0.125 mg)*	Numune 7 (0.25 mg)*	Numune 6 (0.5 mg)*	Numune 5 (1 mg)*	Numune 4 (2 mg)*	Numune 3 (4 mg)*	Numune 2 (8 mg)*	Numune 1 (16 mg)*
I	0,027	0,029	0,041	0,064	0,098	0,141	0,178	0,213
II	0,026	0,030	0,040	0,067	0,102	0,155	0,169	0,211
III	0,026	0,030	0,038	0,067	0,099	0,223	0,181	0,210
Ort.	0,0263	0,0297	0,0397	0,0660	0,0997	0,1730	0,1760	0,2113
St. Sp.	0,0006	0,0006	0,0015	0,0017	0,0021	0,0439	0,0062	0,0015

\* Hazırlanan *Kannabis* reçinesi numunelerinden test için 100 *er/ft* kullanıldığında, *Kannabis* reçinesi kalıntısının 10 ml lik çalışma kültüründeki mg olarak miktarıdır (*Kannabis* reçinesinin yakılması bölümünde 1 ml DMSO içine alınan kalıntının 0.16 g olduğu belirtilmiştir).

Tablo 1 de elde edilen absorbanlar grafiğe aktarıldığında (Şekil 3) *Kannabis* numunelerinden elde edilen absorban değerlerinin negatif kontrol olarak kullanılan DMSO dan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu (f-test, p<0.05) ve dolayısı ile östrojenik aktiviteye sahip oldukları görülmektedir (8 numaralı numune hariç).

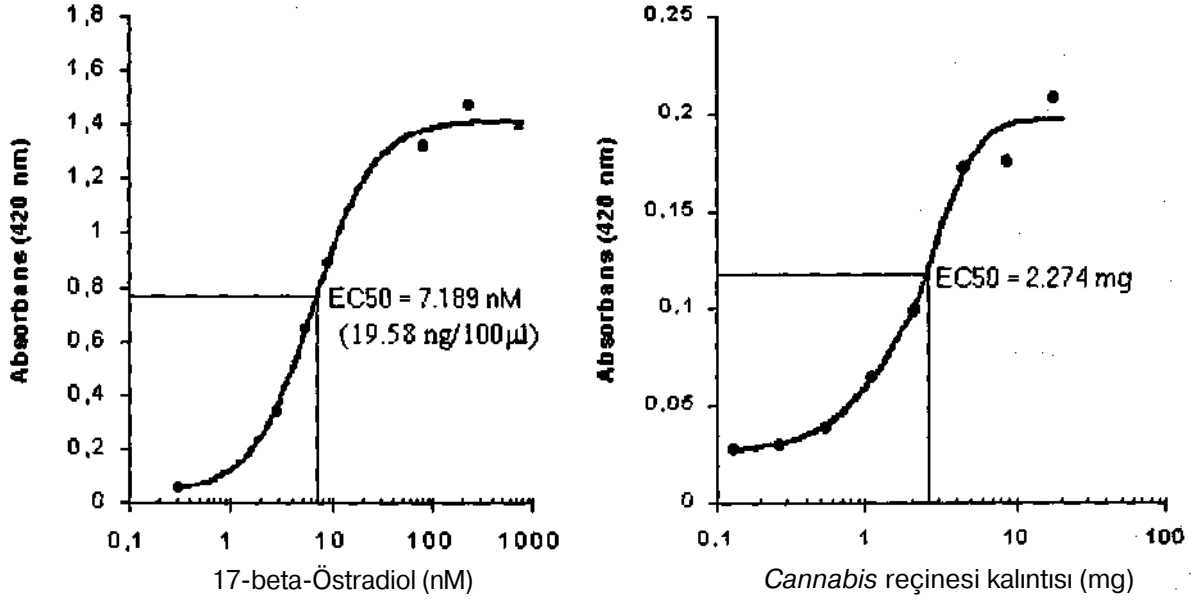


**Şekil 3.** Maya testine göre; negatif kontrol olarak kullanılan DMSO (siyah bar), *Kannabis* numuneleri (beyaz barlar) ve pozitif kontrol olarak kullanılan 17 \_ östradiol (gri barlar) için elde edilen absorbans değerleri görülmektedir. Buna göre 128 kat seyreltilen 8 numaralı numune hariç seyreltilmiş diğer 7 adet *Kannabis* numuneleri için istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde DMSO ya göre daha yüksek absorbans değerleri elde edilmiştir (\* Mest  $p < 0.05$ , DMSO'nun verdiği absorbansa göre yüksek, \*\* Mest  $p < 0.01$ , 0,3 nM 17 \_ östradiol ün verdiği absorbansa göre yüksek).

Ayrıca Tablo 1 de görülen absorbans ve dozlar Logaritmik skalalı bir grafiğe aktarıldığında Şekil 4 deki sigmoid eğriler elde edilmiştir. "GraphPad Prism 4" istatistik programı kullanılarak hem 17 \_ östradiol hem de *Kannabis* Reçinesi kalıntısı için  $EC_{50}$  (medyan efektif konsantrasyon) konsantrasyonları hesaplanmıştır. Buna göre 17 \_ östradiol için  $EC_{50} = 7.189$  nM (19.58 ng/100 \_1), *Kannabis* Reçinesi dumanının kondensatı için  $EC_{50} = 2.274$  mg olarak bulunmuştur.

Tablo 1 ve Şekil 3 deki sonuçlar incelendiğinde *Kannabis* reçinesi dumanından hazırlanan numunelerin negatif kontrol olarak kullanılan DMSO dan daha yüksek absorbans verdikleri ve sonuç olarak östrojenik aktiviteye sahip oldukları anlaşılmaktadır. Numuneleri seyreltilmesi bölümünde de görüldüğü gibi hazırlanan numuneler geometrik olarak seyreltilmiş ve buna göre 8 ayrı konsantrasyonda numune elde edilmiştir. Bu numunelerden 128 kez seyreltilen 8 numaralı numune haricinde tüm numuneler negatif standart olarak kullanılan DMSO dan istatistiksel olarak (Mest  $p < 0.05$ ) daha yüksek absorbans vermişlerdir. Ayrıca 1,2,3,4 ve 5 numaralı numunelerin her biri için de pozitif kontrol olarak kullanılan 0,3 nM konsantrasyonundaki 17 \_ östradiol den istatistiksel olarak daha yüksek (Mest  $p < 0.01$ )

absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu durumda 1,2,3,4 ve 5 numaralı numunelerin sırası ile 16, 8, 4, 2, ve 1 mg *Kannabis* reçinesi dumanının kondensatını içerdikleri düşünülürse bu miktarların 0.3 nM 17 \_ östradiol den daha yüksek östrojenik aktivite gösterdikleri anlaşılmaktadır.



**Şekil 4.** 17 \_ östradiol (konsantrasyonlar nM cinsinden Logaritmik skala üzerinde verilmiştir) ve *Kannabis* Reçinesi kalıntısının (hazırlanan numunelerdeki kalıntı mg cinsinden yine Logaritmik skala üzerinden verilmiştir) maya testi sonuçlarına göre östrojenik aktiviteleri.

Şekil 4 de *Kannabis* reçinesi kondensatınının mg olarak miktarına karşılık absorbanslar grafiğe geçirilmiş ve sigmoidal bir eğri elde edilmiştir. Bu eğriden de anlaşılacağı gibi konsantrasyona karşı absorbans artışı sürekli değildir ve belli bir konsantrasyondan sonra plato oluşturmaktadır. Bu durum östrojenik aktivite gösteren kimyasal maddeler için bilinen bir doz cevap ilişkisidir. Aynı ilişki pozitif kontrol olarak kullanılan 17 \_ östradiol için de gözlenmiştir. Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz doz cevap ilişkisi göz önünde bulundurulduğunda 2.274 mg duman kondensatı, *Kannabis* dumanının oluşturabileceği maksimum östrojenik aktivitenin % 50 sini oluşturabilmektedir ( $EC_{50} = 2.274$  mg). Bu çalışmada bu değer pozitif kontrol olarak kullanılan 17 \_ östradiol için 7.189 nM (19.58 ng/100 \_1) olarak hesaplanmıştır (Şekil 4).

Bu çalışma *Kannabis* reçinesinin yakılması ile oluşan dumanın östrojenik aktivite gösterdiğini kanıtlamaktadır. Ancak bilindiği gibi yanma sonucunda oluşan dumanın içerisinde sayısız miktarda kimyasal madde bulunmaktadır. Bu kimyasal maddelerden hangisinin östrojenik aktiviteden sorumlu olduğu konusunda yapmış olduğumuz çalışmanın sonuçlarına göre bir değerlendirme yapmak mümkün değildir. Bilindiği gibi *Kannabis* ürünlerindeki temel

psikoaktif madde  $\Delta^9$  - THC dür ve *Kannabis* reçinesindeki miktarı üretildiği bölgelere göre değişmekle beraber ortalama % 2 - 10 arasındadır (7,8). Bunun yanında kannabinol ve kannabidiol *Kannabis* ürünlerinde yer alan diğer minör kannbinoidlerden en önemlileri olarak karşımıza çıkmaktadır (7,8). Çalışmamızın sonuçlarına göre östrojenik aktiviteden bunlardan hangisinin veya hangilerinin sorumlu olduğunu söylemek mümkün değildir. Bu nedenle bu çalışma bu aktif maddeleri tek tek ve kombine halde test ederek devam ettirilebilir ve bu konuda daha kesin bir değerlendirme yapılabilir. Bu çalışmada, *Kannabis* dumanı içerisinde hangi aktif maddelerin östrojenik aktiviteye sahip olduklarının tespit edilmediği ve östrojenik aktivite gösteren kimyasal maddelerin elde ettiğimiz duman kalıntısı içinde hangi oranda bulduklarının bilinmediği göz önünde bulundurulmalıdır. Çünkü östrojenik aktiviteden eğer *Kannabis* dumanı içerisinde bulunan kannabinoidler sorumlu ise *Kannabis* reçinesinin içindeki kannabinoid miktarları ve oranları bitkinin yetiştiği bölgelere göre büyük değişiklikler gösterecektir (8). Bu durumda dünyanın farklı coğrafi bölgelerinde hazırlanan *Kannabis* reçinesinin dumanı da östrojenik aktivite yönünden farklılıklar gösterecektir. Bu nedenle bu çalışmada sadece elde ettiğimiz *Kannabis* dumanının negatif kontrol dan daha yüksek bir östrojenik aktivite gösterdiği ve ayrıca 1-5 numaralı numunelerin 0.3 nM  $17\beta$  - östradiol den daha yüksek östrojenik aktivite gösterdikleri belirtilmiş ve varsayımlar üzerine yorum yapılmamıştır. Ancak yukarıda açıklanan belirsizliklere rağmen bu çalışma en azından *Kannabis* reçinesinin dumanının östrojenik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Sonuçlar bu yaklaşım ile değerlendirildiğinde *Kannabis* reçinesinin dumanında giriş bölümünde EDCs olarak tanımladığımız özelliklere sahip kimyasal maddelerin bulunduğu anlaşılmaktadır. Uyuşturucu maddeler kapsamında olan *Kannabis* reçinesinin özellikle sigara gibi içilmek sureti ile çok yaygın olarak kullanılıyor olması elde edilen bu sonucun önemini arttırmaktadır.

Sonuç olarak *Kannabis* reçinesini sigara gibi hazırlayıp içen ve dolayısı ile dumanına maruz kalan kişiler *Kannabis* ürünlerinin sebep olduğu bilinen sağlık sorunlarının yanısıra östrojenik aktiviteye sahip kimyasal maddelerin yarattıkları sağlık sorunlarıyla da karşılaşabileceklerdir. Ayrıca bu çalışma *Kannabis* reçinesi dumanının östrojenik aktiviteye sahip olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Çalışmamızın bir diğer önemli sonucu da bu yöntemin kolaylıkla bitki ekstrelerine ve çevresel numunelerin ekstrelerine uygulanabilecek olmasıdır. Bu nedenle bundan sonra çevresel ve bitkisel ekstrelerde yapılacak olan çalışmalara kolaylıkla uyarlanabilecek bir test yöntemi olarak düşünülebilir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma Almanya'da GSF (GSF-Institut für Ökologische Chemie, Neuherberg, Germany) laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Bu nedenle çalışma esnasında kullanılan rekombinant maya örneğini temin eden, laboratuvarının bütün imkanlarını sunan ve her türlü teknik desteği veren Dr. Kari Werner Schramm'a ve test prosedürü ile ilgili karşılaşılan sorunlarda yardımlarını esirgemeyen Karin Doods'a teşekkür ederim.

**KAYNAKLAR**

1. **Gaido, K.W., Leonard, L.S., Lovell, S., Gould, J.C., Babai, D., Portier, C.J., McDonnell, D.P.**, "Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay" *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **143**, 205-212,(1997).
2. **Routlage, E J., Sumpter, J.P.**, "Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen" *Environ. Toxicol. Chem.*, **15 (3)**, 241-248, (1996).
3. **Tyler, C.R., Beresford, N., Van Der Moning, M., Sumpter, J.P., Thorpe, K.**, "Metabolism and environmental degradation of pyrethroid insecticides produce compounds with endocrine activities" *Environ. Toxicol. Chem.*, **19 (4)**, 801-809, (2000).
4. **Routlage, E.J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., Sumpter, J.P.**, "Some akyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic" *Toxicol. Applied Pharmacol.*, **153**, 12-19,(1998).
5. **Beresford, N., Routlage, E.J., Harris, C.A., Sumpter J.P.**, "Issues arising when interpreting results from an in vitro assay for estrogenic activity" *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **162**,22-33, (2000).
6. **Rehmann, K., Schramm, K.W., Kettrup, A.A.**, "Applicability of a yeast oestrogen screen for the detection of oestrogen-like activities in environmental samples" *Chemosphere*, **38 (14)**, 3303-3312, (1999).
7. *Recommended methods for testing Cannabis*, Manuel for use by National Narcotic Laboratories, United Nations, ST/NAR/8, (1993).
8. **Duydu, Y., Vural, N.**, "Haşış içindeki majör kannabinoidler olan THC, CBD ve CBN'in İTK ve kapiler gaz kromatografisi yöntemleri ile tayinleri" *GATA Bülteni*, **38**, 292-296 (1996).
9. **Mason, A.P., McBay, A.J.**, "Cannabis: pharmacology and interpretation of effects" *J. Forensic Sci.*, **30**,615-625 (1985).
10. **Hollister, L.E.**, "Health aspect of cannabis" *Pharmacol. Rev.*, **38(1)**, 1-20 (1986).