T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

CLOCK Proteininin Fonksiyonunu Düzenleyen CLK-8 Bileşiğinin Faredeki Farmakokinetiği

ELİF GERGER

DANIŞMAN
PROF. DR. ALPER OKYAR

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

ELİF GERGER

İTHAF

Sevgili Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans yolculuğuna başladığımdan beri beni eğitimim ve tez sürecim boyunca her zaman destekleyen, değerli hocam Sayın **Prof. Dr. Alper Okyar**'a,

Laboratuvar çalışmalarım ile ilgili her şeyi çekinmeden sorduğum, bana her zaman bütün bilgileri içtenlikle aktarmaya çalışan, tez çalışmamı bitirebilmemde çok büyük emeği olan sevgili **Dr. Öğr. Üyesi Ecz. Dilek Öztürk Civelek**'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca kıymetli tecrübelerini aktaran başta Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Sönmez Uydeş Doğan** olmak üzere **Farmakoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli hocalarına**,

CLK-8 molekülünün ilk karakterizasyonunu yapan Koç Üniversitesi Mühendislik Fakültesi'nden **Prof. Dr. İbrahim Halil Kavaklı**'ya,

Hayatım boyunca olduğu gibi, yüksek lisans eğitimimde de beni her koşulda her zaman destekleyen, beni yetiştiren çok **sevgili anneme, babama, ağabeyime**,

Bana güç veren, motivasyon kaynağım olan **canım arkadaşlarıma**,

Tüm kalbimle teşekkür ediyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 39301)

İÇİNDEKİLER

BEYAN ..... İİ
İTHAF ..... İİİ
TEŞEKKÜR ..... İV
İÇİNDEKİLER V
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... İX
ÖZET ..... Xİ
ABSTRACT ..... Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Biyolojik Ritimler 3
2.1.1. Sirkadiyen Ritim 3
2.1.2. Memelilerde Sirkadiyen Saat 4
2.1.3. Periferik Saatler 4
2.1.4. Sirkadiyen Saatin Moleküler Mekanizması 7
2.2. Preklinik Araştırmalarda Farmakokinetiğin Önemi 9
2.2.1. Farmakokinetik 9
2.2.2 Farmakokinetik Çalışmaların İlaç Geliştirmedeki Rolü Nedir? 11
2.3. Merkezi Saati Hedefleyen Küçük Molekül Modülatörler 13
2.4. Sirkadiyen Saat ile İlişkili Hastalıklar ve Küçük Molekül Modülatörlerin Farmakolojik Etkileri 15
2.5. CLK-8 19
3. GEREÇ VE YÖNTEM 21
3.1. Kullanılan Kimyasallar, Cihazlar, Programlar 21
3.2. Hayvanlar ve Barındırılma Şekli 22
3.3. İlaç Uygulama ve Numune Toplama 22
3.4. CLK-8 Plazma ve Dokulardan Miktar Tayini 23
3.4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması 23
3.4.2. Plazma ve Doku Standartlarının Hazırlanması 23
3.4.3. Örnek hazırlama 24

3.5. LC-MS/MS Analizi 24
3.6. Metot Validasyonu 25
3.7. Farmakokinetik Analizler 25
4. BULGULAR 26
4.1. Metod Validasyonu ile İlgili Bulgular: 26
4.1.1. Plazma Verilerine İlişkin Bulgular 27
4.1.2. Karaciğer Dokusu Verilerine İlişkin Bulgular 28
4.1.3. Beyin Dokusu Verilerine İlişkin Bulgular 29
5. TARTIŞMA 34
KAYNAKLAR 38
ETİK KURUL KARARI 42
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 44
ÖZGEÇMİŞ 45

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Çekirdek saat proteinlerini hedefleyen küçük molekül modülatörleri. 13
Tablo 2: Kullanılan Kimyasallar.....21
Tablo 3: Cihazlar ve Sarf Malzemeler.....21
Tablo 4: Programlar.....22
Tablo 5: HPLC Koşulları:.....24
Tablo 6: Plazmadan CLK-8 tayini için geliştirilen LC-MS/MS metodunun validasyon verileri.....27
Tablo 7: Karaciğer CLK8 tayini için geliştirilen LC-MS/MS metodunun validasyon verileri.....28
Tablo 8: Beyin CLK-8 tayini için geliştirilen LC-MS/MS metodunun validasyon verileri. 29
Tablo 9: Farelerde CLK-8'in plazma, karaciğer, beyin farmakokinetik verileri. 30

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Moleküler saat, periferik saat ve senkronizasyonu. 6
Şekil 2-2:Farmakokinetik (Absorpsiyon, dağılım, metabolizma, eliminasyon). (55).....10
Şekil 2-3: Sirkadiyen saat döngüleri ve küçük molekül modülatörlerin olası moleküler hedefleri. 15
Şekil 2-4: Sirkadiyen ritmin etkilediği fizyolojik sistemler. 16
Şekil 2-5: Memelilerde sirkadiyen gen ağı ve genom çapında düzenleme katmanları. ..19
Şekil 2-6: CLK-8 molekülünün kimyasal yapısı.....20
Şekil 4-1: CLK-8 plazma standardına ait kromatogram (10 µg/ml) 26
Şekil 4-2: CLK-8 plazma standart eğrisi 27
Şekil 4-3: CLK-8 karaciğer standart eğrisi 28
Şekil 4-4: CLK-8 beyin standart eğrisi.....29
Şekil 4-5: C57BL/6J soyu erkek farelere intraperitoneal 50 mg/kg CLK-8 uygulanmasını takiben elde edilen CLK-8'e ait plazma konsantrasyon-zaman grafiği. 31
Şekil 4-6: C57BL/6J soyu erkek farelere intraperitoneal 50 mg/kg CLK-8 uygulanmasını takiben elde edilen CLK-8'e ait karaciğer konsantrasyon-zaman grafiği. 31
Şekil 4-7: C57BL/6J soyu erkek farelere intraperitoneal 50 mg/kg CLK-8 uygulanmasını takiben elde edilen CLK-8'e ait beyin konsantrasyon-zaman grafiği. 32
Şekil 4-8: C57BL/6J soyu erkek farelere intraperitoneal 50 mg/kg CLK-8 uygulanmasını takiben elde edilen CLK-8'e ait plazma, karaciğer, beyin $AUC_{0\text{-}48sa}$ değerleri. 32
Şekil 4-9: C57BL/6J soyu erkek farelere intraperitoneal 50 mg/kg CLK-8 uygulanmasını takiben elde edilen CLK-8'e ait plazma, karaciğer, beyin AUC_{total} değerleri. 33
Şekil 4-10: C57BL/6J soyu erkek farelere intraperitoneal 50 mg/kg CLK-8 uygulanmasını takiben elde edilen CLK-8'e ait plazma, karaciğer, beyin Vd değerleri. 33

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACTH: Adrenokortikotropik Hormon

ADME: Absorpsiyon-Dağılım-Metabolizma-Eliminasyon

AKT: Protein kinaz B

AMPK: AMP-aktive edilmiş protein kinaz

ARF-BP1/PAM: ARF-bağlı protein 1/Poksvirus ve Adenovirus E3 ubikitin-protein ligaz

ASPS: Erken uyku fazı bozukluğu (Delayed sleep phase disorder)

AUC: Plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altında kalan alan (Area Under the Curve)

BMAL1 (Arntl): Brain-muscle-arnt-like 117 protein 1

bHLH: basic-helix-loop-helix

β-TrCP: β-Transducin repeat-containing protein

BY: Biyoyararlanım

cAMP: Siklik adenozin monofosfat

CCG: Clock controlled genes

CK1 δ: Kazein kinaz 1 δ

CK1 ε: Kazein Kinaz 1 ε

CLOCK: Circadian locomotor output cycles kaput

C_{maks}: Maksimum konsantrasyon

CREB: Siklik AMP Regülatuar Eleman Bağlayıcı Protein

Cry: Kriptokrom (Cryptochrome)

CYP450: Sitokrom P450 enzimleri

DBP: Albümin promotör bağlanma bölgesindeki d sitesi bağlayıcı protein

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribo nükleik asit

DSPS: Gecikmiş uyku fazı bozukluğu (Delayed sleep phase disorder)

E-box: Enhancer box

FASPD: Ailesel ileri uyku fazı bozukluğu (Familial advanced sleep phase disorder)

FBXL3: F kutusu ve Lösin zengin tekrarlı protein 3

GSK3β: Glikojen sentaz kinaz 3 β

G6PC: Glukoz-6-fosfataz

HPA: Hipotalamik-hipofiz-adrenal

HPLC: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High pressure liquid chromatography)

IL: İnterlökin

i.p. intraperitoneal

i.v. intravenöz

$\mathbf{k_{el}}$: Eliminasyon hız sabiti

LPS: Lipopolisakkarit

LXR: Liver X receptor (Karaciğer X reseptörü)

MeOH: Metanol

NFIL3: Nuclear factor, interleukin 3 regulated

NPAS2: Neuronal PAS domain protein 2

PAS: Per-Arnt-Sim

PCK1: Fosfoenolpirüvat Karboksikinaz 1

PER: Period

PPARα: Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör alfa (Peroxisome proliferatoractivated receptor alpha)

PTM: Post-Translasyonel Modifikasyon

REV-ERBα: Nükleer reseptör Rev-Erb alfa (Nuclear receptor Rev-Erb alpha)

RORE: Retinoik asit ilişkili yetim reseptör yanıt elemanı (Retinoik asid related orphan receptor (ROR) response element)

ROR: Retinoik asid ilişkili yetim reseptör (Retinoik asid-related orphan receptor)

SEM: Standart hata (Standard error of the mean)

SIRT1: Sirtuin 1

SKÇ: Suprakiazmatik çekirdek (SCN; Suprachiasmatic nucleus)

$\mathbf{t_{1/2}}$**:** Eliminasyon yarılanma ömrü

Th17: T yardımcı hücresi

tmaks: Maksimum konsantrasyona ulaşma zamanı

TOP1: Topoizomeraz 1

TTFL: Transkripsiyon-translasyon geri besleme döngüsü

ZT: Zeitgeber Time (Zaman/Ritim Verici)

ÖZET

Gerger, E., (2024). CLOCK Proteininin Fonksiyonunu Düzenleyen CLK-8 Bileşiğinin Faredeki Farmakokinetiği. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Sirkadiyen ritimler, 24 saatlik periyotlarda tekrarlanan biyolojik döngülerdir. Son dönemlerde, sirkadiyen saatin önemi nedeniyle çekirdek saat mekanizmasını hedefleyen küçük molekül modülatörlerin geliştirilmesi ivme kazanmıştır. Bu, çeşitli fizyolojik ve metabolik bozukluklara etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayabilir. CLK-8, sirkadiyen ritmi artıran bir molekül adayıdır, BMAL1 ve CLOCK proteinlerinin etkileşimini düzenleyerek moleküler saat mekanizmasında kilit bir rol oynar. Çalışmamızda, CLK-8'in parenteral uygulama sonrası plazma farmakokinetiğinin ortaya konması amaçlanmıştır. CLK-8 molekülü uygun bir formülasyonla erkek farelere intraperitoneal (i.p.) yoldan tek dozda uygulanmıştır. Uygulamayı takiben 30. dk, 1., 2., 4., 6., 10., 24., 48. saatlerde kan örnekleri alınmış ve plazmalar elde edilmiştir. Plazma örneklerinde miktar tayini için geçerli LC-MS/MS yöntemleri kullanılmış ve plazma konsantrasyonları hesaplanmıştır. Temel farmakokinetik parametreler, pik plazma konsantrasyonu (C_{maks}), pik konsantrasyona ulaşma süresi (t_{maks}), ortalama eliminasyon yarılanma ömrü ($_{t1/2}$) ve eğri altında kalan alan ($AUC_{0\text{-}48sa}$) verileri 0-48 saat için hesaplanmıştır. Bu çalışma, CLK-8'in farelerde i.p. uygulama sonrası farmakokinetik özelliklerini ilk kez ortaya koymuştur. Molekülün faredeki eliminasyon yarılanma ömrü yaklaşık 12 saat olarak hesaplanmıştır. CLK-8'in karaciğer dokusuna geniş olarak dağıldığı ve yüksek yağda çözünürlüğü nedeniyle beyin dokusuna da geçtiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sirkadiyen ritim, CLK-8, farmakokinetik, LC-MS/MS

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 39301)

ABSTRACT

Gerger, E. (2024). Pharmacokinetics of the CLK-8 Compound Regulating CLOCK Protein Function in Mice. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmacology. MSc. Thesis. İstanbul.

Circadian rhythms are biological cycles that repeat approximately every 24 hours. Recently, the development of small molecule modulators targeting the core clock mechanism has gained momentum due to the importance of the circadian clock in regulating various physiological and metabolic processes. CLK-8 is a candidate molecule that enhances circadian rhythm by regulating the interaction of BMAL1 and CLOCK proteins, which play a key role in the molecular clock mechanism. This study aims to determine the plasma pharmacokinetics of CLK-8 following parenteral administration. The CLK-8 molecule was administered to male mice via the intraperitoneal route (i.p.) in a single dose with an appropriate formulation. Blood samples were collected at 30 minutes, and 1, 2, 4, 6, 10, 24, and 48 hours post-administration, and plasma was obtained. Validated LC-MS/MS methods were used for the quantification of plasma samples, and plasma concentrations were calculated. Basic pharmacokinetic parameters, peak plasma concentration level (C_{max}), time to reach peak concentration (t_{max}), mean elimination half-life ($t_{1/2}$), and area under the curve (AUC_{0-48h}), were calculated for the 0-48 hour period. This study is the first to determine the pharmacokinetic properties of CLK-8 in mice following i.p. administration. The elimination half-life of the molecule in mice has been calculated to be approximately 12 hours. It has been determined that CLK-8 is widely distributed in liver tissue and, due to its high lipid solubility, also crosses into brain tissue.

Key Words: Circadian rhythm, CLK-8, pharmacokinetics, LC-MS/MS

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 39301

1. GİRİŞ VE AMAÇ

"Sirkadiyen (Circadian)" kelimesi Latinceden türetilmiş olup "yaklaşık bir gün" anlamına gelmektir. Memelilerde ise sirkadiyen ritim organizmanın günlük aktivitelerini belirli zaman dilimlerinde yerine getirmesine olanak sağlamaktadır. İnsanların sirkadiyen ritim (24 saatlik döngüde) içerisinde yaşadığı bazı değişimler şunlardır: Saat 02.00'de vücut en derin uyku evresine girer. Bu, aynı zamanda vücudun kendini onardığı ve ertesi gün için enerji depoladığı zamandır. 04.30'da vücut sıcaklığı en düşük düzeyine iner. 07.30'da melatonin salgılanması durur ve vücut uyanmaya başlar. Saat 10.00'da yüksek bir uyanıklık aşamasına geçilir. 15.30'da vücut en yüksek tepki hızına ulaşır. 17.00'de kalp-damar sisteminin işleyiş etkinliği ve kas gücü en yüksek düzeyine çıkar. Fizyolojik açıdan yoğun egzersizler için bu iyi bir zamandır. 19.00'da vücut sıcaklığı tepe noktasına çıkar. 21.00'de melatonin salgılanması başlar ve vücudu yorgun hissettirerek uykuya dalmasını sağlar. Tüm bu fiziksel, zihinsel ve davranışsal değişimlerin düzenlenebilmesi için çok sayıda genin sirkadiyen saatle kontrol edilmesi beklenir. Farelerde yapılan çalışmada genlerin yaklaşık %35'i ve protein kodlayan genlerin %43'ü sirkadiyen saatin kontrolü altında olduğu belirlenmiştir (1). Çok sayıda gen ifadesi ve metabolitlerin sirkadiyen saate bağlı olarak üretilmesinden dolayı, sirkadiyen saatte olası bir bozukluğun birçok hastalığa neden olması veya yatkınlığı artırması beklenmektedir (2). Sirkadiyen ritmin bozulması duygudurum bozukluklarına, hızlı yaşlanmaya, metabolik hastalıklara neden olabilir. Bu nedenle, sirkadiyen ritmi düzenleyen çekirdek proteinlerini spesifik olarak modüle eden küçük moleküllerin tanımlanması, bu bozuklukların daha iyi yönetilmesini sağlayabilir. Doruk ve ark., CLOCK proteinine özgü olarak bağlanan küçük molekülleri keşfetmek amacıyla yapı tabanlı bir moleküler yerleştirme yöntemi kullanmıştır. CLK-8 adlı, CLOCK proteinine spesifik olarak bağlanan bir molekül bulunmuş ve detaylı biyokimyasal karakterizasyonu tamamlanıp yayınlanmıştır (3). CLK-8'in CLOCK ve BMAL1 arasındaki etkileşimi düzenlediği böylece CLOCK'un çekirdek translokasyonuna müdahale ettiği in vitro ve ex vivo çalışmalarda belirlenmiştir. CLK-8 ile muamele edilen hücrelerin çekirdeklerinde kontrol gruplarına göre anlamlı olarak daha az miktarda CLOCK ve BMAL1 proteinleri belirlenmiştir (3). Bunun sonucu olarak, CLK-8, hücrelerdeki periyot uzunluğunu etkilemeden transkripsiyon/translasyon geri besleme döngüsünün negatif kolunu stabilize ederek sirkadiyen ritmin genliğini

arttırmıştır. Fare modellerinde yaşlılığa bağlı olarak sirkadiyen ritim genliğinin düştüğü birçok çalışmada gösterilmiştir (2, 4).

Sağlam bir sirkadiyen ritim olmadan, organizmalar çevresel değişikliklere yeterince uyum sağlayamazlar ve bu da sirkadiyen saatin evrimsel amacını bozar. Bozulmuş bir sirkadiyen ritmi değiştirmek için küçük moleküller büyük önem taşır çünkü bunlar sistem üzerinde tersine çevrilebilir ve zamana ve doz ayarlı etkilere sahiptir (5). Düzensizleşmiş ritimleri düzeltmek ve dolayısıyla hastalık belirtilerini ve yaşlandırmayı hafifletmek için CLK-8'in sirkadiyen ritim üzerindeki amplitüd artırıcı etkisinin in vivo ortamda gösterilmesi durumunda ilaç adayı bir molekül olduğu gösterilmektedir (3). Yaşlanmanın yanı sıra; metabolik, psikiyatrik, nörodejeneratif hastalıklar gibi diğer kronik hastalıkların da sirkadiyen ritim ile ilişkilendirildiği gösterilmiştir (6).

İlacın klinik olarak etkinliğinin belirlenebilmesi için farmakokinetik çalışmalara ihtiyaç vardır. Başlıca değerlendirilen farmakokinetik parametreler; ilacın absorpsiyonu, dağılımı, metabolizması ve eliminasyonudur. Bu tez çalışmasında CLK-8 molekülünün farmakokinetiğini belirlemek üzere 40 erkek fareye parenteral yoldan CLK-8 maddesi uygulanmıştır. Belirli zaman aralıklarında farelerden alınan kan ve doku örnekleri incelenmiş, farmakokinetik hesaplamalar ve analizler yapılmıştır. Bu projede yapılan çalışmalar doğrultusunda CLK-8'in plazma farmakokinetik profili belirlenmiş ve dokulara dağılımı da incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyolojik Ritimler

Biyolojik ritimler; canlı organizmaların tekrarlayan çevresel faktörlere yanıt olarak gösterilen döngüsel, biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal tepkileri ifade eder (7, 8). Biyolojik ritimler ve onların zamansal organizasyonu, Dünya'nın kendi ekseni etrafındaki dönüşü ve Güneş'in etrafındaki yörüngesiyle ilişkili periyodik değişikliklere uyum sağlayan adaptif fenomenlerdir (9). Mavi-yeşil alglerden insanlara kadar çoğu tür, zamansal değişikliklere uyum sağlamak için endojen biyolojik ritimler geliştirmiştir (10). Biyolojik saatin oluşturduğu ritimler genellikle ultradian (τ < 20 saat, τ = periyod uzunluğu), sirkadiyen (τ = 20 ila 30 saat) ve infradian (τ > 30 saat) gibi farklı zaman ölçeklerine ayrılır (11, 12). Biyolojik ritim, organizmanın gün ve gece ile ilişkilendirilen fiziksel çevredeki değişikliklere hazırlanmasına ve bunları önceden tahmin etmesine olanak tanır (11-13).

Biyolojik ritimler, organizmanın fizyolojik işlevlerin düzenli bir şekilde gerçekleşmesini sağlar. Bir organizmanın dış ve iç çevresiyle senkronizasyonu, organizmanın refahı ve hayatta kalması için hayati öneme sahiptir. (13).

2.1.1. Sirkadiyen Ritim

"Sirkadiyen" terimi, Latince "circa ve dies" ifadesinden gelir, bu da "bir gün" demektir.

Bakterilerden, mantarlardan, bitkilere, meyve sineklerine, balıklara, farelere ve insanlara kadar neredeyse tüm yaşam formları sirkadiyen ritim sergiler. Sirkadiyen saat birçok biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyona günlük ritim verir (8, 14). Bu ritimler, uyku-uyanıklık döngüleri, hareket aktivitesi, kan basıncı, sindirim, hormon salınımı, vücut sıcaklığı değişimleri gibi birçok fizyolojik ve davranışsal süreci düzenler (11, 15). Bu iç saatin varlığı, bir organizmanın fizyolojisini gece ile gündüz arasındaki geçişlere göre uyum sağlamasına olanak tanır. Düzenli işleyen sirkadiyen ritimlerin bozulması, nörodejenerasyon ve metabolik bozukluklar da dahil olmak üzere klinik olarak önemli bozukluklara yol açar (1).

2.1.2. Memelilerde Sirkadiyen Saat

Memelilerdeki sirkadiyen sistem, merkezi bir zamanlayıcı olan ön hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeğinde (SKÇ) hiyerarşik bir düzende organize edilmiştir. Son zamanlarda, sirkadiyen saatlerin SKÇ dışındaki ek beyin bölgelerinde, retinada ve birçok periferik dokuda da bulunduğu gözlenmiştir (16). Bu merkezi zamanlayıcı; karaciğer,pankreas, bağırsaklar, iskelet kası ve adipoz doku gibi diğer vücut dokularında yer alan bir dizi periferik sirkadiyen osilatörleri senkronize eder (17).

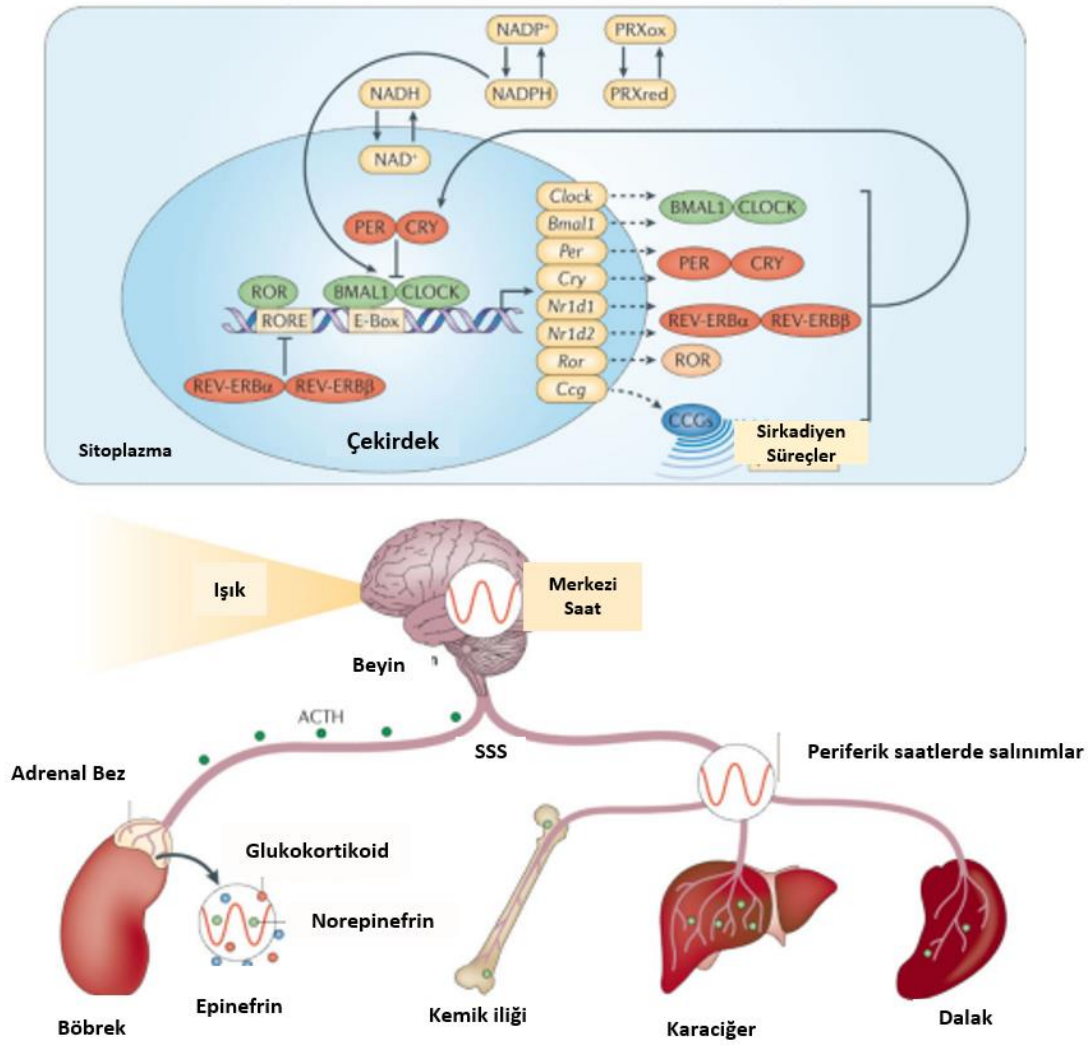
Retina ışığı algıladığı zaman, retinohipotalamik yol adı verilen bir sinir demeti aracılığıyla SKÇ aktivasyonu gerçekleşir (18). Merkezi saat, vücudu ışığa göre ayarlar ve genellikle ışık ve karanlık döngüsünü kullanır (11). Sirkadiyen zamanlayıcı, her gün retinadaki ışık tarafından sıfırlanır ve özel monosinaptik projeksiyonlar tarafından aktive edilir. Bu aktivasyon, saat genlerinin transkripsiyonunu ve kromatin yeniden düzenlenmesini içeren çeşitli sinyal yollarının devreye girmesine neden olur. (19). SKÇ, gündüz vakti yüksek metabolik aktiviteye sahiptir, ancak geceleyin bu aktivite düşer. Ancak gece periyodunda, metabolik aktivite ışığa akut maruziyet oluşursa artabilir. Zeitgeber; biyolojik saati sıfırlayan herhangi bir uyarıcı (ritim verici) olarak tanımlanır. (20). Işık, insanlarda ana ritim vericidir ve sirkadiyen fazı değiştirebilir. SKÇ'nin etkilediği önemli mekanizmalar arasında beslenme, uyku-uyanıklık döngüsü, glukoz metabolizması, insülin salınımı, öğrenme ve hafıza gibi metabolik olaylar yer alır. (15, 21).

2.1.3. Periferik Saatler

Merkezi saat, tüm organizma boyunca birbirini takip eden birden fazla periferik saati senkronize ederek ortak bir ritmi belirler. Periferik dokulardaki saatler, özgürce salınırlar ve neredeyse tüm hücrelerde bulunan moleküler bileşenleri esas alır (22). Periferik saat; SKÇ'den gelen sinyalleri ve ışık, beslenme, fiziksel aktivite, uyku gibi dış faktörlerden gelen uyaranlara tepki olarak metabolik olayları kontrol eder. Bu, glikoz ve lipid dengesi, hormon salınımı, bağışıklı yanıtı ve sindirim gibi iç fizyolojik süreçlerle ilgilenir. SKÇ, vücuttaki diğer sirkadiyen saatleri senkronize eder ve saatler arasındaki etkileşim, memelilerde iç homeostaz için oldukça kritiktir (15, 21).

Periferik saatlerin senkronizasyonunda yer alan çeşitli faktörler istikrarı sağlayabilir ve organizmanın, çevresel (zeitgeber) sinyallerinde kısa süreli bir kesinti sonrasında bile genel ritmi korumasına izin verebilir (22).

Periferik saatlerin fizyolojik süreçler üzerindeki etkisi oldukça önemlidir. Örneğin; karaciğer-iç saati, ilaç metabolizması için çok kritiktir. Gece yüksek ancak gündüz düşük toksisiteye sahip olan parasetamol toksisitesinin ritmi, hepatosit sirkadiyen saati tarafından belirlenir. Karaciğer spesifik BMAL1 veya CLOCK'un genetik ablasyonu olan farelerde, parasetamol karaciğer toksisitesi ritmi kaybolmştur. Pankreatik β hücre-spesifik BMAL1 eksikliği olan farelerde sirkadiyen saatin genetik ablasyonunun tip 2 diyabete yol açtığı gösterilmiştir (23). Aynı şekilde, kas hücreleriinde Klf15 geninin eksik veya aşırı eksprese edidiği farelerde, kalp kaslarının ritmik olarak düzenlendiği sirkadiyen kardiyak QT aralığı etkilenmez. Beyindeki periferal saatlerin lokal olarak yok edilmesinin, organizmanın bütünü üzerinde önemli etkileri vardır. Farelerde, histamin nöronlarının sirkadiyen saat mekanizmasının silinmesi, histamin seviyelerini değiştirir ve bu da uyku düzeninin bozulmasına neden olur (23). Ayrıca periferik saatler bağışıklık sisteminde, farklı hematopoietik hücre hattı boyunca, makrofajlar ve lenfositler dahil olmak üzere pek çok yerde mevcuttur ve çeşitli bağışıklık hücrelerindeki hücre içi saatlerin günün farklı zamanlarında işlevsel önem taşıdığı bulunmuştur (22).



Şekil 2-1: Moleküler saat, periferik saat ve senkronizasyonu.

Moleküler saatte sirkadiyen süreç, belirli genlerin transkripsiyonuyla başlar ve bu genlerin ürünleri, hücre içinde çeşitli etkileşimlerle sirkadiyen ritimleri düzenler. Önemli bileşenler arasında BMAL1, CLOCK, PER, CRY ve ROR yer alır. Bu bileşenlerin etkileşimi, gen ifadesinin dengelenmesini sağlar ve sirkadiyen ritimlerin oluşmasına katkıda bulunur. Ayrıca, post-translasyonel modifikasyonlar ve kofaktörlerin düzenlenmesi de bu süreci etkiler. Sirkadiyen ritimler, özellikle ışığa uyumlanarak düzenlenir ve senkronize edilir. Işık, retinadan alınır ve beyindeki suprakiazmatik çekirdeklere iletilir, burası organizmanın "ana saati" olarak hizmet eder. Hipotalamus-hipofiz-adrenal (HPA) ekseni bu sinyalleri periferik dokulardaki saatleri ayarlamak için kullanır. Bu süreç, hormonların döngüsel salınımı ve sinirsel iletim yoluyla gerçekleşir. (22)

2.1.4. Sirkadiyen Saatin Moleküler Mekanizması

Memelilerdeki sirkadiyen saatlerin moleküler mekanizması, hücre içinde otomatik transkripsiyonel geri bildirim döngüsüyle oluşturulur. Geri bildirim döngüsü, sirkadiyen ritimlerin üretimi ve sürdürülmesinde kritik bir rol oynar ve 24 saat boyunca devam eder. Bu ana geri bildirim döngüsü; CLOCK, BMAL1, Periyod (Per 1-2), Cyrptochrome (Cry 1-2) gibi çekirdek saat genlerinin düzenlenmesine dayanır (17, 24). Bmal1 ve Clock, Per ve Cry genlerinin aktivasyonunu düzenlerken, Per ve Cry proteinleri de BMAL1 ve CLOCK'u inhibe ederek kendi transkripsiyonlarını baskılar (17, 25, 26). Bu döngüler, pozitif ve negatif geri besleme gen ağı motifini oluşturur. Aktivatörler ve inhibitörlerin bir araya gelmesiyle oluşan bu yapı, hücrelerdeki biyolojik saati düzenler ve yaklaşık 24 saatlik bir periyotla otonom salınımı sağlar (27-29).

Yıllarca süren davranışsal araştırmaları takip eden memeli moleküler saat hikayesi, Clock adlı bir geniş keşfiyle başlamıştır. Bu gen, bir temel Helix-Loop-Helix (bHLH) bölgesi ve iki ardışık Per-Arnt-Sim (PAS) bölgesini kodlayan bir protein üretir (30).

Clock geninin keşfi ve klonlanmasından kısa bir süre sonra, ikinci bir BHLH-PAS geni olan BMAL1 de klonlanmıştır. Ayrıca, CLOCK ve BMAL1'in, genomdaki E-kutusu elementlerinden transkripsiyonu aktive eden heterodimerik bir transkripsiyon faktörü olduğu bulunmuştur. Bu transkripsiyonel aktivatör rolü, eksik bir ekzon 19'a bağlıdır, çünkü CLOCK- Δ19, BMAL1 ile hedef gen ekspresyonunu indükleyemez (31). Bu çalışmalarla birlikte, memeli biyolojik saatinin temel özelliklerinden birinin gen hedeflerinin transkripsiyonel kontrolü olduğu fikri öne sürülmüştür. (32). Bu bulguyla birlikte, daha önce meyve sineklerinde ve ekmek küfü *Neurospora crassa* üzerinde yapılan araştırmalar hız kazanmıştır. Çalışmalar, bu organizmalardaki endojen saatlerin, pozitif düzenleyicilerin kendi gen hedeflerinin ürünleri tarafından baskılandığı transkripsiyon/çeviri geri besleme döngülerinden oluştuğunu öne sürmüştür. (30).

Sirkadiyen ritmi oluşturan ana saat genleri Clock ve Bmal1 (veya Arnt1), geri bildirim döngüsünün pozitif kısmını oluşturur. Diğer yandan, Per1, Per2, Cry1 ve Cry2 genleri bu döngünün negatif kısmını temsil eder (26, 28, 29, 33, 34). Clock ve Bmal1 genleri geri bildirim devresinin pozitif kolunu oluşturan CLOCK ve BMAL1 proteinlerini kodlar. CLOCK:BMAL1 heterodimeri, belirli DNA elementlerine bağlanarak transkripsiyonu başlatır.

CLOCK ve BMAL1 proteinleri, hücrenin çekirdeğindeki belirli genlerin transkripsiyonunu uyarır. Bu aktive edilen gen seti, geri bildirim döngüsünün kolu olan Per (Per1 ve Per2) ve Cry (Cry1 ve Cry2) genlerini içerir (33, 34). CLOCK ve BMAL1, PER proteinlerini (PER1 ve PER2) ve kriptokromları (CRY1 ve CRY2) uyarır. Sirkadiyen döngünün ilk yarısında transkripsiyon artar; ancak, daha sonra baskı baskın hale gelir ve yeni sentezlenen inhibitörler, PER ve CRY gibi proteinler birikir ve transkripsiyonu engeller. (29, 35, 36). Yeni bir biyolojik günün başlaması için CLOCK-BMAL1'i baskılayan inhibisyon proteinlerinin uzaklaştırılması gerekir. PER ve CRY tarafından oluşturulan inhibisyon kompleksi post-translasyonel modifikasyonlarla ortadan kalktıktan sonra, CLOCK:BMAL1 transkripsiyonuyla bir sonraki gün yeni bir transkripsiyon döngüsü başlatılır. (17, 37, 38). BMAL1/BMAL2, CLOCK/NPAS2 (nöronal PAS alanı içeren protein 2), CRY1/CRY2, PER1/PER2/PER3, ERBα/REV-ERBβ dışında saat fonksiyonu için önemli diğer faktörler arasında, BMAL1 ve REV-ERBα'nın transkripsiyonunu aktive eden ve REV-ERBα tarafından baskılanan Retinoid ilişkili yetim reseptörler ROR'lar (RORα, RORβ, RORγ) bulunur (27, 37-39).

SKÇ, BMAL1 ifadesini aktive eden yetim nükleer reseptör RORa ve baskılayan REV-ERB α'nın karşıt işlevleri tarafından stabilize edilir (37, 38). Ror ve Rev-Erbα'nın gerçekleştirdiği bu BMAL1 aktivasyonu ise sistemdeki ikinci bir geri besleme mekanizmasıdır (27, 28, 30). Bu ikinci döngü, bir zamanlar yardımcı bir mekanizma olarak düşünülse de, son zamanlarda saat fonksiyonu için temel olduğu kanıtlanmıştır (40), (41). Son yıllarda yapısal ve biyokimyasal analizler, sirkadiyen zamanlamaya temel oluşturan protein etkileşimlerini yönlendiren bir dizi ilkenin aydınlatılmasına yardımcı olmuştur (30).

Sağlıklı bir sirkadiyen ritmin sürdürülmesi için fosforilasyon ve ubikütinasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlar son derece önemlidir. Kazein kinazlar, özellikle PER ve CRY gibi sirkadiyen proteinlerin stabilitesini ve aktivitesini düzenleyerek sirkadiyen ritmin ayarlanmasında kritik roller üstlenirler (27). Bu kinazlar, sirkadiyen proteinlerin fosforilasyonunu kontrol ederek hücresel konumlarını, işlevlerini ve stabilitesini düzenlerler. Öte yandan, ubikütin E3 ligazları, sirkadiyen proteinlerin ubikütinasyonunu düzenler ve böylece hücresel seviyelerini kontrol ederler. Özellikle, β-TrCP, FBXL3 ve ARF-BP1/PAM gibi ligazlar, hedef proteinlerin ubikütinasyonunu başlatarak proteazomal parçalanmalarını sağlarlar. Bu post-translasyonel modifikasyonlar, sirkadiyen proteinlerin parçalanmasını düzenleyerek sirkadiyen ritmin

devamlılığını ve doğruluğunu sağlarlar. Bu nedenle sirkadiyen saat mekanizmasının sağlam bir şekilde işleyişine önemli katkılarda bulunurlar (42, 43). Ayrıca SKÇ mekanizması belirli proteinlerin ve genlerin belirli zaman dilimlerinde ne zaman ve nerede ifade edileceğini düzenleyen kompleks düzenleyici ağlar içerir (27). Ek saat bileşenleri ise, temel saat mekanizmalarının dışında yer alan ve sirkadiyen ritimlerin oluşumunu veya modülasyonunu etkileyen genler ve proteinlerdir. Bu bileşenler, saat sistemlerinin çeşitli yönlerini düzenler ve çevresel sinyallerle etkileşime girerek ritmik davranışları ve fizyolojik süreçleri yönlendirirler. Örneğin, bir ek saat bileşeni, sirkadiyen saatlerin dışındaki bir sinyal tarafından indüklenerek sirkadiyen ritimlerin belirli bir yönünü modüle edebilir veya değiştirebilir (44).

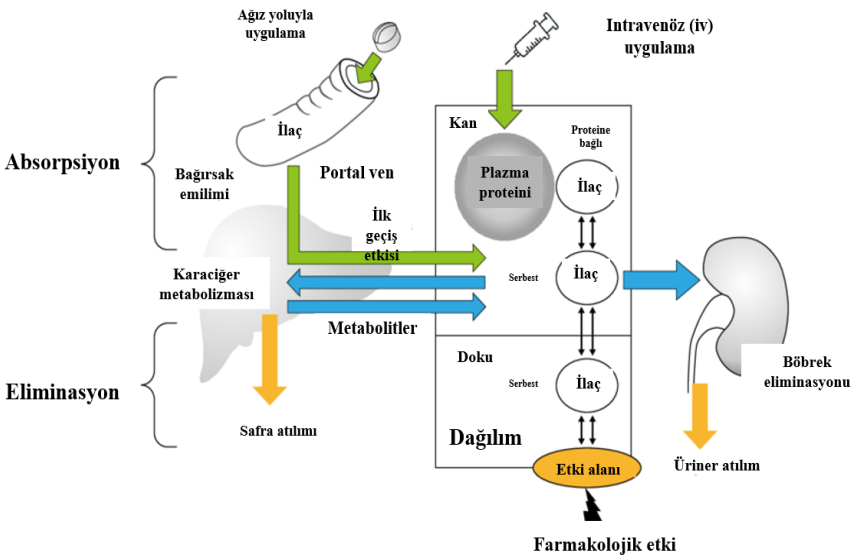
2.2. Preklinik Araştırmalarda Farmakokinetiğin Önemi

2.2.1. Farmakokinetik

Farmakokinetik, temelde ilaçların emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımının incelenmesidir; yani, vücudun ilaç üzerindeki etkileridir (45). Ancak, aynı zamanda ilaçla ilişkili toksik veya terapötik yanıtları araştırır (46). Farmakokinetiğin alanı, sadece sağlıklı bireylerle sınırlı değildir. Ayrıca, biyoyararlanımda, fizyolojik veya patolojik koşullardaki değişiklikleri, hastalıkla ilişkili doz ayarlamalarını ve ilaç etkileşimlerini de içerir. Farmakokinetik, bireylerde ilaç doz rejimlerinin özelleştirilmesini içerir (45-48).
İlaç, uygulandığı bölgeden vücudun genel dolaşımına geçiş yapmasına absorpsiyon denir. Bu geçiş süreci ve buna etki edebilecek faktörler, ilacın biyoyararlanımını direkt olarak etkiler. (49,50)

Dağılım, bir ilacın vücuttaki sistemik dolaşımdan dokulara yayılması sürecidir. İlacın terapötik etkisini gösterebilmesi için, uygulama alanına yeterli konsantrasyonda dağıtılmalıdır. Dağılım, vücutta dolaşım sistemi tarafından sağlanır ve ilaçlar tüm dokulara dağılır. Dolayısıyla, dokulara göre değişen göreceli kan akışı gereken dozu etkileyecektir (45). Bir ilacın doku konsantrasyonunu ölçmek zordur, bu nedenle doku konsantrasyonunu tahmin etmek için plazma konsantrasyonu kullanılır (51). İlaçların dağılımını etkileyen başlıca faktörler, difüzyon hızı, ilacın dokulara olan afinitesi, kan akışı (perfüzyon) ve plazma proteinlerine bağlanmadır (45, 49).

Metabolizma, vücuttaki endojen ve eksojen bileşiklerin atılmasını kolaylaştırmak amacıyla onları daha polar ürünlere dönüştüren bir biyotransformasyon sürecidir. Faz I metabolizması, fonksiyonel grupların eklenmesiyle gerçekleştirilirken, Faz II ilaç metabolizması bağlama reaksiyonlarını içerir. Faz III ise ilaçların ve/veya metabolitlerin vücuttan atılmasını içeren taşıyıcı aracılı eliminasyonu ifade eder (52). İlaç metabolizması büyük ölçüde karaciğerde gerçekleşmekle beraber böbreklerde, akciğerlerde, ciltte ve gastrointestinal sistemde de olabilir (51). Metabolizma, ilacın çeşitli hücrelerde (örneğin, karaciğerde hepatositlerde) değişmesini sağlayan enzimleri içerir. Çoğu ilaç, oral emilim için uygun olabilmeleri için fosfolipid çift katman zarlarını geçebilecek şekilde formüle edilmiştir (45). Yağda çözünür ilaçlar, eliminasyondan sonra böbrekten geri emilirler, bu nedenle yağda çözünür ilaçların etkili bir şekilde böbrekten eliminasyonu için suda çözünür yapılar haline dönüştürülmesi gerekmektedir (49). Vücuttan ilaçlar ve metabolitleri birkaç mekanizma ve birkaç formda atılabilir, hatta bazı ilaçlar birden fazla yoldan kısmi olarak atılabilir. Sıvı atılım genellikle böbrek ve safra (idrar ve safra) atılımını içerir, ancak ter, gözyaşı, tükürük ve anne sütü gibi diğer atılım yollarını da içerir (53, 54).



Şekil 2-2:Farmakokinetik (Absorpsiyon, dağılım, metabolizma, eliminasyon). (55)

2.2.2 Farmakokinetik Çalışmaların İlaç Geliştirmedeki Rolü Nedir?

Farmakokinetik, bir organizmanın aldığı bir ilaç üzerindeki etkilerini inceleyen bir bilim dalıdır. Bu çalışmalar genellikle kan, plazma, serum ve bazen tükürük gibi kolayca örneklenebilen fizyolojik sıvılarda belirli bileşiklerin ölçülmesini içerir. Ayrıca idrar ve dışkı gibi atık maddeler de incelenir. Daha nadir durumlarda, doku biyopsisi, beyin omurilik sıvısı, bronkoalveolar lavaj sıvısı veya orta kulak efüzyon sıvısı gibi daha invaziv örnekleme yöntemleri kullanılır. Hangi örnekleme yöntemi kullanılırsa kullanılsın, ölçülen konsantrasyonlar ilacın etki yerindeki konsantrasyonlarını yansıtır. İdrar ve dışkıdaki ilaç verileri dahi farmakokinetiği anlamada kullanılabilir; idrardaki ilaç atılım hızları, belirli bir toplama aralığındaki plazma konsantrasyonlarına orantılı olarak kabul edilir ve bu veriler atılım yolları hakkında bilgi sağlar. Biyolojik sıvılarda zamanla ölçülen ilaç konsantrasyonları, bu konsantrasyonların zaman içindeki değişimini analiz ederek vücuttaki çeşitli bölmelerdeki görülmeyen ilaç hakkında bilgi sağlar. Uygulamalı farmakokinetikler, akademik araştırmalar, klinik araştırmalar ve klinik tıpta (bireyselleştirilmiş dozaj ve terapötik ilaç izleme) gibi çeşitli farmakolojik değerlendirmelerde kullanılır (56).

Erken ilaç geliştirme sürecinde, başlangıçtaki klinik öncesi veya klinik çalışmalarından elde edilen farmakokinetik verisi çok önemlidir. Bu veriler, ilacın güvenliği ve etkinliği hakkında daha fazla bilgi edinmeyi sağlayarak sonraki çalışmaları bilgilendirir. Farmakokinetik, klinik ilaç geliştirmenin tüm aşamalarında hayati bir rol oynar. Genellikle sağlıklı gönüllüler üzerinde yapılan Faz 1 çalışmaları, güvenlik ve tolere edilebilirliği belirlemeye, doz aralıklarını belirlemeye ve ilaç etkileşimlerini anlamaya yardımcı olur. Faz 2 çalışmalarında, hedef hastalığı olan hastalarda güvenlik ve etkinliğe odaklanılırken, farmakokinetik verileri doz ayarlamalarını belirlemeye ve farklı hasta popülasyonlarında ilacın davranışını öngörmeye yardımcı olur. Faz 3'te, daha geniş çaplı çalışmalar, nihai doz seçimini ve hasta yanıtlarındaki değişkenliği anlamaya yardımcı olan farmakokinetik ölçümleri ile geniş kapsamlı güvenlik ve etkinlik verileri toplar (56).

İlaç geliştirme; zamanlama, cinsiyet, yaş, yaşam tarzı ve ek hastalıklar dikkate alınmaksızın potansiyel yeni bir bileşik için önerilen dozu tanımlamayı amaçlar (23). Potansiyel bir ilaç adayı belirleme süreci tekrarlayıcıdır çünkü ilaç molekülünün, hem

hedeflenen etkinlik düzeyine ve en yüksek potansiyele sahip şekilde sentezlenmesi hedeflenir hem de en yüksek güvenlik profili ve istenilen ADME (emilim, dağılım, metabolizma, atılım) özelliklerine sahip olması istenir.

Preklinik ilaç çalışmalarında ürünlerin amaçlanan klinik kullanım için karşılaştırılabilirlik ve uygunluğunu değerlendirmek için iki tür biyofarmasötik çalışma yapılır. Birincisi, göreceli biyoyararlanım (BY) çalışmasıdır, bu çalışma genellikle iki veya daha fazla formülasyonun göreceli olarak karşılaştırıldığı farmakokinetik özellikleri açısından yapılır, genellikle AUC, C_{maks}, t_{maks} ve yarılanma ömrü gibi parametreler karşılaştırılır. Bu tür BY çalışmaları, genellikle yeni bir formülasyonun bir referansla karşılaştırılan göreceli performansını değerlendirmek için kullanılır. İlaç geliştirme sürecinde kullanılan bir diğer çalışma, bir test formülasyonunun AUC'sinin i.v yola (%100 BY sahip kabul edilir) göre bir karşılaştırması olan mutlak BY çalışmasıdır (57).

Üzerinde çalışılan ilacın diğer ilaçlarla eş zamanlı uygulanması durumunda etkisini değerlendirmek, ilaçların birbirleriyle veya besinlerle etkileşimini değerlendirmek için de farmakokinetik çalışmalar yapılmaktadır. Etkileşimler, metabolik faktörler (CYP450 etkileşimleri, enzim indüksiyonu) veya aktif bir taşıyıcı için rekabet gibi nedenlerle ortaya çıkabilir (57).

Farmakokinetik çalışmalar; yaşlılar, çocuklar, gebeler, karaciğer, renal yetmezlik hastaları gibi özel hasta popülasyonlarında ilaç dozlarının ayarlanmasına yardımcı olur. Karaciğer ve böbrek yetmezliğinde, albümin gibi plazma proteinleri sağlıklı gönüllülerden daha düşük olabilir, bu nedenle serbest ilaç konsantrasyonlarının incelenmesi, bağlanma farklılıkları ile ilişkili herhangi bir farmakokinetik farkının olup olmadığını belirlemek veya artmış serbest ilaç konsantrasyonlarının herhangi bir ilaç etkisi farklılığına neden olup olmayacağını belirlemek için sıklıkla yapılır. Bu popülasyonlarda, herhangi bir farklılığı hesaba katmak için doz ve/veya dozaj düzenlemeleri yapılması gerekebilir (56).

2.3. Merkezi Saati Hedefleyen Küçük Molekül Modülatörler

Sirkadiyen ritmin küçük molekül modülatörleri, saat çekirdek döngüsü ve sirkadiyen saat çekirdek proteinleri bileşenleri üzerinde doğrudan etki edebilir veya sirkadiyen saat kontrolünde önemli ölçüde değişiklik yapabilen çekirdek olmayan saat proteinlerini hedef alırlar. Agonist, ters agonist veya antagonist olarak fizyolojik etkileri modüle ederler (58).

Tablo 1: Çekirdek saat proteinlerini hedefleyen küçük molekül modülatörleri.

Bileşik	**Moleküler Hedef**	**Sirkadiyen Etkiler**	**Fizyolojik Etkiler**
KL001	CRY 1/2 - aktivatör	Periyot uzaması Amplitüd azalması	Obez farelerde glukoz toleransını artırır.
KL044	CRY 1/2 - aktivatör	Periyot uzaması	-
GO214	CRY 1/2 - aktivatör	Periyot uzaması	-
GO044	CRY 1/2 - aktivatör	Periyot kısalması	-
GO200	CRY 1/2 - aktivatör	Periyot kısalması	-
GO211	CRY 1/2 - aktivatör	Periyot kısalması	-
KS15	CRY 1/2 - inhibitör	Periyot kısalması Amplitüd azalması	Meme kanseri hücre büyümesini engeller.
SR9009	REV-ERB – agonist	Amplitüd azalması	Obez farelerde glukoz dengesini düzeltir. Uyanıklığı teşvik eder. Anksiyeteyi azaltır.
SR9011	REV-ERB – agonist	Amplitüd azalması	
GSK2945	REV-ERB – agonist	Amplitüd azalması	Enflamatuvar yanıtı inhibe eder.
GSK5072	REV-ERB – agonist	Amplitüd azalması	
GSK2667	REV-ERB – agonist	Amplitüd azalması	
GSK4112	REV-ERB – agonist	Bilinmiyor	Primer hücrelerde glukoneogenezi ve inflamatuvar yanıtı engeller.
SR8278	REV-ERB – invers agonist	Bilinmiyor	Fare alfa hücrelerinden glukagon salgısını azaltır.
ARN5187	REV-ERB – agonist	Bilinmiyor	Kanser hücrelerine karşı sitotoksik
SR1078	ROR – agonist	Bilinmiyor	Apoptozu indükler. Hepatom hücre büyümesini inhibe eder.

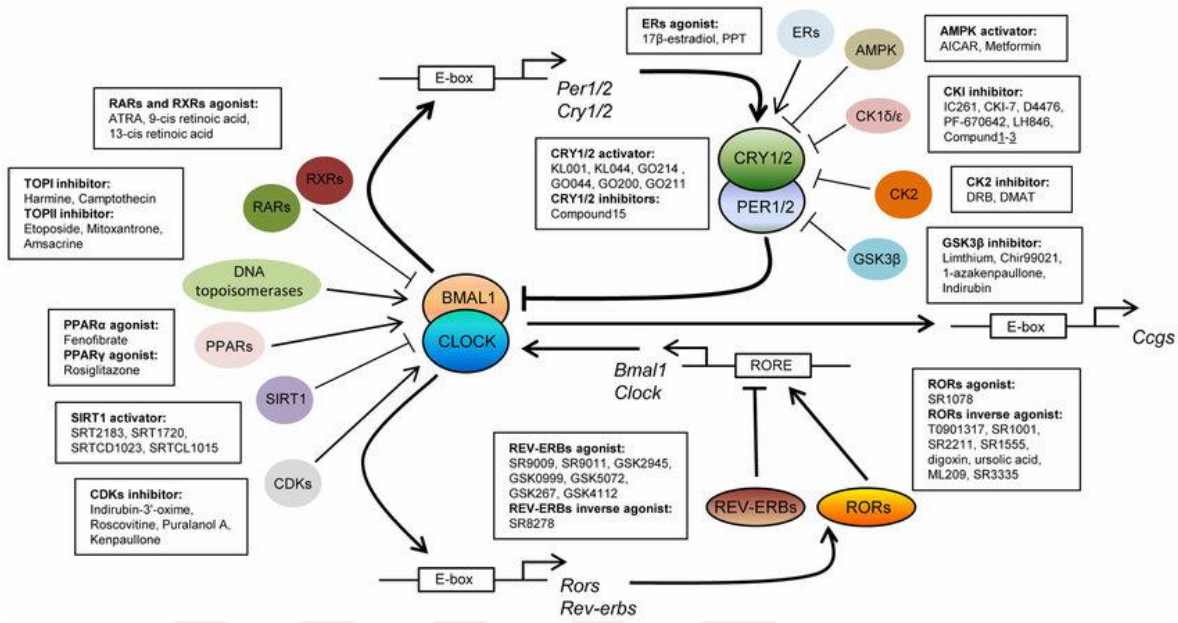
T0901317	ROR – invers agonist	Bilinmiyor	Çeşitli biyolojik aktiviteler LXR tarafından düzenlenir.
SR1001	ROR – invers agonist	Bilinmiyor	Th17 hücre farklılaşmasını ve otoimmüniteyi inhibe eder.
SR2211	ROR – invers agonist	Bilinmiyor	Th17 hücre farklılaşmasını inhibe eder.
SR1555	ROR – invers agonist	Bilinmiyor	
ML209	ROR – invers agonist	Bilinmiyor	
SR3335	ROR – invers agonist	Bilinmiyor	Obez farelerde kan şekerini azaltır.

BMAL1, beyin ve kas ARNT-benzeri 1; CRY, kriptokrom; LXR, karaciğer X reseptörü; ROR, RAR ile ilişkili yetim reseptör.

Çekirdek saat proteini bileşenleri, BMAL1, NPAS2, CLOCK, PER1/2, CRY1/2, REV-ERB'ler ve ROR'lar gibi transkripsiyonel-translasyonel geri bildirim döngülerinin bileşenlerini içerir. CRY1/2, REV-ERB'ler ve ROR'lar için sentetik veya doğal ligandlar bildirilmiştir (58-60).

Son araştırmalarda, farelerde kan-beyin bariyerini aşan ve olumlu bir farmakokinetik profili olan yeni bir seçici CRY1 destabilizatörü olan M47 keşfedilmiştir. M47 tedavisi, kansere yatkınlığı olan $p53^{-/-}$ farelerde kontrol grubuna kıyasla yaşam süresini %25 oranında artırmıştır, bu da p53 mutasyonlu kanserlerin tedavisi için potansiyel bir yöntem olarak önerilmektedir (5).

Yine yakın zamanda in vitro çalışmalarla, TW68 adlı CRY proteinlerine bağlanan küçük bir molekülün CRY1 ve CRY2'yi stabilize ettiği keşfedilmiştir. TW68'in U2OS Bmal1-dLuc hücrelerinde periyot uzunluğunu artırdığını ve HepG2 hücre hatlarına TW68 tedavisi uygulandığında, glukoneogenezde kritik roller üstlenen PCK1 (Fosfoenolpirüvat Karboksikinaz 1) ve G6PC (Glukoz-6-fosfataz) genlerinin mRNA seviyelerinin azalmasına bağlı olarak glukoz seviyelerinde bir azalmaya neden olduğu bulunmuştur. Ardından diyabetik obez farelere uygulandığında açlık kan glukoz seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (61).

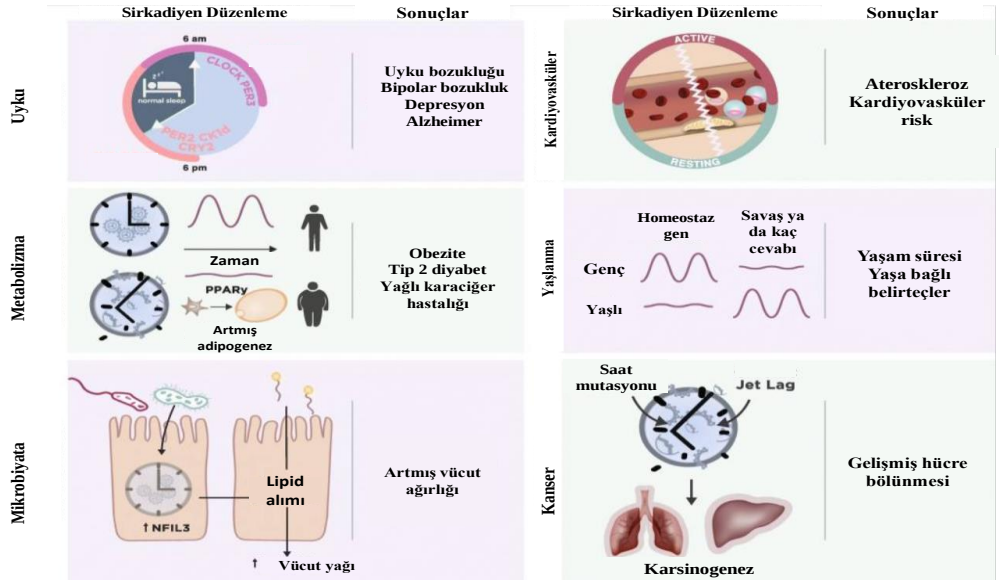


Şekil 2-3: Sirkadiyen saat döngüleri ve küçük molekül modülatörlerin olası moleküler hedefleri.

Sirkadiyen saat osilatörü, temel bir döngü (BMAL1/CLOCK ve PER/CRY) ve bir stabilizasyon döngüsü (REVERB'ler ve ROR'lar) içeren transkripsiyonel-translasyonel geri besleme döngülerinden oluşur. Temel saat bileşenlerine ek olarak, moleküler geri besleme döngülerini düzenleyen çeşitli hücresel yollar, sirkadiyen ritimlerin genliği, fazı ve periyodunda değişikliklere yol açabilecek şekilde küçük moleküller tarafından hedef alınabilir. Sirkadiyen fenotip tabanlı tarama veya hedef tabanlı mantıksal tasarım sonuçları, potansiyel ilaçlanabilir yolları genişletecek ve saatle ilişkili bozukluklar için yeni terapötik stratejilere yol açabilecektir. (59)

2.4. Sirkadiyen Saat ile İlişkili Hastalıklar ve Küçük Molekül Modülatörlerin Farmakolojik Etkileri

Sirkadiyen ritmin düzensizliği; uyku bozuklukları, metabolik ve kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve diğer patolojilere neden olur. Uygun olmayan ışık maruziyeti, gece yemek alımı ve iç ve dış döngülerin uyumsuzluğu, jet lag ve vardiyalı çalışma gibi nedenlerden dolayı, sirkadiyen saat sistemindeki bozuklukların yaygın nedenleridir (62).



Şekil 2-4: Sirkadiyen ritmin etkilediği fizyolojik sistemler.

Uyku: Sirkadiyen düzensizlikler insanların uyku zamanlamasını ve niteliğini doğrudam etkileyerek ailesel ileri uyku fazı bozuklukları (FASPD) veya gecikmiş uyku fazı bozukluğu (DSPS) gibi durumlara yol açabilir.

Metabolizma: Kortikosteroidlerin ritmik sinyalleri, adipogenezde PPARγ ile bütünleşerek metabolik süreçleri etkiler.

Kardiyovasküler sistem: Aktif dönemden dinlenme dönemine geçiş sırasında nötrofiller ve monositlerin aterosklerotik plaklara yapışması, kardiyovasküler sağlığı etkileyebilir. Saat düzensizlikleri ve vasküler sistem üzerinde etkili olabilir.

Yaşlanma: Yaşlanma sürecinde, kök hücrelerdeki sirkadiyen gen ifadesi yeniden düzenlenir ve bu, dokunun yenilenmesini etkiler. Zayıf ritimler yaşla ilişkili sağlık sorunlarını kötüleştirebilir.

Mikrobiyata: Barsak mikrobiyatası, NFIL3 seviyelerini düzenleyerek lipid alımını ve vücut yağını modüle eder. Sirkaditen düzensizlikler, mikrobiyata bileşimini ve metabolik sağlığı etkiler.

Kanser: Sirkadiyen ritmin bozulması, hücre çoğalmasını ve tümör oluşum riskini artırabilir. Optimal sirkadiyen ritimlerin korunması, kanserin önlenmesi ve tedavisinde önemlidir (63).

Örneğin yapılan çalışmalarda, 10 gün boyunca zorunlu olarak 28 saatlik bir ritimde yaşayan kişilerin glukoz toleransında bozulma ve hiperinsülinemi gözlemlenmiştir (59). Ayrıca, sirkadiyen genlerinde genetik bozulma olan *Clock*Δ*19/*Δ*19, Bmal1*$^{-/-}$ Cry1/2 mutant farelerin, obezite, hiperlipidemi, karaciğerde yağ birikimi gibi bir dizi metabolik bozukluk sergilediği bildirilmiştir (64, 65).

Beslenme ve açlık, AMPK, CREB ve AKT gibi besin homeostazı ana düzenleyicilerinin aktivitelerinde günlük ritimlere neden olur. Yapılan çalışmalarda, yalnızca gece yarısı yüksek yağlı diyet alımının, sınırsız beslenmeye kıyasla fareleri metabolik hastalıklara karşı koruduğu ve motor koordinasyonlarını iyileştirdiği gösterilmiştir (66). Bununla birlikte, REV-ERB agonisti SR9009'un, yüksek yağlı diyetle beslenen obez farelerde olumlu metabolik etkilere neden olduğu ancak aynı zamanda sirkadiyen davranışı ve gen ekspresyonunun salınımlı genliğini akut olarak baskıladığı gösterilmiştir (59). SR9011 ve SR1555'in obez farelerde sirkadiyen davranışı modüle ettiği, gıda alımını, yağ kütlesini ve vücut ağırlığını azalttığını ve obez diyabetik farelerde insülin duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir (67, 68). İlk tanımlanan saat hedefli CRY stabilizatörü KL001 molekülü, fare karaciğer hücrelerinde glukagon tarafından tetiklenen glukoneogenezi baskılamıştır. CRY1 ve CRY2 selektif stabilizatörleri KL101 ve TH301, kahverengi yağ dokusunun farklılaşmasını artırmış ve enerji harcamasını kontrol etme stratejisi olarak obeziteye karşı etkili bir yaklaşım sunmuştur (67, 68).

Araştırmalar, vardiyalı çalışma gibi sirkadiyen ritim bozuklukları ile kanser riski arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. (69). Gece vardiyasında çalışan kadınlar arasında meme kanseri insidansının daha yüksek olduğu birçok çalışma bulunmaktadır (70). Ayrıca, REV-ERBβ'nin çeşitli meme kanseri hücre hatlarında aşırı ifade edildiği bildirilmiştir. REV-ERB agonistlerinden biri olan SR9011'in meme kanseri hücresine uygulandığında, siklin A2 seviyelerinde önemli bir azalmaya ve doza bağlı olarak hücre canlılığında azalmaya neden olduğu bulunmuştur (71). SR9009 ve SR9011, tümör hücrelerinde çeşitli onkogenik sürücülere karşı seçici antikanser aktivite göstermişlerdir (72). CRY1/2 inhibitörü olan KS15, MCF-7 hücre büyümesini azaltmış ve bu meme kanserinde kemoterapinin etkinliğini artırmıştır(71). KL001'in de glioblastoma büyümesini azalttığı ve CLOCK-BMAL1 kompleksinin inhibisyonu yoluyla antitümör etkinlik gösterdiği gösterilmiştir (72). Ayrıca ARN5187, REV-ERB aracılı transkripsiyonu ve otofajiyi inhibe ederek kanser hücrelerine karşı aktivite göstermiştir (72).

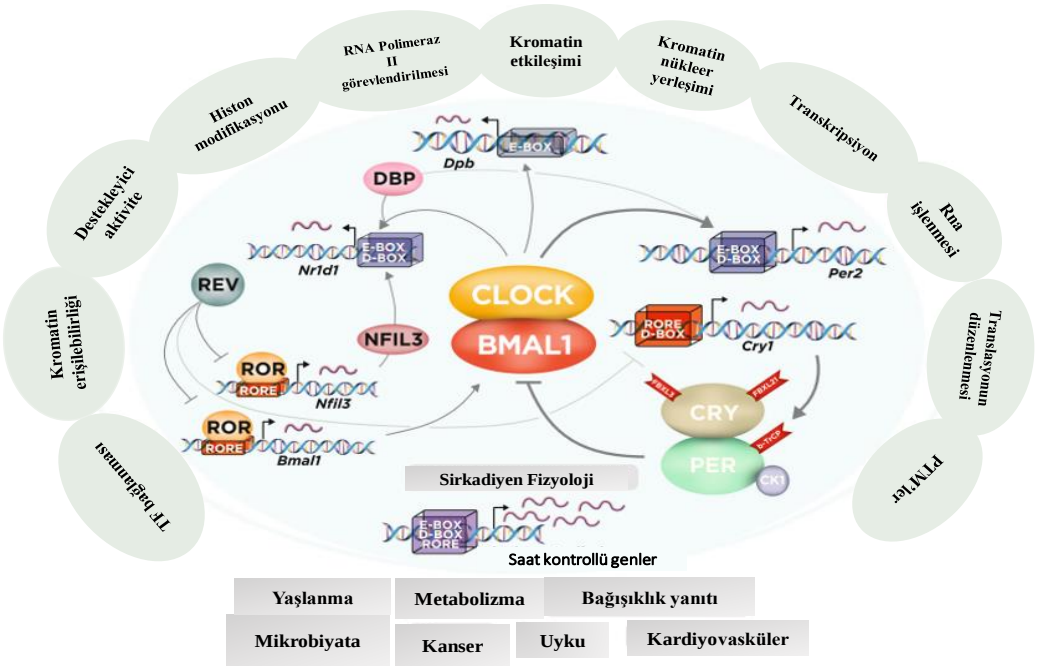
Sirkadiyen uyku bozuklukları, jetlag gibi ani uyku problemlerinin yanı sıra, genetik bir kökene sahip olan ailesel ileri uyku fazı sendromu (FASPS) veya gecikmiş uyku fazı sendromu (DSPS) gibi durumları da içerir (73). Periyot (PER2) eksikliği ailesel ileri uyku fazı sendromuna (FASPS) neden olurken CK1δ proteinindeki bir mutasyon ise

gecikmiş uyku fazı sendromu (DSPS) olarak adlandırılan uyku bozukluğuna neden olur (72). CK1δ inhibitörü PF-670462'nin farelerde sirkadiyen ritmi düzenleyici bir etki gösterdiği görülmüştür. Bu, CK1δ'nin farmakolojik olarak hedef alınmasının sirkadiyen davranış bozukluklarının tedavisinde etkili olabileceğini öne sürmektedir (59). REV-ERB agonistlerinden SR9009 ve SR9011, karaciğer, iskelet kası ve yağ dokusunda metabolik genlerin sirkadiyen ekspresyonunu değiştirerek enerji harcamasını artırdıkları için jet lag ve uyku bozuklukları ile metabolik hastalıkların tedavisinde faydalı olabilir (72).

Sirkadiyen saat doğuştan ve adaptif bağışıklık fonksiyonları etkiler. Saatin çeşitli proinflamatuar sitokinlerin (IL-6, IL-17, tümör nekroz faktörü ve CXCL1 gibi) ekspresyon zamanlamasını ve süresini düzenlediği bilinmektedir. REVERB ve ROR'ların ligandları, bağışıklık fonksiyonlarını olumlu yönde etkileyebilir. Örneğin, REV-ERB ligandı GSK4112, insan primer makrofajlarda LPS indüksiyonunu baskılamıştır ve makrofajlarda sitokin IL-6 protein sekresyonunu azaltır. RORγ ters agonistleri olan digoksin ve ursolik asit, artrit ve ensefalomyelit gibi otoimmün bozuklukları iyileştirebilir. Birçok optimize edilmiş RORα/γ ligandı, sitokinlerin ekspresyonunu azaltarak otoimmün hastalık semptomlarını hafifletebilir (60).

Yaşlanma süreci sirkadiyen ritimlerin zayıflamasına ve uyku/uyanıklık döngüsünün bozulmasına neden olur. Endojen ritimler yaşla birlikte zayıfladığı için dış ipuçlarının zamanlaması, sağlam bir ritim genliğinin korunması için önemlidir. Resveratrol ve benzeri bileşikler de SIRT1 aktivitesini artırarak yaşlanma ve yaşa bağlı hastalıkları geciktirme potansiyeline sahiptir (58, 60).

CLOCK ve BMAL1 hedeflenmesine gelince, her iki proteinin etkileşimlerini düzenleyen CLK-8 molekülü yakın zamanda keşfedilmiştir. CLK-8, CLOCK'un çekirdeğe taşınmasını engelleyerek saat genliğini artırır, ancak periyot uzunluğunu etkilemez. Sirkadiyen ritimlerin yaşlanma ve çeşitli hastalıklarda zayıfladığı gösterildiğinden, CLK-8 gibi genlik artırıcı moleküller büyük terapötik vaatler taşımaktadır (72). CLK-8 ile ilgili detaylı bilgi başlık 2.5.’te sunulmuştur.

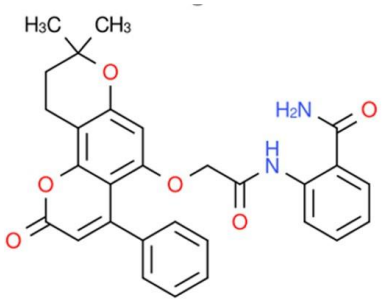


Şekil 2-5: Memelilerde sirkadiyen gen ağı ve genom çapında düzenleme katmanları.

Sirkadiyen ağın çekirdeğinde, transkripsiyon faktörleri CLOCK ve BMAL1, Per1, Per2, Cry1 ve Cry2 genlerini aktive eder. Bu genlerin protein ürünleri (PER ve CRY) kendi transkripsiyonlarını baskılar. PER ve CRY proteinleri, CRY için FBXL3 ve FBXL21 ve PER için β-TrCP olan paralel E3 ubikitin ligaz yolları tarafından post-translasyonel olarak düzenlenir ve PER seviyeleri ayrıca CK1 tarafından da kontrol edilir. CLOCK ve BMAL1, çekirdek reseptörler REV-ERBα/β'yi kodlayan Nr1d1/2 genlerinin ifadesini düzenler. Bu çekirdek reseptörleri, ritmik olarak Bmal1 ve Nfil3 genlerinin transkripsiyonunu baskılar; bu genler retinoik asit ilişkili yetim reseptör-α/β (RORα/β) tarafından aktive edilir. Sırasıyla, NFIL3, D-box bağlayıcı protein (DBP) ile birlikte, CLOCK ve BMAL1 ile birlikte REV-ERBα/β çekirdek reseptörlerinde bir ritim düzenler. Son araştırmalar, sirkadiyen gen ifadesinin ek düzenleme katmanlarını ortaya çıkarmıştır. Bu katmanlar arasında ritmik histon modifikasyonları, RNA polimeraz II (Pol II) alımı, sirkadiyen kromozomal konformasyon etkileşimleri ve post-translasyonel modifikasyonlar (PTM'ler) yer alır. (63).

2.5. CLK-8

CLK-8, CLOCK ve BMAL1 arasındaki etkileşimi bozabilen ve CLOCK'un nükleer translokasyonunu engelleyebilen güçlü ve özgül bir CLOCK inhibitörüdür. Kimyasal formülü $C_{29}H_{26}N_2O_6$ olup molekül ağırlığı 498.53 g/mol'dür (74).



Şekil 2-6: CLK-8 molekülünün kimyasal yapısı.

CLK-8 bileşiği, Doruk ve ekibi tarafından tanımlanmıştır. CLK-8, bHLH alanının a2 sarmalı ile PAS-A alanının Hb zinciri arasındaki bir boşluğa bağlanır. Doruk ve ark., 2 milyon küçük molekülün sanal taramasını birleştirerek ve çeşitli biyokimyasal analizler yaparak, CLK-8 adlı bu saat ligandının CLOCK:BMAL1 dimerizasyonunu kısmen engellediğini ve dolayısıyla CLOCK'un çekirdeğe translokasyonunu hem canlı organizmada hem de laboratuvar ortamında azalttığını göstermiştir (58). İn vitro araştırmalar, CLK-8'in sirkadiyen ritmin genliğini artırdığını ve bunu muhtemelen CLOCK proteininin nükleer seviyelerini azaltarak gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur. Bu, sirkadiyen saatin negatif geri bildirim döngüsünün stabilitesine katkı sağlamaktadır ve periyot uzunluğuna müdahale etmeden gerçekleşmektedir (3).

CLK-8'in in vivo etkilerini değerlendirmek için farelere intraperitoneal (i.p.) olarak 25 mg/kg dozunda uygulanmıştır. Enjeksiyondan 6 saat sonra, hayvanlar feda edilerek karaciğerleri aşağı akış analizlerinde kullanılmıştır. CLK-8'in çekirdek saat bileşenlerinin hücre-altı lokalizasyonunu değiştirip değiştirmediğini araştırmak adına; fare karaciğer örneklerini sitoplazma ve çekirdek fraksiyonlarına ayırıp α-tübülin ve histon H3 gibi, sırasıyla sitoplazmada ve çekirdekte özellikle lokalize olan proteinler, fraksiyonun saflığını değerlendirmek için kullanılmıştır. Sonuçlar, CLOCK proteininin çekirdekteki miktarının azaldığını, BMAL1'in TTFL'nin pozitif kolu ve TTFL'nin negatif kolunun göstergesi olan CRY1'in miktarının değişmediğini göstermiştir. Çalışmalar, CLK-8'in özellikle CLOCK proteinine bağlandığını ve CLOCK'u BMAL1 ile birlikte artırmanın, CLOCK'un çekirdekteki bolluğunun ve CLOCK'un transaktivasyon aktivitesinin tümünün azaldığı bir şekilde CLOCK proteinlerini etkilediğini göstermiştir. CLK-8, hem CLOCK'un sirkadiyen saati düzenlemedeki rolünün açıklanmasına yardımcı olabilir (3).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar, Cihazlar, Programlar

Tablo 2: Kullanılan Kimyasallar

CLK-8	Enamine, Ukrayna
Asetonitril	Merck, Almanya
Metanol (HPLC grade)	Merck, Almanya
DMSO (Dimetil Sülfoksit)	Merck, Almanya
Distile su (HPLC grade)	Human Power I Scholor UV, JJS, ABD
Sevofluran	Sevorane Likit %100, Abbvie, ABD
Kremofor EL	Merck, Almanya
Dihidrokapseisin	Sigma, ABD

Tablo 3: Cihazlar ve Sarf Malzemeler

LC/HRMS	Thermo Scientific- Qexactive, ABD
Hassas terazi	SHİMADZU AUW220D, Japonya
Vortex	DLAB MX-S, Çin
Mini santrifüj	MİNİ4K-10K, Çin
Hassas terazi	OHAUS, ABD
-80°C dondurucu	Esco UUS 480A 1 5D SS, ABD
Ultrasonik homojenizatör	Bandelin SONEREX, Almanya
Buzdolabı	Selecta, İspanya
Saf su cihazı	Sartorius, Almanya
Otomatik pipetler	CAPP Solo Pipetler, Almanya
Liyofilizatör	Labogene Scanvac CoolSafe, Danimarka
EDTA'lı kan tüpleri	BD Microtainer, Türkiye
Kapaklı polipropilen mikrotüpler ve santrifüj tüpleri, pipet uçları, insülin enjektörleri	ISOLAB, Türkiye
Cerrahi aletler	Bahadır A.Ş., Samsun-Türkiye

Tablo 4: Programlar

Graphpad Prism 9.00	GraphPad Software, ABD
MS Excel	MS, ABD

3.2. Hayvanlar ve Barındırılma Şekli

Deneylerde, 8-12 haftalık C57BL/6J soyu 40 erkek fare kullanılmıştır (25-30 g). Fareler, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (Aziz Sancar DETAE) Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Fareler, deney süresince İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanı Bakım ve Barındırma Ünitesinde (EDEHAB) barındırılmıştır. Çalışma öncesi İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul'undan (İÜHADYEK) onay alınmıştır (19.8.2022 & 2022-26). Beş fare bir arada olmak üzere uygun büyüklükteki polikarbonat kafeslerde barındırılmıştır. Deney ve bakım odalarında, standart sıcaklık (22±2°C) ve nem koşulları (%40-70) sağlanmıştır. Farelere yiyecek ve su *ad libitum* olarak sağlanmıştır. Aydınlatma düzeni, 12 saat aydınlık- 12 saat karanlık olacak biçimdedir.

Çalışmada fare gruplarına farklı zamanlarda ilaç uygulaması yapılmıştır. ZT ifadesi Zeitgeber Time'ın kısaltmasıdır ve zaman/ritim verici anlamındadır. Işık en önemli ritim vericidir ve farelerin ışıkla senkronizasyonları gerçekleştirilmektedir. ZT1 ifadesi ışık açıldıktan 1 saat sonrayı ifade eder. Deneyler ZT0-1 zaman periyodunda gerçekleşmiştir.

3.3. İlaç Uygulama ve Numune Toplama

Farelere uygulanacak olan CLK-8 molekülü; 5 ml/kg olacak şekilde intraperitoneal (i.p.) uygulanmıştır. Farelere uygulanacak olan CLK 8 molekülü; DMSO (dimetil sülfoksit), Kremofor EL ve serum fizyolojik kullanılarak formüle edilmiştir. CLK-8 (10 mg) molekülü, 25 µl DMSO, 150 µl Kremofor EL ile çözülmüş 825 µl serum fizyolojik ile 1 ml'ye tamamlanmıştır. CLK-8 maddesinin artan miktarları için yardımcı maddelerin hacimleri aynı oranda artırılmıştır.

Fareler kafeslerinde sakrifiye edilecekleri zaman aralıklarına göre gruplandırılmıştır (8 zaman periyodu için n=4 veya 5 olacak şekilde.) CLK-8 molekülü uygun basit formülasyonu yapılarak C57Bl/6J soyu erkek farelere i.p. yoldan tek seferde uygulanmıştır. CLK-8 uygulaması sonrası, 30. dakika ile 1., 2., 4., 6., 10., 24. ve 48. saatlerde sevofluran anestezisi altında farelerin göğüs kafesleri açılmış ve kalpten 0,8-1 ml kan alınarak fareler sakrifiye edilmiştir. Kan numuneleri her zaman noktasında fareler feda edilerek EDTA'lı tüplerde toplanmıştır. 4000 rpm 10 dk santrifüj edildikten sonra elde edilen plazmalar farmakokinetik analizler yapılıncaya kadar -80 °C derin dondurucuda saklanmıştır. Farelerden karaciğer ve beyin dokuları da izole edilmiştir. Dokular tartılarak hızlıca sıvı azotla dondurulmuştur. Farmakokinetik analizler yapılana kadar tüm dokular -80 °C derin dondurucuda saklanmıştır.

3.4. CLK-8 Plazma ve Dokulardan Miktar Tayini

3.4.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Standart çözeltileri hazırlamak amacıyla öncelikle 1 mg/ml konsantrasyonunda ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. 1,45 g CLK-8 tartılmıştır. 145 µl DMSO ve 1305 µl metanol yardımı ile çözülmüştür. 20, 10, 5, 2 ve 1µg/ml olmak üzere diğer seyreltmeler hazırlanmıştır. 1 ve 2 µg/ml konsantrasyonu 20 µg/ml kullanılarak hazırlanmıştır ve ana stoklar -20°C'de saklanmıştır. İnternal standart olarak dihidrokapseisin kullanılmıştır.

3.4.2. Plazma ve Doku Standartlarının Hazırlanması

İlaç uygulanmamış hayvanlardan elde edilen beyin ve karaciğer dokuları iki gün boyunca liyofilizatörde tutularak suyu uçurulmuştur. Plazma ve doku standartları hazırlanırken 1, 2, 5 ve 10, 20 µg/ml son konsantrasyonları elde etmek amacıyla, her bir standart için 90 µl boş fare plazmasına 10 µL sırasıyla 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml konsantrasyonlarında CLK-8 çözeltileri ilave edilmiştir. 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml konsantrasyonlarında doku standartlarını elde etmek için yaklaşık 10-15 gram karaciğer ve beyin dokusu tartılmıştır. Örneğin 20 µg/ml son konsantrasyonu elde etmek için 200 µg/mL metanol stok çözeltisinden 10 µL eklenmiştir. 30 sn vorteks edilmiştir. Ardından 200 µL ACN: MeOH (1:1, v/v) eklenmiştir. 15 µL İ.S (dihidrokapseisin) ve 185 µL MeOH eklenerek 1 dk daha vorteks yapılmıştır. Ardından 6000 rpm 5 dk santrifüj edilmiştir. Supernatant temiz bir tüpe alınmıştır. 6000 rpm 5 dk bir kez daha santrifüj edildikten sonra süpernatant HPLC vialine aktarılmıştır.

3.4.3. Örnek hazırlama

Karaciğer ve beyin dokuları 2 gün boyunca liyofilizatörde tutularak suyu uçurulmuştur. Toz haline gelen dokular yaklaşık 50 mg olacak şekilde tartılmıştır. Örnekler standartlara uygulanan yukarıdaki aynı yöntem ile ekstrakte edilmişlerdir. Kısaca 100 µL plazma veya 50 mg dokuya 200 µL ACN: MeOH (1:1, v/v) eklenmiştir ve girdap karıştırıcıda karıştırılmıştır. İ.S (dihidrokapseisin) 15 µL ve 185 µL MeOH eklenerek 1 dk daha karıştırılmıştır. İki kere 6000 rpm 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant HPLC vialine aktarılmıştır.

3.5. LC-MS/MS Analizi

Plazma, karaciğer ve beyin örneklerinde CLK-8 düzeylerinin tayininde Gülçin ve ark. (2010)'daki yüksek performanslı sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi (LC–MS/MS) metodu değiştirilerek kullanılmıştır (75). CLK-8 tayininde kullanılan metoda ait kromatografik koşullar Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 5: HPLC Koşulları:

Analitik kolon	Troyasil C18 HS, 150 x 3 mm, 5 µm			
Mobil faz	Mobil faz A: %1 Formik asit içeren HPLC grade su Mobil faz B: %1 Formik asit içeren metanol			
Gradient akış düzeni	Zaman (dk)	Akış hızı (ml/dk)	%A	%B
	0	0,35	50	50
	1	0,35	50	50
	3	0,35	0	100
	6	0,35	0	100
	7	0,35	50	50
	15	0,35	50	50

MS Koşulları (Kütle Spektrometresi)

Sistem	Thermo Orbitrap Q-Exactive
İyon kaynağı	Elektro Sprey İyonizasyon (ESİ)
Kütle tarama aralığı	100-1200 m/z
Sheath gazı akış hızı	45
Auxiliary (Aux) gazı akış hızı	10
Sprey voltajı	3,80 kV

Kapiler sıcaklık	320 °C
Aux gaz ısıtıcı sıcaklığı	320 °C
S-lens radyofrekans (RF) seviyesi	50,0
Tanımlamalar	İLMER Kütüphanesi

3.6. Metot Validasyonu

CLK-8 tayin metodunun validayonu için doğrusallık, doğruluk, özgüllük, değerleri hesaplanmıştır. Doğrusallık 1, 2, 5, 10, 20 µg/ml konsantrasyonlarında plazma, karaciğer ve beyin standartları hazırlanarak test edilmiştir. R^2 değeri hesaplanmış ve regresyon denklemi elde edilmiştir. Geri kazanım, farklı zamanda çalışılan üç farklı konsantrasyonun standart eğriden % kaç oranında doğru saptandığının hesaplanması ile bulunmuştur. Geri kazanım için 20, 10 ve 5 µg/ml konsantrasyonlarında örnekleri ile çalışılmıştır.

3.7. Farmakokinetik Analizler

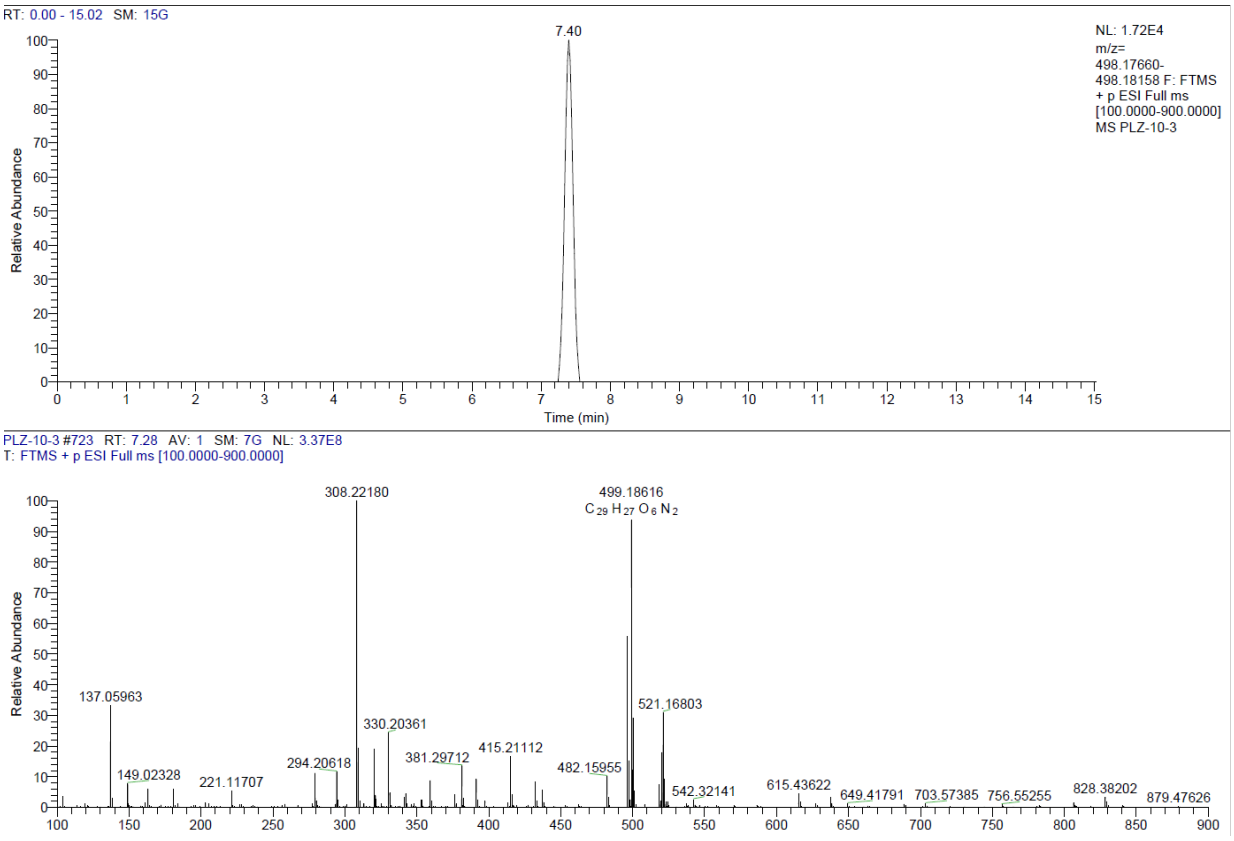
Plazma, karaciğer ve beyin örneklerinden elde edilen standart kromatogramlardaki pik alanlarını kullanarak, kalibrasyon eğrilerinden standartlara ait y=ax+b denklemleri türetilmiştir. Plazma, karaciğer ve beyin örneklerinden hesaplanan konsantrasyonlar, pik alanlarının plazma, karaciğer veya beyin y=ax+b denklemine yerleştirilmesiyle elde edilmiştir. CLK-8'in 0-48 saatlik plazma ve dokulara ait konsantrasyon-zaman eğrisi, Microsoft Excel ve Graphpad Prism versiyon 9.00 (ABD) programları kullanılarak çizilmiştir.

Farmakokinetik parametreler kompartmantal olmayan yöntem ile hesaplanmıştır. Pik plazma konsantrasyonu (C_{maks}) ve pik plazma konsantrasyonuna ulaşma süresi (t_{maks}) konsantrasyon-zaman eğrisindeki verilerin görsel olarak incelenmesiyle elde edilmiştir. Konsantrasyon-zaman grafiklerindeki son 2-7 konsantrasyon değeri alınarak üssel bir grafik çizilmiş ve bu grafikten eliminasyon hız sabiti (k_{el}) değeri belirlenmiştir. Terminal yarılanma ömrü ($t_{1/2}$, $0{,}693/k_{el}$ denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Konsantrasyon-zaman eğrilerine dayanarak, $AUC_{0\text{-}48sa}$ değerleri yamuklar yöntemiyle (doğrusal trapezoidal kural) hesaplanmıştır. $AUC_{48sa\text{-}\infty}$ değeri C_{48sa}/k_{el} formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Klirens (CL/F) değeri için $Doz/AUC_{0\text{-}\infty}$ denklemi, Vd/F değeri için ise $(Cl/F)/k_{el}$ denklemi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Metod Validasyonu ile İlgili Bulgular:

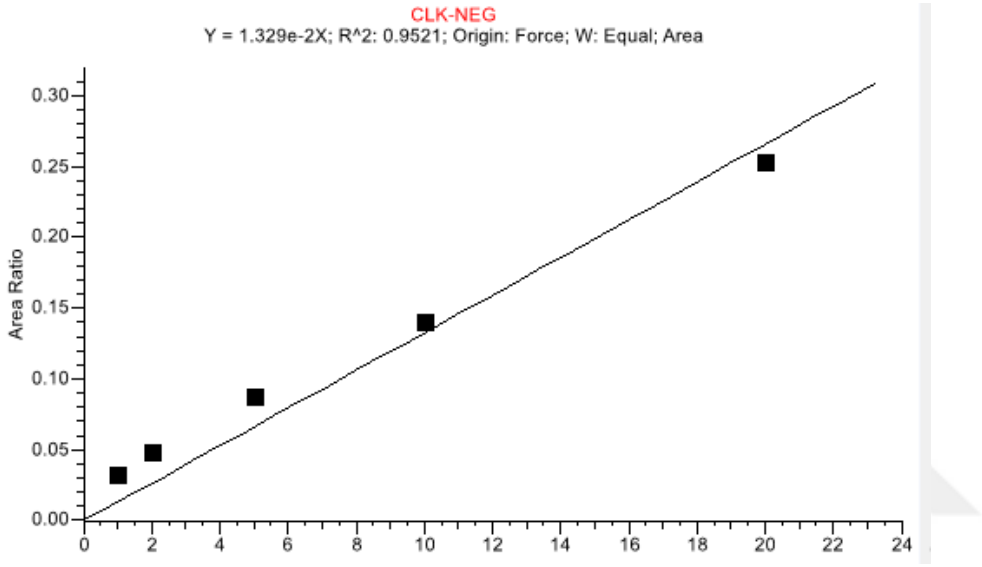
CLK-8 plazma standardına ait kromatogram Şekil 4.1'de sunulmuştur.



Şekil 4-1: CLK-8 plazma standardına ait kromatogram (10 µg/ml)

4.1.1. Plazma Verilerine İlişkin Bulgular

Plazmaya ait CLK-8 standart eğrisi Şekil 4.2'de verilmiştir. CLK-8'in plazmadan kantifikasyonu için kullanılan metodun validasyon sonuçları Tablo 6'da sunulmuştur.CLK-8 plazmada 1-20 µg/ml konsantrasyon aralığında doğrusal bulunmuştur. 20 µg/ml, 10 µg/ml ve 5 µg/ml konsantrasyonlar için geri kazanım değerleri %100'e yakın bulunmuştur.



Şekil 4-2: CLK-8 plazma standart eğrisi

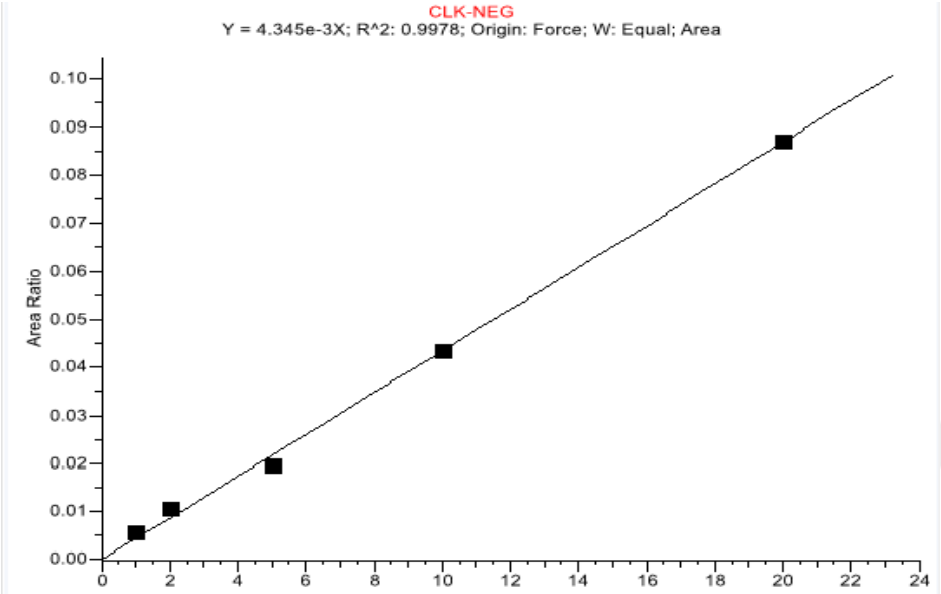
Tablo 6: Plazmadan CLK-8 tayini için geliştirilen LC-MS/MS metodunun validasyon verileri.

Parametreler	**Kromatografik Koşullar**
Doğrusallık aralığı (µg/ml)	1 – 20
R^2 değeri	0,9521
Regresyon denklemi	y = 1.329e-2x
Geri kazanım (20, 10 ve 5 µg/ml)	%95,34; %105,98; %131,56
Alıkonma zamanı	7,40

IS: iç (internal) standart

4.1.2. Karaciğer Dokusu Verilerine İlişkin Bulgular

Karaciğere ait CLK-8 standart eğrisi Şekil 4.3'te sunulmuştur. CLK-8'in fare karaciğerinden kantifikasyonu için kullanılan metodun validasyon sonuçları Tablo 7'de sunulmuştur. CLK-8 karaciğer homojenatında 1-20 µg/ml konsantrasyon aralığında doğrusal bulunmuştur. 20 µg/ml, 10 µg/ml ve 5 µg/ml konsantrasyonlar için geri kazanım değerleri %100'e yakın bulunmuştur.



Şekil 4-3: CLK-8 karaciğer standart eğrisi

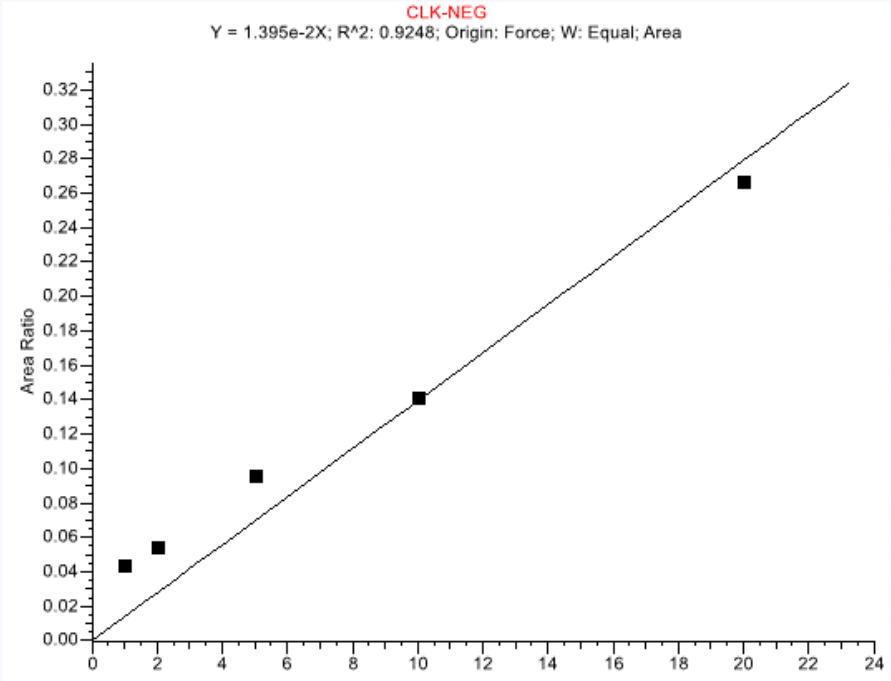
Tablo 7: Karaciğer CLK8 tayini için geliştirilen LC-MS/MS metodunun validasyon verileri.

Parametreler	**Kromatografik Koşullar**
Doğrusallık aralığı (µg/ml)	1 – 20
R^2 değeri	0,9978
Regresyon denklemi	y = 4.345e-3x
Geri kazanım (20, 10 ve 5 µg/ml)	%100,26; %100,19; %90,36
Alıkonma zamanı	7,40

IS: iç (internal) standart

4.1.3. Beyin Dokusu Verilerine İlişkin Bulgular

Beyine ait CLK-8 standart eğrisi Şekil 4.4'te sunulmuştur. CLK-8'in fare beyninden kantifikasyonu için kullanılan metodun validasyon sonuçları Tablo 8'de sunulmuştur.CLK-8 beyin homojenatında 1-20 µg/ml konsantrasyon aralığında doğrusal bulunmuştur. 20 µg/ml, 10 µg/ml ve 5 µg/ml konsantrasyonlar için geri kazanım değerleri %100'e yakın bulunmuştur.



Şekil 4-4: CLK-8 beyin standart eğrisi

Tablo 8: Beyin CLK-8 tayini için geliştirilen LC-MS/MS metodunun validasyon verileri.

Parametreler	**Kromatografik Koşullar**
Doğrusallık aralığı (µg/ml)	1 – 20
R^2 değeri	0,9978
Regresyon denklemi	y = 4.345e-3x
Geri kazanım (20, 10 ve 5 µg/ml)	%95,75; %101,6; %137,64
Alıkonma zamanı	7,40

IS: iç (internal) standart

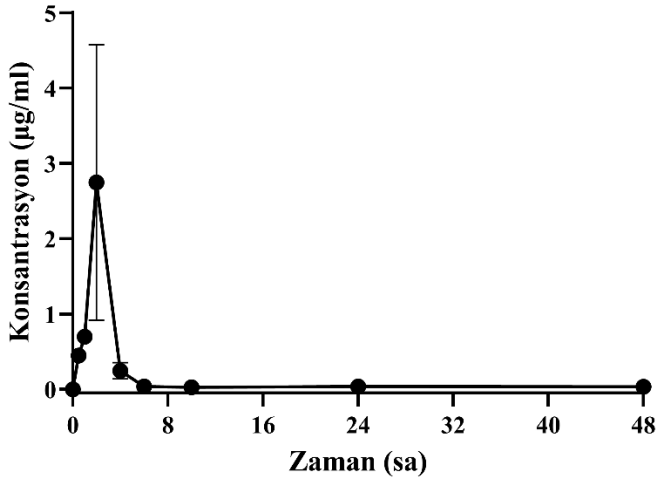
ZT0-1 zaman periyodunda, C57Bl/6J soyu erkek farelere intraperitoneal (i.p) yoldan uygulanan CLK-8 uygulaması sonrasında CLK-8'in farmakokinetiğinin değerlendirilmesi sonucunda; plazma, karaciğer ve beyin verileri Tablo 9'da detaylı olarak verilmiştir.

Tablo 9: Farelerde CLK-8'in plazma, karaciğer, beyin farmakokinetik verileri.

	PLAZMA	**KARACİĞER**	**BEYİN**
t_{maks} (sa)	1,4	15,2	0,5
C_{maks} (µg/mL) ± SEM **C_{maks} (µg/100 mg)**	2,82 ± 1,80	1030,35 ± 318,71	21,53 ± 8,22
AUC_{0-48sa} (µg.sa/mL) ± SEM **AUC_{0-48sa} (µg.sa/100 mg)**	6,87 ± 3,45	26466,14 ± 10525,08	199,82 ± 95,58
AUC_{total} (µg.sa/mL) ± SEM **AUC_{total} (µg.sa/100 mg)**	7,62 ± 3,70	35896,51 ± 17272,00	246,05 ± 128,08
$t_{1/2}$ (sa) ± SEM	11,53 ± 2,57	11,07 ± 4,52	12,17 ± 2,91
k_{el} (sa^{-1}) ± SEM	0,11 ± 0,06	0,18 ± 0,10	0,09 ± 0,03
Cl/F (L/sa) ± SEM	0,43 ± 0,18	0,04 ± 0,08	0,04 ± 0,03
Vd/F (L) ± SEM	4,71 ± 1,32	1,11 ± 0,45	0,26 ± 0,13

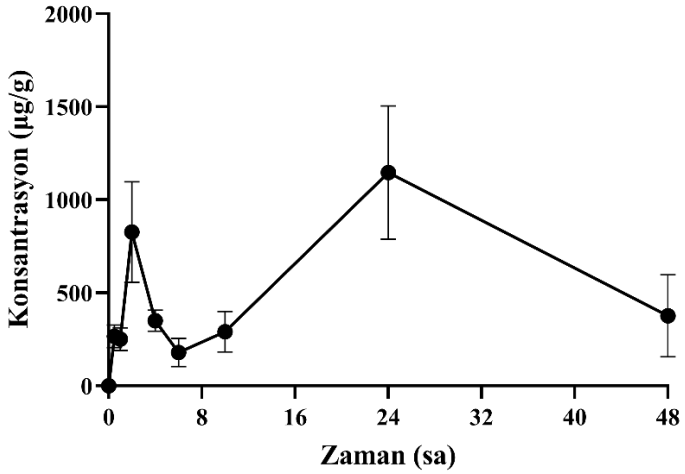
$t_{1/2}$: Plazma yarılanma ömrü. tmaks: Maksimum plazma konsantrasyonunun izlendiği zaman. AUC_{0-48sa}: 48. saate kadar eğri altında kalan alan. AUC_{total}: Toplam eğri altında kalan alan. kel: Eliminasyon hız sabiti. Cmaks: Maksimum plazma konsantrasyonu. Cl/F: Klirens. Vd/F: Dağılım hacmi. SEM: Standart hata.

CLK-8 ‘in fare plazmasında konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 4-5’te sunulmuştur. C_{maks} değeri fareler arasında varyasyon göstermiş olup 2,825 ± 1,804 µg/mL bulunmuştur.



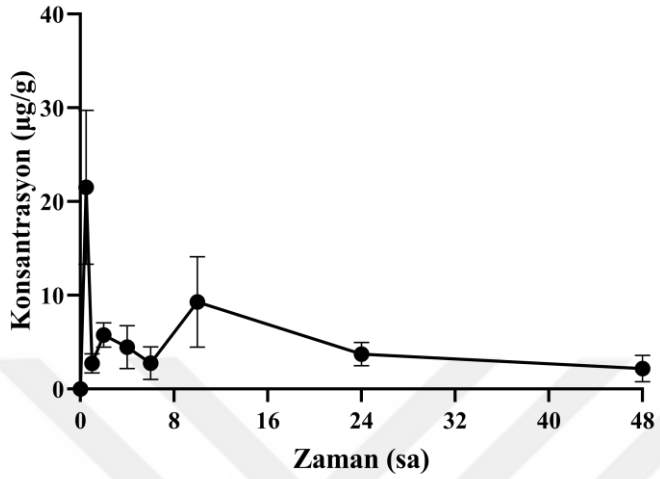
Şekil 4-5: C57BL/6J soyu erkek farelere intraperitoneal 50 mg/kg CLK-8 uygulanmasını takiben elde edilen CLK-8’e ait plazma konsantrasyon-zaman grafiği.

CLK-8’in fare karaciğerinde konsantrasyon-zaman grafiği şekil 4-6’da verilmiştir. Şekil 4.6’da da görüleceği gibi t_{maks} değeri 2. ve 24. saatte olmak üzere iki yerde pik yapmıştır. Fareler arası t_{maks} değerinde varyasyon yüksek bulunmuş, ortalama olarak 15,2 saat olarak hesaplanmıştır (Tablo 9).



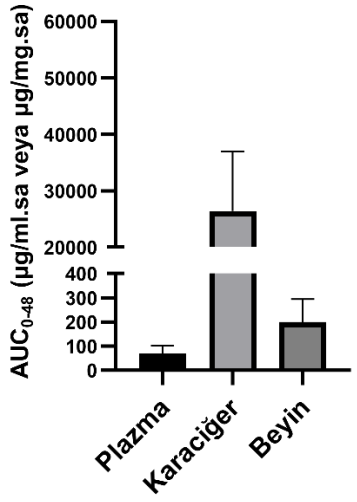
Şekil 4-6: C57BL/6J soyu erkek farelere intraperitoneal 50 mg/kg CLK-8 uygulanmasını takiben elde edilen CLK-8’e ait karaciğer konsantrasyon-zaman grafiği.

CLK-8 ‘in fare beyninde konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 4-7’de verilmiştir. t_{maks} değeri 0.5 olmasına rağmen 2. ve 10. saatlerde de beyindeki ölçülen konsantrasyonun pik yaptığı görülmüştür.

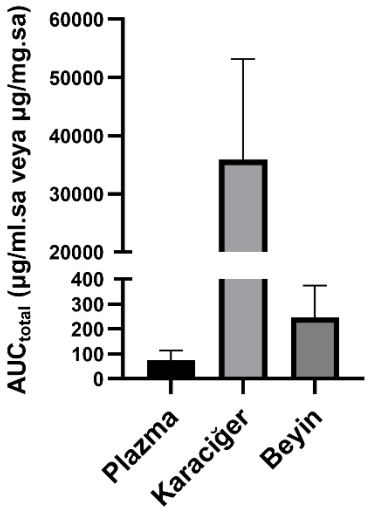


Şekil 4-7: C57BL/6J soyu erkek farelere intraperitoneal 50 mg/kg CLK-8 uygulanmasını takiben elde edilen CLK-8’e ait beyin konsantrasyon-zaman grafiği.

CLK-8’in plazma, karaciğer, beyin $AUC_{0\text{-}48sa}$ değerleri Şekil 4-8’de verilmiştir. Karaciğer AUC’sinin plazma ve beyne göre çok yüksek olduğu görülmektedir, bu durum karaciğerde biyodağılımın yüksek olduğunu göstermektedir. CLK-8’in plazma, karaciğer, beyin AUC_{total} değerleri Şekil 4-9’da verilmiştir.

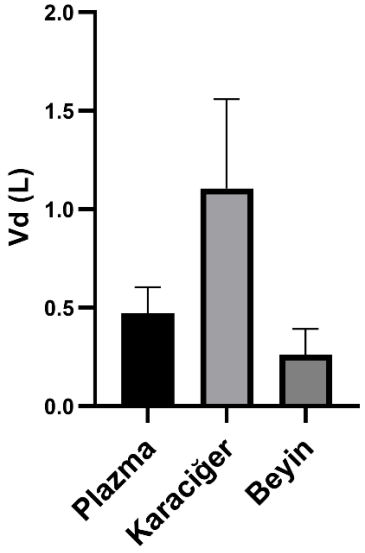


Şekil 4-8: C57BL/6J soyu erkek farelere intraperitoneal 50 mg/kg CLK-8 uygulanmasını takiben elde edilen CLK-8’e ait plazma, karaciğer, beyin $AUC_{0\text{-}48sa}$ değerleri.



Şekil 4-9: C57BL/6J soyu erkek farelere intraperitoneal 50 mg/kg CLK-8 uygulanmasını takiben elde edilen CLK-8'e ait plazma, karaciğer, beyin AUC_{total} değerleri.

CLK-8'in plazma, karaciğer, beyin Vd değerleri Şekil 4-10'da verilmiştir.



Şekil 4-10: C57BL/6J soyu erkek farelere intraperitoneal 50 mg/kg CLK-8 uygulanmasını takiben elde edilen CLK-8'e ait plazma, karaciğer, beyin Vd değerleri.

5. TARTIŞMA

Sirkadiyen ritim, canlılarda 24 saatlik biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal ritimleri düzenler ve merkezi zamanlayıcı olan suprakiazmatik nükleus (SCN) ile çeşitli periferal dokular tarafından kontrol edilir (7). Sirkadiyen ritimlerin bozulması, sağlık üzerinde geniş çaplı etkilere sahiptir ve insülin direnci, obezite, metabolik hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, kanser, uyku bozuklukları gibi pek çok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (7,58). Sirkadiyen saat fonksiyonu yaşlanma ile birlikte azalma gösterir ve sirkadiyen saat bozulmasının yaşlanma ile ilişkili hastalıklara (nörodejenerasyon, osteoporoz ve sarkopeni gibi) sebep olabildiği düşünülmektedir (58).

Son zamanlarda, genel sağlığı korumak için sağlam bir sirkadiyen saate sahip olmanın önemi anlaşılmıştır. Bu doğrultuda, sirkadiyen saatin küçük molekül modülatörlerinin tanımlanması ve bu modülatörlerin metabolik, nöropsikiyatrik, enflamatuvar ve kanser gibi saatle ilişkili hastalıklardaki terapötik potansiyellerine olan ilgi artmaktadır. Küçük moleküller, sirkadiyen saat bileşenlerini inhibe ederek veya aktifleştirerek ve bu müdahalelerin fizyolojik sonuçlarını inceleyerek, saat mekanizmasının moleküler düzeyde daha iyi anlaşılmasına olanak tanır. Sirkadiyen ritmin küçük molekül modülatörleri, doğrudan saat bileşenleriyle veya önemli düzenleyici mekanizmalarla etkileşime girerek sirkadiyen saati değiştirebilir ve kontrol edebilir (76, 77)

Sirkadiyen ritmi etkileyen küçük molekül modülatörlerinin fizyolojik etkilerinin anlaşılması kadar farmakokinetik parametrelerinin belirlenmesi de kritik öneme sahiptir. Uzun süreli etkilerin ve tedaviye uygunluk açısından doz ayarlamalarının doğru yapılabilmesi için farmakokinetik özelliklerin iyi anlaşılması gereklidir. İn vitro olarak birçok saat hedefli molekül geliştirilmiştir ancak zayıf farmakokinetik özellikler (yetersiz emilim, santral sinir sistemine geçişin olmaması ve çok kısa yarılanma ömrü) nedeniyle klink çalışmalara geçilememiştir (72). Bu nedenle yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda etkinliği kanıtlanmış küçük molekül modülatörlerin farmakokinetik parametrelerinin ortaya konulması oldukça önemlidir.

CLK-8, sirkadiyen saat mekanizmasının ana bileşenlerinden biri olan CLOCK ve BMAL1 transkripsiyon faktörlerinin aktivitelerini düzenler. CLOCK/BMAL1 kompleksinin hedef genlere bağlanma ve bu genlerin transkripsiyonunu artırma veya

azaltma kapasitesini etkileyebilir. CLK-8 sirkadiyen saat mekanizmalarını hedef alarak, uyku bozuklukları, depresyon, jet lag ve diğer sirkadiyen ritim ile ilişkili bozuklukların tedavisinde potansiyel bir farmakolojik ajan olarak kullanılabilir.

CLK-8, yeni keşfedilmiş bir molekül olup potansiyel bir ilaç adayıdır. Çalışmamız, CLK-8'in faredeki farmakokinetiğine dair yapılan ilk araştırmadır.. Çalışmamızda CLK8'in önceki çalışmalarında belirlendiği üzere 50 mg/kg i.p. doz farelere uygulanmıştır. İntraperitoneal uygulama yöntemi, laboratuvar hayvanlarında ilaçların sistemik dolaşıma hızlı bir şekilde geçmesini sağlar. Ayrıca, tekrarlanabilir ve kontrollü dozaj sağlama imkanı sunar.

CLK-8'in fare plazmasında yarılanma ömrünün yaklaşık 12 saat olduğu belirlenmiştir. (11,53 ± 2,57 saat). CLK-8'in 12 saatlik yarılanma ömrü, fare türü için oldukça uzun kabul edilebilir. Bu uzun yarılanma ömrü, ilacın vücutta daha uzun süre aktif kalabileceğini ve dozaj sıklığının azaltılabileceğini göstermektedir. Karaciğer ve beyindeki CLK-8 yarılanma ömrü de benzer çıkmıştır. (Sırasıyla 11,07 ve 12,17 saat). İlacın plazmada 1,4 saat sonra maksimum konsantrasyon düzeyine çıktığı (t_{maks}) ve maksimum konsantrasyon değerinin ise (C_{maks}) 2,82 ± 1,80 µg/mL olduğu tespit edilmiştir.

CLK-8'in yağda çözünürlüğünün yüksek olması, beyin dokusuna geçişini kolaylaştırıcı bir etkendir. Bu çalışmada, CLK-8'in beyin dokusuna geçtiği ilk kez tespit edilmiştir. Bu özellik, merkezi sinir sistemi üzerinde potansiyel etkileri olabileceğini göstermektedir. CLK-8'in karaciğere yüksek dağılımı, lipofiliklik (yağda çözünürlük) özelliği ile açıklanabilir. Karaciğer, yüksek perfüzyona sahip bir organ olup, lipofilik bileşiklerin burada yoğunlaşması yaygındır. Bu durum, CLK-8'in karaciğerde metabolize olabileceğine işaret etmektedir.

CLK-8'in dağılım hacmi yüksek bulunmuştur (4,71 ± 1,32 L/kg). Bu, ilacın vücut dokularına geniş bir şekilde yayıldığını göstermektedir. Yüksek dağılım hacmi, ilacın plazma yerine dokularda daha fazla bulunduğunu ve hedef dokulara etkin bir şekilde ulaşabileceğini gösterir. Bu çalışma temel düzeyde planlanmış olduğu için CLK-8'in . sitokrom P-450 enzimlerinin hangi izoformlarına afinite duyduğu henüz bilinmemektedir. Metabolitleri ve taşıyıcı proteinlere olan afinitesi hakkında henüz bilgi sahibi değiliz. Metabolitlerin tanımlanması, ilacın güvenliği ve etkinliği açısından önemli olup, gelecekteki çalışmalarda ele alınması gereken bir konudur.

CLK-8'in atılım mekanizmaları henüz araştırılmamıştır. İlacın vücuttan nasıl atıldığı, hem farmakokinetik profilin anlaşılması hem de olası yan etkilerin değerlendirilmesi açısından kritik öneme sahiptir. Gelecek çalışmalar, bu mekanizmaları detaylı olarak incelemelidir. Özellikle, safradan atılımın metabolitleri de içine alacak şekilde incelenmesi uygun bir yaklaşım olacaktır. İntestinal atılımın da incelenmesi gerekmektedir, çünkü molekül oldukça lipofiliktir. Bu şekilde karaciğer dokusunda oluşan çift pikleri açıklaması yapılabilir.

CLK-8'in mutlak biyoyararlanımı henüz belirlenmemiştir. Mutlak biyoyararlanım, ilacın i.v. yolla uygulamaya göre sistemik dolaşıma ne kadarının ulaştığını belirler ve bu bilgi, dozaj ayarlamalarının yapılması için gereklidir. İlerleyen araştırmalar, mutlak biyoyararlanım çalışmalarını da içermelidir.

Sirkadiyen saat üzerinde etkinliği çalışmalarda gösterilmiş küçük molekül modülatörlerin farmakokinetik özellikleri, bu moleküllerin terapötik potansiyelini ve kullanım şeklini belirlemede kritik öneme sahiptir. Bu anlamda potansiyel terapötik bir ajan grubu olan REV-ERBα ligandlarının genel farmakokinetik özelliklerine baktığımızda, düşük oral biyoyararlanıma sahip olduklarını ve kısa yarı ömre sahip olduklarını görüyoruz. Normal ve diyabetik sıçanlarda SR8278'in farmakokinetik parametrelerinin ölçüldüğü bir çalışmada, SR8278'in plazma konsantrasyon-zaman eğrisi altındaki alan (AUC) değerleri normal farelerde 608.33 ± 295.25 ng·sa/mL, diyabetik farelerde 598.59 ± 276.92 ng·sa/mL olarak belirlenmiştir. Eliminasyon yarı ömürlerininse ($_{t1/2}$) normal farelerde 0.17 ± 0.08 saat, diyabetik farelerde 0.11 ± 0.04 saat olduğu gösterilmiştir (78). Benzer şekilde, GSK4112 de SR8278 gibi zayıf farmakokinetik özellikler sergilemektedir (79). SR9009 ve SR9011, GSK4112'nin kimyasal yapısına dayanarak tasarlanmış güçlü REV-ERBα agonistleridir. Bu iki bileşiğin GSK4112'den yaklaşık üç kat daha güçlü ve etkili olduğu ve daha iyi farmakokinetik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. GSK2945 de aynı şekilde GSK4112 şablonuna dayanılarak tasarlanmış bir bileşiktir, ancak daha uzun bir yarı ömre (2 saat) ve %23 oral biyoyararlanıma sahip üstün bir farmakokinetik profille öne çıkmaktadır (80). Düşük biyoyararlanım ve suboptimal farmakokinetik özelliği sahip olmaları REV-ERBα ligandlarının ilaç geliştirme sürecindeki sınırlayıcı faktörlerdendir.

Çalışmamızın kısıtlılıklarına bakacak olursak; ilacın karaciğer ve beyin dokularındaki dağılım ve metabolizmasını daha doğru analiz edebilmek için kompartmantal analiz yapılması uygun bir yaklaşım olabilir. Ayrıca çalışmamızda molekülün farmakokinetiğinin belirlenmesi için 48. saate kadar verilerimiz bulunmaktadır. Molekül 48 saat sonra bile özellikle karaciğer dokusunda tespit edilmiştir, bu nedenle daha uzun süreli numune toplanması ve değerlendirilmesi daha ilgi çekici olabilir. Preklinik farmakokinetik çalışmaların tamamlanması ve güvenlilik farmakolojisi çalışmalarının tamamlanmasını takiben molekül klinik faza geçebilecektir.

KAYNAKLAR

1. Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME, Hogenesch JB. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(45):16219-24.
2. Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Vykhovanets OV, Antoch MP. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core componentof the circadian clock. Genes Dev. 2006;20(14):1868-73.
3. Doruk YU, Yarparvar D, Akyel YK, Gul S, Taskin AC, Yilmaz F, et al. A CLOCK-binding small molecule disrupts the interaction between CLOCK and BMAL1 and enhances circadian rhythm amplitude. J Biol Chem. 2020;295(11):3518-31.
4. Kolker DE, Vitaterna MH, Fruechte EM, Takahashi JS, Turek FW. Effects of age on circadian rhythms are similar in wild-type and heterozygous Clock mutant mice. Neurobiol Aging. 2004;25(4):517-23.
5. Gul S, Akyel YK, Gul ZM, Isin S, Ozcan O, Korkmaz T, et al. Discovery of a small molecule that selectively destabilizes Cryptochrome 1 and enhances life span in p53 knockout mice. Nat Commun. 2022;13(1):6742.
6. Gloston GF, Yoo SH, Chen ZJ. Clock-enhancing small molecules and potential applications in chronic diseases and aging. Front Neurol. 2017;8:100.
7. Sanlier N, Sözlü S. Sirkadiyen Ritim, Sağlık ve Beslenme İlişkisi. Türkiye Klinikleri Sağlık Bilimleri Dergisi. 2017;2(2):100-9.
8. Roenneberg T, Merrow M. Circadian clocks - the fall and rise of physiology. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005;6(12):965-71.
9. Reinberg A, Ashkenazi I. Concepts in human biological rhythms. Dialogues Clin Neurosci. 2003;5(4):327-42.
10. Merrow M, Spoelstra K, Roenneberg T. The circadian cycle: daily rhythms from behaviour to genes. EMBO Rep. 2005;6(10):930-5.
11. Levi F, Schibler U. Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2007;47:593-628.
12. Schibler U, Naef F. Cellular oscillators: rhythmic gene expression and metabolism. Curr Opin Cell Biol. 2005;17(2):223-9.
13. Vitaterna MH, Takahashi JS, Turek FW. Overview of circadian rhythms. Alcohol Res Health. 2001;25(2):85-93.
14. Korkmaz T, Aygenli F, Emisoglu H, Ozcelik G, Canturk A, Yilmaz S, et al. Opposite Carcinogenic Effects of Circadian Clock Gene BMAL1. Scientific Reports. 2018;8(1):16023.
15. Poggiogalle E, Jamshed H, Peterson CM. Circadian regulation of glucose, lipid, and energy metabolism in humans. Metabolism. 2018;84:11-27.
16. Lamia KA, Storch K-F, Weitz CJ. Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008;105(39):15172-7.
17. Takahashi JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. Nat Rev Genet. 2017;18(3):164-79.
18. Özbayer C, Değirmenci, İ. Sirkadiyen saat, hücre döngüsü ve kanser. Dicle Tıp Dergisi. 2011;38:514.
19. Robinson I, Reddy AB. Molecular mechanisms of the circadian clockwork in mammals. FEBS Lett. 2014;588(15):2477-83.
20. Feyza Kocar HKE. Sirkadiyen Ritim ve Sirkadiyen Ritimi Etkileyen Faktörler. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi. 2022;15:29-44.

21. Oike H, Oishi K, Kobori M. Nutrients, Clock Genes, and Chrononutrition. Curr Nutr Rep. 2014;3(3):204-12.
22. Scheiermann C, Kunisaki Y, Frenette PS. Circadian control of the immune system. Nat Rev Immunol. 2013;13(3):190-8.
23. Dallmann R, Okyar A, Lévi F. Dosing-Time Makes the Poison: Circadian Regulation and Pharmacotherapy. Trends Mol Med. 2016;22(5):430-45.
24. Öney B, Balcı Ç. Sirkadiyen Ritmin Sağlıktaki Rolü. Türkiye Sağlık Bilimleri ve Araştırmaları Dergisi. 2021;4(2):64-75.
25. Panda S. Circadian physiology of metabolism. Science. 2016;354(6315):1008-15.
26. Bass J, Takahashi JS. Circadian integration of metabolism and energetics. Science. 2010;330(6009):1349-54.
27. Feng D, Lazar MA. Clocks, metabolism, and the epigenome. Mol Cell. 2012;47(2):158-67.
28. Okyar A, Ozturk Civelek D, Akyel YK, Surme S, Pala Kara Z, Kavakli İH. The role of the circadian timing system on drug metabolism and detoxification: an update. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.1-15.
29. Ozturk N, Ozturk D, Kavakli IH, Okyar A. Molecular Aspects of Circadian Pharmacology and Relevance for Cancer Chronotherapy. Int J Mol Sci. 2017;18(10).
30. Rosensweig C, Green CB. Periodicity, repression, and the molecular architecture of the mammalian circadian clock. Eur J Neurosci. 2020;51(1):139-65.
31. King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, et al. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. Cell. 1997;89(4):641-53.
32. Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, et al. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. Science. 1998;280(5369):1564-9.
33. Buhr ED, Takahashi JS. Molecular components of the Mammalian circadian clock. Handb Exp Pharmacol. 2013(217):3-27.
34. Lowrey PL, Takahashi JS. Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms. Adv Genet. 2011;74:175-230.
35. Lowrey PL, Takahashi JS. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2004;5:407-41.
36. Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, et al. A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. Neuron. 2004;43(4):527-37.
37. Gallego M, Virshup DM. Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007;8(2):139-48.
38. Emery P, Reppert SM. A rhythmic Ror. Neuron. 2004;43(4):443-6.
39. Jetten AM. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. Nucl Recept Signal. 2009;7:e003.
40. Bugge A, Feng D, Everett LJ, Briggs ER, Mullican SE, Wang F, et al. Rev-erbα and Rev-erbβ coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. Genes Dev. 2012;26(7):657-67.
41. Solt LA, Wang Y, Banerjee S, Hughes T, Kojetin DJ, Lundasen T, et al. Regulation of circadian behaviour and metabolism by synthetic REV-ERB agonists. Nature. 2012;485(7396):62-8.
42. Eide EJ, Woolf MF, Kang H, Woolf P, Hurst W, Camacho F, et al. Control of mammalian circadian rhythm by CKI epsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. Mol Cell Biol. 2005;25(7):2795-807.

43. Busino L, Bassermann F, Maiolica A, Lee C, Nolan PM, Godinho SIH, et al. SCF'Fbxl3 Controls the Oscillation of the Circadian Clock by Directing the Degradation of Cryptochrome Proteins. Science. 2007;316(5826):900-4.
44. Hughes ME, Abruzzi KC, Allada R, Anafi R, Arpat AB, Asher G, et al. Guidelines for Genome-Scale Analysis of Biological Rhythms. J Biol Rhythms. 2017;32(5):380-93.
45. Currie GM. Pharmacology, Part 2: Introduction to Pharmacokinetics. Journal of Nuclear Medicine Technology. 2018;46(3):221-30.
46. Currie GM, Wheat JM, Kiat H. Pharmacokinetic considerations for digoxin in older people. Open Cardiovasc Med J. 2011;5:130-5.
47. Holford NH, Sheiner LB. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling in vivo. Crit Rev Bioeng. 1981;5(4):273-322.
48. Raghuram TC, Krishnaswamy K. Basic concepts of clinical pharmacokinetics. J Assoc Physicians India. 1992;40(1):29-35.
49. Waller D, Renwick A, Hillier K. Medical Pharmacology and Therapeutics2001.
50. Rang H DM, Ritter J, Flower R. Rang and Dale's Pharmacology London, UK: Churchill Livingston; 2008.
51. Golan DE TA, Armstrong EJ, Armstrong AW. Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy. 3rd ed. Philadelphia2012.
52. Almazroo OA, Miah MK, Venkataramanan R. Drug Metabolism in the Liver. Clin Liver Dis. 2017;21(1):1-20.
53. Ernstmeyer K CE. Nursing Pharmacology: Chapter 1 Pharmacokinetics & Pharmacodynamics. 2nd edition ed. Chippewa Valley Technical College2023.
54. Southwood R FV. Introduction to pharmacokinetics and pharmacodynamics. 7th edition ed. Bethesda2018.
55. Ono K, Iwasaki YK, Akao M, Ikeda T, Ishii K, Inden Y, et al. JCS/JHRS 2020 Guideline on Pharmacotherapy of Cardiac Arrhythmias. Circ J. 2022;86(11):1790-924.
56. Katherine D, Natacha B, Christine B, Nadia C-M, Mike Di S, Julie G. Application of Pharmacokinetics in Early Drug Development. In: Ntambwe M, editor. Pharmacokinetics and Adverse Effects of Drugs. Rijeka: IntechOpen; 2018. p. Ch. 4.
57. Barbour N, Lipper R. Introduction to Biopharmaceutics and its Role in Drug Development. 2008.
58. Ribeiro RFN, Cavadas C, Silva MMC. Small-molecule modulators of the circadian clock: Pharmacological potentials in circadian-related diseases. Drug Discovery Today. 2021;26(7):1620-41.
59. He B, Chen Z. Molecular Targets for Small-Molecule Modulators of Circadian Clocks. Curr Drug Metab. 2016;17(5):503-12.
60. Chen Z, Yoo SH, Takahashi JS. Development and Therapeutic Potential of Small-Molecule Modulators of Circadian Systems. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2018;58:231-52.
61. Surme S, Ergun C, Gul S, Akyel YK, Gul ZM, Ozcan O, et al. TW68, cryptochromes stabilizer, regulates fasting blood glucose levels in diabetic ob/ob and high fat-diet-induced obese mice. Biochem Pharmacol. 2023;218:115896.
62. Chun SK, Jang J, Chung S, Yun H, Kim NJ, Jung JW, et al. Identification and validation of cryptochrome inhibitors that modulate the molecular circadian clock. ACS Chem Biol. 2014;9(3):703-10.
63. Rijo-Ferreira F, Takahashi JS. Genomics of circadian rhythms in health and disease. Genome Medicine. 2019;11(1):82.
64. Shi SQ, Ansari TS, McGuinness OP, Wasserman DH, Johnson CH. Circadian disruption leads to insulin resistance and obesity. Curr Biol. 2013;23(5):372-81.

65. Jeong K, He B, Nohara K, Park N, Shin Y, Kim S, et al. Dual attenuation of proteasomal and autophagic BMAL1 degradation in Clock Δ19/+ mice contributes to improved glucose homeostasis. Sci Rep. 2015;5:12801.
66. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, et al. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. Cell Metab. 2012;15(6):848-60.
67. Cook DN, Kang HS, Jetten AM. Retinoic Acid-Related Orphan Receptors (RORs): Regulatory Functions in Immunity, Development, Circadian Rhythm, and Metabolism. Nucl Receptor Res. 2015;2.
68. Chang MR, He Y, Khan TM, Kuruvilla DS, Garcia-Ordonez R, Corzo CA, et al. Antiobesity Effect of a Small Molecule Repressor of RORγ. Mol Pharmacol. 2015;88(1):48-56.
69. Sahar S, Sassone-Corsi P. Regulation of metabolism: the circadian clock dictates the time. Trends Endocrinol Metab. 2012;23(1):1-8.
70. Jia Y, Lu Y, Wu K, Lin Q, Shen W, Zhu M, et al. Does night work increase the risk of breast cancer? A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. Cancer Epidemiol. 2013;37(3):197-206.
71. Wang Y, Kojetin D, Burris TP. Anti-proliferative actions of a synthetic REV-ERBα/β agonist in breast cancer cells. Biochem Pharmacol. 2015;96(4):315-22.
72. Lévi FA, Okyar A, Hadadi E, Innominato PF, Ballesta A. Circadian Regulation of Drug Responses: Toward Sex-Specific and Personalized Chronotherapy. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 2024;64(Volume 64, 2024):89-114.
73. Jones CR, Huang AL, Ptáček LJ, Fu YH. Genetic basis of human circadian rhythm disorders. Exp Neurol. 2013;243:28-33.
74. [Available from: (https://www.medchemexpress.com/search.html?q=CLK-8&ft=&fa=&fp=&type=inhibitors-and-agonists).
75. Gülçin I, Bursal E, Sehitoğlu MH, Bilsel M, Gören AC. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. Food Chem Toxicol. 2010;48(8-9):2227-38.
76. Wallach T, Kramer A. Chemical chronobiology: Toward drugs manipulating time. FEBS Letters. 2015;589(14):1530-8.
77. Oshima T, Yamanaka I, Kumar A, Yamaguchi J, Nishiwaki-Ohkawa T, Muto K, et al. C□H Activation Generates Period-Shortening Molecules That Target Cryptochrome in the Mammalian Circadian Clock. Angewandte Chemie International Edition. 2015;54(24):7193-7.
78. Dong D, Sun H, Wu Z, Wu B, Xue Y, Li Z. A validated ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to identify the pharmacokinetics of SR8278 in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2016;1020:142-7.
79. Kojetin D, Wang Y, Kamenecka TM, Burris TP. Identification of SR8278, a synthetic antagonist of the nuclear heme receptor REV-ERB. ACS Chem Biol. 2011;6(2):131-4.
80. Kojetin DJ, Burris TP. REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets. Nat Rev Drug Discov. 2014;13(3):197-216.

ETİK KURUL KARARI

Tarih ve Sayı: 07.09.2022-1199428

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı



Sayı :E-35980450-050.01.99-1199428
Konu :Alper OKYAR'a ait Etik Kurul Onayı Hk.

Sayın Prof. Dr. Alper OKYAR

İlgi : 12.08.2022 tarihli, 1147159 sayılı yazı

Sorumluluğunu üstlendiğiniz **Ecz. Elif GERGER'e ait** "CLOCK Proteininin Fonksiyonunu Düzenleyen CLK-8 Bileşiğinin Faredeki Farmakokinetiği" isimli projeniz Etik Kurulumuzun 19.08.2022 tarihli toplantısında görüşülmüş olup, 2022/26 Etik Kurulu Onayı ilişikte gönderilmiştir.

Gereği için bilgileriniz rica olunur.

Prof. Dr. Ufuk KOLAK
Başkan

Ek:Etik Kurul Onayı

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Tarih ve Sayı: 06.09.2022-1172774



Sayın Prof. Dr. Alper OKYAR
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Ana Bilim Dalı

Karar No:2022/26

Başvuru : 12.08.2022/ 1147159

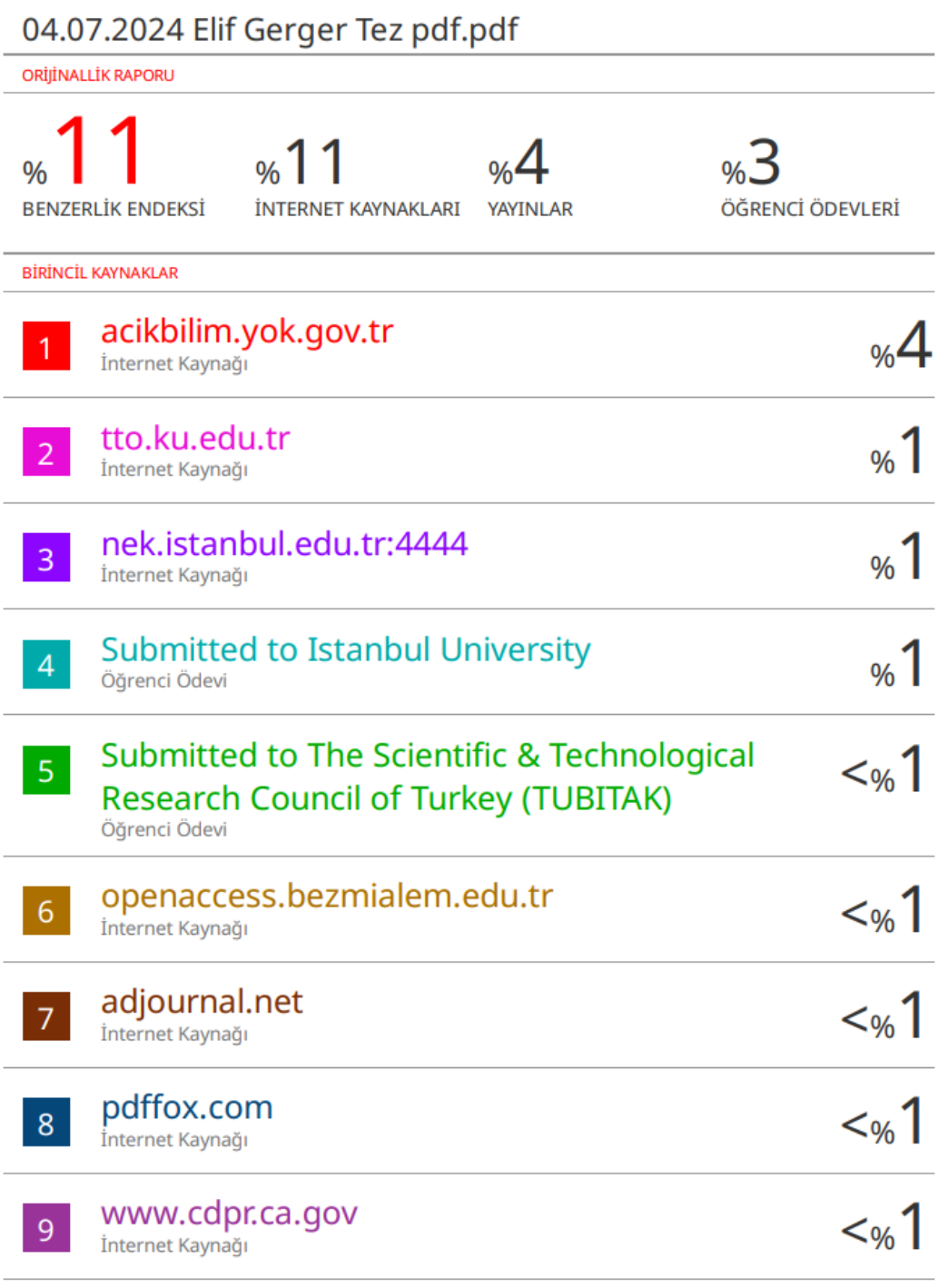
Toplantı Tarihi : 19.08.2022

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen **Ecz. Elif GERGER'e ait** "CLOCK Proteininin Fonksiyonunu Düzenleyen CLK-8 Bileşiğinin Faredeki Farmakokinetiği" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Fare
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	40
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi		15.09.2022/15.09.2023

Prof. Dr. Ufuk KOLAK Başkan **(İzinli)**	Prof. Dr. Alper OKYAR Başkan Yardımcısı **(Proje yürütücü olduğundan imzalamadı)**	Prof. Dr. Mustafa Oral ÖNCÜL Üye **(Toplantıya katılmadı)**
Prof. Dr. Hatice Bilge BECERİR Üye	Prof. Dr. Büket AYBAR Üye	Prof. Dr. Devrim MEMİŞ Üye
Prof. Dr. Uğur AKSU Üye	Dr. Öğr. Üyesi Aydın ÇEVİK Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ali Cihan TAŞKIN Üye
Mak.Yük.Müh.Dr.Burak OLGUN Üye	Av. Selma DEMİR Üye	

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



04.07.2024 Elif Gerger Tez pdf.pdf

ORİJİNALLİK RAPORU

%11	%11	%4	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%4
2	tto.ku.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
5	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
6	openaccess.bezmialem.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	adjournal.net İnternet Kaynağı	<%1
8	pdffox.com İnternet Kaynağı	<%1
9	www.cdpr.ca.gov İnternet Kaynağı	<%1