T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

KRİPTOKROM1 PROTEİN YIKIMINI HIZLANDIRAN M47 MOLEKÜLÜNÜN SIÇANDA MAKSİMUM TOLERE EDİLEBİLİR DOZUNUN (MTD) ARAŞTIRILMASI

BETÜL İYİGÜN

DANIŞMAN
PROF.DR.ALPER OKYAR

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2023

TEZ ONAYI

BEYAN

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin tüm aşamalarında bana yol gösteren, moral veren bilgisi ve tecrübesiyle her zaman bana destek olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Alper Okyar'a,

Başta Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sönmez Uydeş Doğan olmak üzere Anabilim Dalı'ndaki değerli öğretim üyelerine,

Deney sürecimin her aşamasında bana destek olup birçok deney tekniğini bana öğreten, bilgi ve manevi desteklerini hep hissettiğim değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Aydın Çevik ve Dr. Öğr. Üyesi Ali Cihan Taşkın ve Laboratuvar Hayvanları Bilimi AD teknisyenlerine,

Bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Dr. Öğr. Üyesi Dilek Öztürk Civelek ve Dr. Öğr. Üyesi Yasemin Kübra Akyel'e,

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığımız ve etken madde temini hususunda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. İ. Halil Kavaklı ve Dr. Öğr. Üyesi Şeref Gül'e,

Histopatolojik çalışmalarda yardımları için Prof. Dr. Engin Kaptan ve Suna Bektaş'a,

Her zaman yaptıkları gibi bu süreçte de bana hep destek olan Sevgili Aile'me,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38433

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİ
ÖZET ..... XİV
ABSTRACT XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Sirkadiyen Saat 3
2.1.1. Merkezi Saat ve Suprakiazmatik Çekirdek 4
2.1.2. Periferik Saatler 10
2.2. Moleküler Sistemin Sirkadyen Saate Etkisi 12
2.3. Moleküler Genlerdeki Değişimlerin Fizyolojik Sisteme Etkisi 16
2.3.1. Cry Genindeki Değişimlerin Bazı Önemli Hastalıklardaki Rolü 22
2.4.Toksikoloji Bilimi ve Toksik Etkiler 23
2.5. Toksisite Testleri 24
2.5.1. Akut Toksisite Testleri 25
2.5.1.1. Klasik Akut Toksisite Testlerine Alternatif Metodlar 27
2.5.2. Maksimum Tolere Edilebilir Doz (MTD) Çalışması 29
2.5.3. Subakut Toksisite Testleri 30
2.5.4. Subkronik Toksisite Testleri 30
2.5.5. Kronik Toksisite Testleri 31
2.5.6. Diğer Özel Amaçlarla Yapılan Toksisite Testleri 31
2.6. M47 Molekülü 32
2.6.1. M47 Molekülünün Fizikokimyasal Özellikleri 32
2.6.2. M47'nin Moleküler Formülü 32

2.6.3. M47 ile Yapılan İn Vitro Çalışmalar 33
2.6.4. M47 ile Yapılan İn Vivo Çalışmalar.....33
2.6.5. M47 Molekülünde Yapılan Farmakokinetik ve Toksikolojik Çalışmalar 34
2.6.5.1. M47'nin Deney Hayvanlarındaki Farmakokinetineği 34
2.6.5.2. M47'nin Deney Hayvanlarındaki Toksisite Profili.....35
2.6.6. M47'nin Genel Toksik Etkilerinin Sınıflandırılması 35
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....36
3.1. Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanlarının Seçimi ve Yaşam Koşulları.....36
3.2. Deneyde Kullanılan Malzeme ve Aletler.....36
3.2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler 36
3.2.2. Deneyde Kullanılan Aletler 37
3.3. Toksisite Çalışması 38
3.3.1. M47'nin Çözeltisinin Hazırlanması 38
3.3.1.1. Çözelti Hazırlanmasında Yapılan Hesaplamalar 38
3.3.2. Doz Eskalasyon Çalışması 39
3.3.3. Maksimum Tolere Edilebilir Doz (MTD) Çalışması 40
3.4. Sıçanların Sakrifiye Edilmesi 40
3.5. Kullanılan Analiz Yöntemleri.....41
3.5.1. Biyokimyasal ve Hematolojik Analizler.....41
3.5.1.1. Biyokimyasal ve Hematolojik Analizlerde Uygulanan İşlemler 41
3.6. Histopatolojik Analizler.....46
4. BULGULAR.....48
4.1. Doz Eskalasyon Çalışması Sonuçları.....48
4.1.1. Doz Eskalasyon Çalışmasında Yapılan Klinik Gözlemler 48
4.1.2. Doz Eskalasyon Çalışmasında Yapılan Vücut Ağırlığı Ölçümleri.....49
4.1.3. Doz Eskalasyon Çalışmasında Yapılan Vücut Sıcaklığı Ölçümleri 49
4.2. MTD Sonuçları 49
4.2.1 Klinik Gözlem Sonuçları 50
4.2.2. Vücut Ağırlığı Ölçümleri.....51
4.2.3. Vücut Sıcaklığı Ölçümleri 53
4.2.4. Sıçanların sakrifiye edilmesi ve nekropsi sonuçları.....56
4.2.5. Hematolojik Analizler.....57
4.2.6. Biyokimyasal Analizler.....62

4.2.7. Histopatolojik Analizler 65
4.2.7.1. Karaciğerde Yapılan Histopatolojik Analiz 65
4.2.7.2. Böbrekte Yapılan Histopatolojik Analiz 66
5. TARTIŞMA 69
KAYNAKLAR 74
ETİK KURUL KARARI 90
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 91
ÖZGEÇMİŞ 92

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: LD_{50} değerlerine göre kimyasalların toksisite seviyeleri 27
Tablo 3-1: Hemogram testlerindeki parametreler. 42
Tablo 3-2: Biyokimyasal testlerindeki parametreler. 45
Tablo 4-1: Doz eskalasyon çalışması için yapılan klinik gözlem sonuçları. 48
Tablo 4-2: Doz eskalasyon çalışması için yapılan vücut ağırlığı ölçümlerinin sonuçları 49
Tablo 4-3: Doz eskalasyon çalışması için yapılan vücut sıcaklığı ölçümlerinin sonuçları. 49
Tablo 4-4: M47 molekülünün uygulanması sırasında yapılan klinik gözlem sonuçları… 50
Tablo 4-5: Farklı dozların uygulandığı sıçanlarda vücut ağırlık ölçümlerinin sonuçları. 51
Tablo 4-6: Farklı dozların uygulandığı sıçanlarda vücut ağırlık ölçüm sonuçları. 52
Tablo 4-7: Farklı dozların uygulandığı sıçanlarda vücut sıcaklık ölçümlerinin sonuçları. 54
Tablo 4-8: Farklı dozların uygulandığı sıçanların vücut sıcaklık ölçümleri 55
Tablo 4-9: Sıçanların organ ve vücut ağırlıkları ve nekropsi sonuçları. 56
Tablo 4-10: Uygulan doza göre hemogram testindeki parametreler 58
Tablo 4-11: Uygulan doza göre biyokimyasal testlerdeki parametreler. 63
Tablo 4-12: Karaciğerde oluşan hasarın histopatolojik skorlaması. 65
Tablo 4-13: Böbreklerde oluşan hasarın histopatolojik skorlaması. 67

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Retinada bulunan fotoreseptörler 6
Şekil 2-2: Glukokortikoid hormonunun salınım yolları 8
Şekil 2-3: Merkezi saatin periferdeki hücre ve organları senkronize etmesi 12
Şekil 2-4: Moleküler saatin mekanizmasının şekil üzerinde gösterilmesi..... 15
Şekil 2-5: M47 molekülünün açık kimyasal formülü 33
Şekil 4-1: M47 molekülünün uygulanmasından önce ve sonra sıçanlardaki vücut ağırlık ölçümlerinin gösterimi 53
Şekil 4-2: M47 molekülünün uygulanmasından önce ve sonra sıçanlardaki vücut sıcaklık ölçülerinin gösterimi..... 55
Şekil 4-3: M47 molekülünün beyaz kan hücreleri ile ilgili hematolojik parametrelere etkisinin gösterimi..... 60
Şekil 4-4: M47 molekülünün kırmızı kan hücreleri ile ilgili hematolojik parametrelere etkisinin gösterimi..... 61
Şekil 4-5: M47 molekülünün kan pulcukları ile ilgili hematolojik parametrelere etkisinin gösterimi..... 62
Şekil 4-6: M47 molekülünün biyokimyasal parametrelere etkisinin gösterimi. 64
Şekil 4-7: M47 uygulanmasıyla oluşan karaciğer hasarının gösterimi. 66
Şekil 4-8: M47 uygulanmasıyla oluşan böbrek hasarının gösterimi..... 68

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACTH: Adrenokortikotropik hormon

ALT: Alanin aminotransferaz

AMPK: AMP ile aktive edilmiş protein kinaz

AST: Aspartat aminotransferaz

ATM: Ataxia telangiectasia mutated

BD : Balonlaşma dejenerasyonu

Bmal1: Brain-muscle-arnt-like 117 protein 1

cAMP: Siklik adenozin monofosfat

CAR : Konstitutif androstan reseptörü

CDK: Sikline bağımlı kinazlar

CK ε: Kazein kinaz epsilon

CK1 δ: Kazein kinaz 1 alfa

CLOCK: Circadian locomotor output cycles kaput

CREA: Kreatinin

CRY: Kriptokrom

CSD: Kapsülün distansiyonu

DBP: Albümin D- bağlayıcı protein

EH : Eozin

EPA: Amerika Çevre Koruma Ajansı

FB: Karaciğerde fibroz doku oluşması

GA: Glomerüler atrofi

GC: Kortizol

GR: Glukokortikoid reseptörleri

GRE: Glukokortikoid sorumlu element

HLF: Hepatik lösemi faktörü

IARC: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı

IC: İnterstisyel konjesyon

ICI: Enflamatuvar hücre infiltrasyonu

IE: İnterstisyel ödem

IpRGC: Işığa duyarlı retina ganglion hücreleri

KF: Böbrekte fibrozis oluşması

LBB: Böbrek tübüllerindeki mikrovillusların kaybı

LD_{50}: Letal Doz 50

MTD: Maksimum Tolere Edilebilir Doz

N : Nekroz

Npas2: Nöronal PAS protein 2

OECD: Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü

OSHA: İş sağlığı ve Güvenliği İdaresi

PAR bZIP: Proline-acidic amino acid-rich basic leucine zipper transkripsiyon faktörü

PER: Periyod

REV-ERBα: Rev-Erb α nükleer reseptörü

REV-ERBβ: Rev-Erb β nükleer reseptörü

RHT: Retinohipotalanik yol

ROR: Retinoik asid ilişkili yetim reseptör

RORE: Retinoik asid ilişkili bağlayıcı element

RTN: Renal tübüler nekroz oluşumu

SCF: Ubikuitin ligaz kompleksi

SKÇ: Suprakiazmatik çekirdek

SN: Lekeli nekroz oluşumu

STS: Karaciğer yağlanması

TBIL: Total Bilirubin

TEF: Tirotrop embriyonik faktörü

TTFL: Geri besleme döngüsü

β-TrCP: β-Transdusin içeren protein

ÖZET

İyigün, B. (2023). Kriptokrom1 protein yıkımını hızlandıran m47 molekülünün sıçanda maksimum tolere edilebilir dozunun (MTD) araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Farmakoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Kriptokrom genleri nakavt olan p53 mutasyonu taşıyan farelerde beklenmedik şekilde yaşam süresinin arttığı gözlemlenmiştir. Prof. Dr. Aziz Sancar ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bu çalışmanın ardından kriptokrom proteinlerinin yıkımını sağlayacak küçük moleküllerin kanser tedavisinde kullanılabileceği hipotezi ortaya çıkmıştır. Projemizde, in vivo çalışmalar ile kriptokrom proteinlerinin yarılanma ömürlerini azaltan M47'nin sıçanlarda oluşturduğu toksik etkileri belirlemek ve maksimum tolere edilebilir dozunun araştırılması hedeflenmiştir. M47 molekülü ilk kez sıçana uygulandığından hayvanlarda öncelikle doz eskalasyon çalışması yapılmıştır. M47 molekülü 10, 25, 100, 300 mg/kg dozlarında intraperitoneal yoldan tek doz olarak uygulanmıştır. Uygulama sonucunda advers etkiler ve mortalite gözlemlenerek hayvanlara tekrarlı uygulamada seçilecek dozlar belirlenmiştir. Çalışmanın ikinci kısmında doz eskalasyon çalışmasına göre belirlenen 80, 120, 300 mg/kg M47 sıçanlara beş gün süreyle i.p olarak uygulanmıştır. Uygulama sırasında sıçanların vücut ağırlıkları, vücut sıcaklıkları tespit edilmiştir. Uygulamalardan sonra sıçanlar sakrifiye edilmiş ve kan örnekleri toplanarak hematolojik/biyokimyasal parametreler tespit edilmiştir. Karaciğer ve böbrek doku numunelerinde histopatolojik hasar skorlama yöntemi kullanılarak doku hasarları belirlenmiştir. Karaciğer ve böbrek dokusunda tespit edilen hasarlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$). Biyokimyasal analizlerde ALT ve AST enzim değerlerinin yükseldiği belirlenmiştir. Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre M47'nin maksimum tolere edilebilir dozunun 300 mg/kg olduğu ve M47'nin sıçanda düşük toksisite potansiyeline sahip bir bileşik olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: M47, kriptokrom, apoptoz, kanser, sirkadiyen saat.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 38433

ABSTRACT

Iyigün, B. (2023). Investigation of the maximum tolerated dose (MTD) of m47 molecule, which accelerates Cryptochrome1 protein degradation, in rats. İstanbul University, Institute of Health Science, Pharmacology ABD. Master Thesis. İstanbul.

An unexpected increase in lifespan was observed in mice carrying the p53 mutation with knocked down cryptochrome genes. After Prof. Dr. Aziz Sancar and coworkers carried out this study, the hypothesis that small molecules that would degrade cryptochrome proteins could be used in cancer treatment has emerged. In our project, it is aimed to determine the toxic effects of M47, which reduces the half-life of cryptochrome proteins in rats and to investigate the maximum tolerated dose by in vivo studies. Since the M47 was first administered to the rats, a dose escalation study was firstly performed in animals. M47 was administered as a single dose intraperitoneally at doses of 10, 25, 100, 300 mg/kg. Then, adverse effects and mortality were observed. In the following part, 80, 120, 300 mg/kg were determined according to the dose escalation study and M47 was administered to rats as i.p. for five consecutive days. During the application, the body weights and body temperatures of the rats were determined. After the administrations, the rats were sacrificed and blood samples were collected to determine the hematological and biochemical parameters. Tissue damage was determined by histopathological evaluation. Damages detected in liver and kidney tissue were found to be statistically significant. ($p \leq 0,05$). In biochemical analysis, it was determined that ALT and AST enzyme values were increased. According to the results of this thesis study, it was determined that the maximum tolerable dose of M47 was 300 mg/kg and M47 was a compound with low toxicity potential in the rat.

Key Words: M47, cryptochrome, apoptosis, cancer, circadian clock.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 38433.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sirkadiyen saat sistemi, canlıların fizyolojik ritimlerinin dünyanın 24 saatlik döngüsüne adapte olmasını sağlar ve vücudu dış koşullara adapte edebilmek için fizyolojik süreçleri düzenler (Pilorz ve ark., 2020; Fagiani ve ark., 2022). Sirkadiyen sisteme yönelik yapılan araştırmalar bu sistemin insan fizyolojisini etkilediğini göstermiştir. Sirkadyen sistemin dengesinin bozulması ise, başta kanser olmak üzere uyku bozuklukları ve diyabet gibi metabolik hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır (Ferreira ve Takahashi, 2019).

P53 geni hücrelerdeki apoptoz mekanizmasını tetiklediğinden P53 geni baskılayıcı gen olarak adlandırılır (Gülsar ve ark., 2016). İnsanlarda görülen kanserlerin %50'sinde p53 geninde mutasyon olduğu tespit edilmiştir (Baugh ve ark., 2018; Kennedy ve Lowe., 2022). Prof. Dr. Aziz Sancar ve grubu tarafından yapılan çalışmada; p53, Cry1 ve Cry2 genleri nakavt olan farelerle sadece p53 geni nakavt olan fareler karşılaştırıldığında üç genin nakavt olduğu grupta kanser görülme olasılığının daha düşük olduğu görülmüştür. Aynı zamanda üç genin nakavt olduğu farelerde hayatta kalma süresinin 1,5 kat arttığı tespit edilmiştir (Öztürk ve ark., 2009). Çalışmalar sonucunda kriptokromların yarılanma ömrünü azaltan ve yıkımını sağlayan moleküllerin p53 mutasyonunun görüldüğü kanserlerin tedavi protokolünde kullanılabileceği düşünülmektedir.

Prof. Dr. Aziz Sancar ve ekibinin yaptığı çalışmadan hareketle, Cry proteinin yarılanma ömrünü azaltan küçük moleküllerin keşfi için çalışmalar yapılmıştır. Gül ve ark. tarafından yapılan çalışmada Cry geninin yapısı esas alınarak çok sayıda molekül belirlenmiştir. Bu çalışmada yaklaşık iki milyon molekül arasından M47 adlı molekül seçilmiştir. M47 adlı molekülün in vitro koşullarda Cry1 proteinini etkilediği, Cry2 proteinine ise afinite göstermediği belirlenmiştir. İlaveten, M47'nin farmakokinetik paremetreleri belirlenmiş ve yapılan in vivo çalışmalarda M47 molekülünün farelerde belirli hücrelerde apoptozu tetiklediği tespit edilmiştir (Gül ve ark., 2022). M47 molekülü orijinal bir moleküldür. Tez çalışmamızda M47 molekülünün toksik etkilerinin tespit edilmesi için beş günlük maksimum tolere edilebilir doz (MTD) çalışması yapılmıştır.

Çalışmamızda M47 molekülü sıçan türünde ilk kez uygulandığından ilk önce bir doz eskalasyon çalışması yapılmıştır. Daha sonra tezin temel kısmı olan maksimum tolere edilebilir doz (MTD) çalışması yapılmıştır. MTD, ağır derecede toksisite oluşturmayan doz olarak tanımlanmaktadır ve bu dozun üzerinde alınan dozlarda ağır toksik etkilerin oluşması beklenmektedir (Chevret, 2014). Bu aşamada sıçanlara üç farklı dozda M47 beş gün boyunca i.p yolla verilmiştir. Bu uygulamayı takiben, sıçanlarda görülebilecek klinik değişiklikler takip edilmiştir. Deney sonunda, sıçandan alınan kanlarla hematolojik ve biyokimyasal analizler; sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında ise histopatolojik analiz yapılarak bu dokulardaki doza bağlı hasar değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda M47 molekünün sıçanlarda oluşturabileceği toksik etkilerinin belirlenmesi ve aynı zamanda uygulanabilecek ve ağır toksisite oluşturmayan en yüksek dozun (MTD) tespiti amaçlanmaktadır. Tez çalışmamızda M47 molekülü sıçanlarda uygulanıp tekrarlı dozlarda toksisite çalışması yapılmıştır.

M47 molekülünün, p53 mutasyonu olan kanserlerin tedavisinde etkili olabileceği ve hastaların sağ kalım süresini uzatabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sirkadiyen Saat

Güneşin doğuşu ve batışının bir ritim halinde oluşu, günlük ritimin nedeni ile ilgilenen doğa bilimcileri meraklandırmıştır. 18.yüzyılda Mimoza bitkisini karanlık bir odaya koyulduğunda 24 saatlik periyotta yapraklarının açılıp kapanması, araştırmacıları bunu düzenleyen bir saatin olduğunu kanıtlamaya itmiştir. Bu çalışmadan iki yüzyıldan fazla süre sonra araştırıcıların meyve sineklerinde yaptığı genetik çalışmalar, sirkadiyen saatin bir dizi aktivatör ve baskılayıcı faktör tarafından kontrol edilerek oluştuğunu anlamanın yolunu açmıştır (Rutter ve ark., 2002)

Sirka latincede yaklaşık, diem ise bir gün anlamına gelmektedir. Sirkadiyen ritim ve organizmalardaki mekanizması son yıllarda Raraştırmacıların ilgisini çekmiş ve son 40 yıllarda fizyoloji ve moleküler biyolojinin en çok çalışılan dallarından biri haline gelmiştir (Dunlap, 1999).

Sirkadiyen saat, biyokimyasal ve davranışsal pek çok durumu gece/gündüz döngüsüyle uyumlu hale getirir. Neredeyse tüm omurgalılardaki hücreler, hücresel bazı değişiklikleri kendi endojen ritimiyle birleştiren kendine özgü ve sabit bir saate sahiptir (Bass ve ark., 2010). Sirkadiyen saat, çevresel sinyaller almadığında da yaklaşık 24 saatlik otomatik ritimler oluşturabilir (Roenneberg ve Merrow, 2016). Uyku döngüsü, hormonal ve sinirsel aktivite, vücut sıcaklığının kontrolü gibi vücuttaki pek çok fizyolojik durum 24 saat boyunca ritimik değişiklikler gösterir (Tahara ve ark., 2017).

Sirkadiyen ritim, organizmanın bir adaptasyonudur ve bu ritim, organizmanın fizyolojik değişkenleri ve metabolizmasını dünyanın karanlık-aydınlık döngüsüne göre düzenlenmesini sağlar. Oluşturulan ritim, endojen bir biyolojik saat olan sirkadiyen saat ve çeşitli çevresel faktörler tarafından düzenlenir. Işık döngüsü, sıcaklık değişimleri ve yeme alışkanlıkları bu çevresel faktörlerden bazılarıdır (Kavaklı ve ark., 2022). Hormonların (steroid yapıda olanlar ve insülin) sistemik olarak salınması sonucu sirkadiyen saat tarafından birçok fizyolojik olay kontrol edilir. Hormonlar salınıp hedef hücrelere ulaşması, endokrin etki, bağışıklık fonksiyonları, uyku düzeni ve enerji homeostazı gibi birçok fonksiyondan etkilenir. Bu şekilde sirkadiyen saat insan sağlığını üzerine etkiler göstermiş olur (Di Cara ve Jones, 2016).

Organizmaların, fizyolojik fonksiyonlarındaki ve davranışlarındaki gece ve gündüz boyunca değişen düzenli ritimik süreçler, sabit koşullar altında 24 saati çok az miktar geçen periyotlardır. (Aschoff ve Pohl, 1978). Bunun sonucu olarak sirkadyen saat, dış dünyayla uyum içinde kalmak için sürekli olarak yeniden ayarlanmalıdır. Bu düzenlemeyi yapabilmek için 'Zeitgebers' olarak adlandırılan çevresel faktörler tarafından etkilenerek 24 saat olarak sabitlenir ve senkronize edilir Çevresel sinyal olarak yani Zeitgebers olarak genelde aydınlık-karanlık döngüsü kullanılır (Roenneberg ve ark., 2013; Ashton ve ark., 2022).

Sirkadiyen saat, çevresel farklılıklara uyum sağlanmasına yardımcı olur. Vardiyeli çalışma, jet-lag veya diğer yaşam tarzı değişikliklerine bağlı olarak sirkadiyen ritim bozulduğunda olumsuz sağlık sonuçları ortaya çıkar. Kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve ya metobolik bozukluklar gibi hastalık riskleri artar (Ruan ve ark., 2021).

2.1.1. Merkezi Saat ve Suprakiazmatik Çekirdek

Suprakiazmatik çekirdek (SKÇ), beyinde ön hipotalamusta bulunan ve sirkadiyen ritimin oluşmasını sağlayan ana saattir (Stoynev ve ark., 2021). Yirmi dört saatlik ritimimizi, çevresel bir etki olan aydınlık-karanlık döngüsüne uyarlamaya çalışır. Böylece optimize edilmiş bir ritim elde edilir. SKÇ, uyku uyanıklık döngüsü, sıcaklık ve nöroendokrin sistemi ve istemsiz davranışlar gibi fizyolojik ve davranışsal ritimleri senkronize edilmesini sağlar. SKÇ'nin hipotalamusta bulunan diğer çekirdeklerle de doğrudan bağlantısı bulunmaktadır (Saper ve ark., 2005).

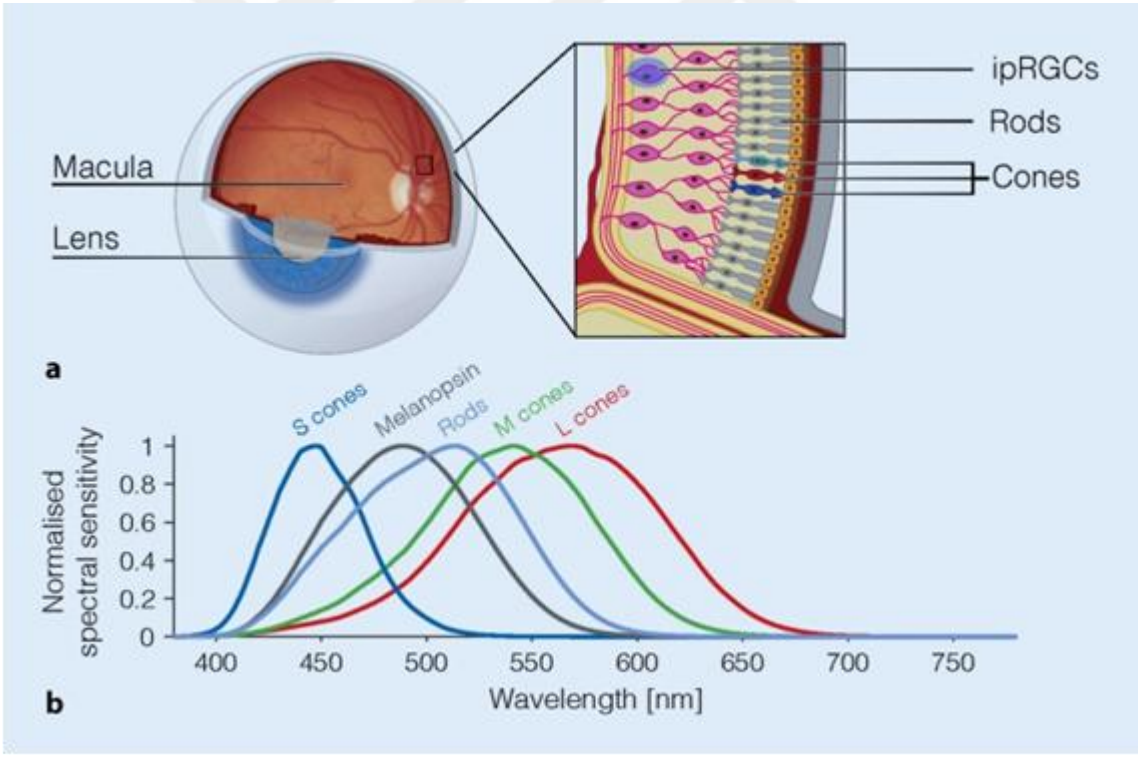
SKÇ, binlerce nörondan meydana geldiği bulunmuştur. Nöronlar da hücrelerden meydana gelmiştir. SKÇ bütün hücrelerin birbiriyle bağlantısını düzenleyerek doğru bir şekilde nörotransmitter salınmasını sağlar (Herzog, 2007). Bu nöronlar 100'den fazla tanımlanmış nörotransmitterlerin, nöropeptidlerin, sitokinlerin, büyüme faktörlerinin salınmasını sağlar (Shan ve ark., 2020). Bu sayede davranış değişiklikleri, beslenme davranışları ve endokrin sistem kontrol edilmiş olur.

Sirkadiyen saat, fotik olan ve fotik olmayan dış uyaranlardan etkilenir ve bu uyaranlara göre ayarlanır. Gün ışığı fotik dış uyaran iken beslenme, stres, sıcaklık değişimi ve egzersiz fotik olmayan dış uyaranlardandır (Tahara ve ark., 2017). Işık, sirkadiyen sistemin senkronizasyonundan sorumlu en önemli faktördür. Yapılan ilk çalışmalarda, fotik olmayan zamanlayıcılar insanlarda sirkadiyen ritimi düzenleyen önemli belirteçlerden olduğu görülmüştür ancak şu anda en önemli gösterge olarak ışık

kabul edilmektedir. Tamamen kör insanlarda yapılan bir çalışma bu görüşü desteklemektedir (Golombek ve Rosenstein, 2010). Tamamen kör olan kişilerin yarısında sirkadiyen ritimi serbest koşu olarak gözlenmiştir ve sirkadiyen ritim çevre şartlarına adapte olmamıştır. Işığın ritimi ayarlama fonksiyonu olmadığı için bu durumun oluştuğu düşünülmektedir (Akıncı ve Orhan, 2016). Ancak fotik olmayan etkenlerden olan egzersizin de sirkadiyen ritimde faz kaymasına neden olabildiği görülmüştür (Thomas ve ark., 2020). Değişen uyku döngüsünde de faz kayması görülmüştür (Misbelger ve Skene, 2005). Yemek zamanı ise periferdeki organları etkileyerek sirkadiyen ritimi etkiler. Merkezi saat üzerinde etkisi bulunmaz (Misbelger ve Skene, 2005). Buna göre, dış zaman veren ipuçlarına bağlı olarak da sirkadiyen ritim düzenlenip hizalanacağı görülür. Bu hizalanmaya sürüklenme denir. Sirkadiyen ritimin en önemli özelliği her koşulda ritmini sürdürebilmesidir. Laboratuvar koşullarında bile herhangi bir dış zaman veren ipucu (sürekli karanlık veya sürekli aydınlık durumda) olmasa bile ritim sürdürülebilmektedir. İfade edilen sirkadiyen ritim de 24 saat boyunca dış ortamdan gelen sinyaller bulunmadığında buna serbest koşu denir. Bunun anlamı ritmin, dış ortamdan herhangi bir uyarımla döngüsünde değişiklik olmayıp senkronize edilmediğidir (Vitaterna ve ark., 2001).

SKÇ için en önemli sinyal ışıktır (Kavaklı ve ark., 2022). SKÇ gelen ışığı retina aracığılıyla doğrudan (retinohipotalamik) alır (Derdante ve Cermakien, 2007). Işık göz tarafından algılanıp retinaya ulaştıktan sonra RHT (retinohipotalamik) yol ile SKÇ'ye iletilir (Hattar ve ark., 2002; Hsu ve Tain., 2020). Retina, gözün arka kısmında bulunan sinir dokusunun ince bir tabakasıdır ve retinada özelleşmiş fotoreseptörler bulunmaktadır. Bu fotoreseptörlerden koni retinanın merkezinde bulunur. Gelen ışığın dalga boyuna göre reseptörler farklı duyarlılık gösterirler. Farklı dalga boylarındaki duyarlılıklarına göre 3 tür koni hücresi vardır. Bunlar uzun dalga boyuna duyarlı L koni hücreleri, orta dalga boyuna duyarlı M koni hücreleri ve kısa dalga boyuna duyarlı S koni hücreleridir. Çubuk hücreleri ise daha çok alacakaranlıkta ve geceleri iletileri almaktadır. Retinada çubuk ve koni fotoreseptörlerin dışında ışığa duyarlı retina ganglion hücreleri bulunur. Işığa duyarlı retina ganglion hücreleri (ipRGC), optik sinirler yardımıyla bilgiyi beyne gönderen ve bilgileri birleştiren fotoreseptördür. İpRGC bu sayede melanopsin fotopigmentinin ifade edilmesini sağlar. Melanopsin kısa dalga boyuna duyarlı bir pigmenttir. Işığın sirkadiyen saate etkisine çoğunlukla bu hücrelerin aracılık ettiği düşünülmektedir (Blume ve ark., 2019). Çubuk ve koni

fotoreseptörlerinden yoksun farelerde, ışığın sirkadiyen cevaplara etkisinin devam ettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir ama melanopsin geninin baskılanmasını takiben sirkadiyen tepkilerde bozulmalar gerçekleşmiştir. Ancak her üç fotopigment (çubuk, koni ve melanopsin) bulunmadığında sirkadiyen tepkilerin tamamen ortadan kalktığı görülmüştür. Bu da çubuk ve koni hücrelerinin ışığa bağlı sirkadiyen tepkilerin oluşmasına katkıda bulunabileceğini göstermektedir (Ashton ve ark., 2022). Yani ışığa duyarlı retina ganglion hücreleri, çubuk ve koni hücrelerinden tamamen bağımsız değildir ve bu reseptörlerinden bilgi alıp bu iletileri geniş dalga boyu aralıklarında ve farklı ışık seviyelerinde birleştirir. Aslında retina ganglion hücreleri gelen bilgilerin bütünleştiricisi olarak adlandırılabilirler (Blume ve ark., 2019). Fotoreseptörlerin gözde bulunduğu kısım, hücrelerin görüntüsü ve fotoreseptörlerin spektral duyarlılıkları (Şekil 2.1) ’de gösterilmiştir.



Şekil 2-1: Retinada bulunan fotoreseptörler - Blume ve ark., 2019’dan.

a) Gözün arka kısmında bulunan çubuk, koni ve ışığa duyarlı retina ganglion hücrelerinin şematik olarak gösterimi. b) Fotoreseptörlerin dalga boyuna göre spektral duyarlılıklarının olarak gösterilmesi.

SKÇ çok sayıda nöron içermektedir ve bu nöronlar birçok nöropeptidin ve nörotransmiterlerin ifade edilmesini sağlamaktadır. Bu nöropeptidlerden iki tanesi

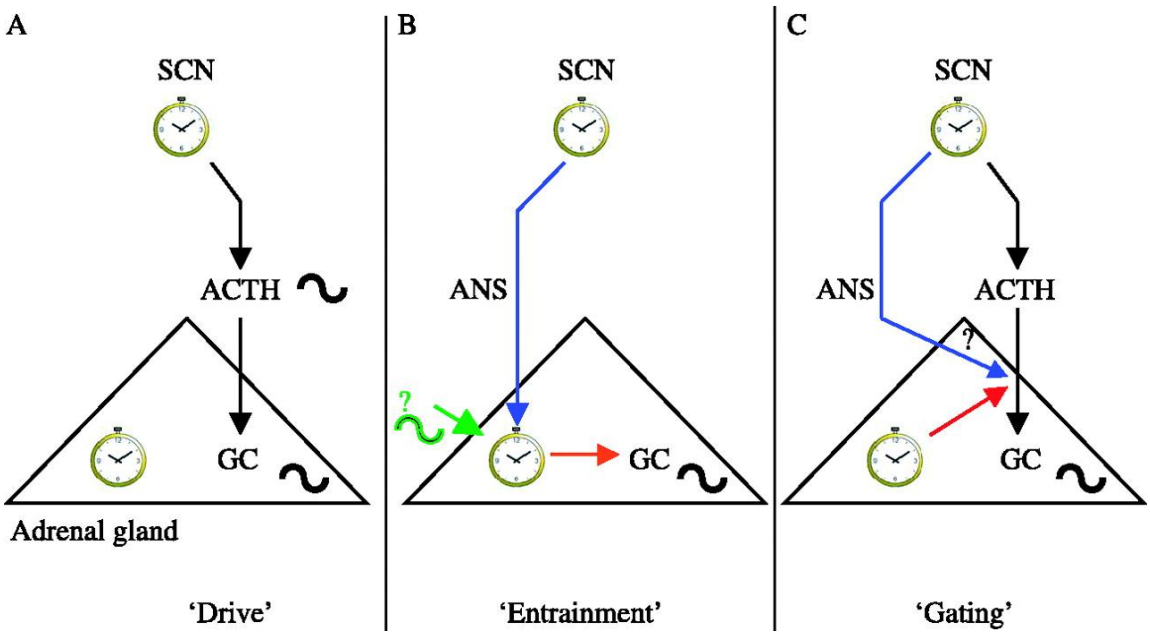
vazoaktif bağırsak peptidi ve vazopressindir. Bu iki peptidin ifade edilmesini sağlayan nöronlar ışığın alınmasıyla birlikte uyarılır ve uyarıyla birlikte sirkadiyen ritimin gün boyunca senkronize edilmesini sağlarlar. Bu yüzden bu iki nöron sirkadiyen sistemdeki fotik olarak uyarılan nöronlar içinde yer alır (Yuan ve ark., 2018).

Parasempatik ve sempatik sistem vücuttaki birçok hormon salan bezleri etkiler ve böylece vücuttaki endokrin bezler otonom sinir sistemi tarafından kontrol edilir. SKÇ nöronlar aracığılıyla hipofiz bezini etkilemektedir. Hipofiz bezinden salınan hormonlar sayesinde sempatik ve parasempatik sistemler kontrol edildiği için otonom sinir sisteminin kontrolündeki bezlerde yapılan salınımlar SKÇ tarafından düzenlenmiş olur ve böylece salınımlar vücudun sirkadiyen ritimi ile uyumlu hale gelmiş olur (Buijs ve ark., 2003). Sempatik sistemden gelen iletiler karaciğer dokusunu etkilemektedir. SKÇ, sempatik sinir sistemini etkiler ve SKÇ'nin sempatik sisteme etkisiyle karaciğerde yapılan glukoz üretimini de artırarak etkilediği görülmüştür. SKÇ ayrıca kasta insülin hormonuna hassasiyeti artırmakta ve kas dokusundaki glukoz seviyesini de etkilemektedir (Mohawk ve ark., 2012; Plano ve ark., 2017). Hormonlar bütün vücuda salınarak etki göstermektedir. Nöronlar ise ilgili reseptörlerinin bulunduğu dokularda gösterirler ancak nöronlar iletilerini tam olarak etkileyeceği dokuya iletmektedir. SKÇ bu iki yöntemi kullandığı çalışmalarda gösterilmiştir. Böylece sirkadiyen ritimi periferdeki bütün dokularda sağlamış olur (Kalsbeek ve ark., 2006).

İki hormonun (kortizol, melatonin) salınımı, SKÇ'nin fonksiyonu açısından önemlidir. Hormonlarla bağlantısı, SKÇ'nin sirkadiyen saati kontrol ettiği ile ilgili bağlantı kurulmasını sağlamıştır. SKÇ, hipotalamusdan kortikoliberin hormonunun salınmasını tetikler ve daha sonra adrenokortikotropik hormonu (ACTH) hipofiz bezinden salınır. Böylece SKÇ adrenal kortekseki hücrelerden kortizolün (GC) salınmasını sağlar. GC hormonu etkisini vücutta yaygın olarak bulunan glukokortikoid reseptörlerine bağlanır (Astiz ve ark., 2019). Bu iletimde sirkadiyen sistem hipofiz bezi arasındaki bağ kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda SKN'den adrenal beze giden birden çok yol olduğu kabul edilmiştir (Astiz ve ark., 2019). SKÇ'nin adrenal bezlere otonom sinir sistemi nöronları sayesinde iletim yaptığı da bulunmuştur. SKÇ'den çıkan nöronlar omurilikteki nöronlarla temasa geçip daha sonra da adrenel bezlerin uyarımını sağlar. Bu yol nöronal yol olarak adlandırılır (Dickmeis, 2009). Diğer bir yolda ise adrenal bezin hassasiyetinin artırılırak kortizol sentezlenir. SKÇ'den ACTH hormonu

salınımı yolu ve nöronların sempatik sistemi etkilemesi olmak üzere her iki yoldan uyarılar geldiğinde böbrek üstü bezininin adrenal hassasiyetinin artırılması sağlanır (Astiz ve ark., 2019).

Kortizol, SKÇ'nin günlük ritimin kontrolünde her iki yolu da kullandığına güzel bir örnektir. (Kalsbeek ve ark., 2006). Kortizol (GC) hormonunun salınmasını sağlayan farklı yollar (Şekil 2.2)'de açıklanmıştır.



Şekil 2-2: Glukokortikoid hormonunun salınım yolları - Dickmeis ve ark., 2009'dan.

Kortizol hormonun sirkadiyen salınımının gerçekleşmesini sağlayan 3 farklı yol gösterilmiştir. a) Hipotalamus-hipofiz bezini etkilenip ACTH'ın salınımı sağlanır. Bu da adrenal bezden kortizol hormonunun salınmasını sağlar. b) Nöronlardan giden uyarılarla otonom sinir sisteminin böbrek üstü bezini etkilemesi ve kortizol hormonunun salınması sağlanır. C) Otonom sinir sistemi ve hipofiz her iki yol aracılığıyla böbrek üstü bezinin ACTH hormonuna duyarlılığı artırılarak daha fazla salınım sağlanır.

SKÇ tarafından nöronal sinyal ile uyarılan epifiz bezi tarafından melatonin üretilir. Epifiz bezi nöronlarla uyarılır ardından hormon üretilip kan dolaşıma salınır (Zisapel, 2018). Karanlık periyotta melatonin salgılanması uyarılır, ışık arttığında ise melatonin sentezi inhibe edilir. Bu sayede melatoninin SKÇ'nin kontrolünde gece gündüz ritmini düzenlemesi sağlanır (Doghramji, 2007). Melatonin hormonu hemen hemen her omurgalıda üretilen bir hormondur. MT1 ve MT2 adında iki tane melatonin reseptörü çeşidi bulunmaktadır. Melatonin hormonunun salınımının etki edeceği bölgede bu reseptörler olduğu gibi hormonun üretimini kontrol eden SKÇ'nin

bulunduğu beyinde de bu iki reseptör bulunmaktadır. MT1 reseptörü daha çok beyinde bulunurken MT2 reseptörü hem beyinde hem de vücudun her alanında dağılmış halde bulunmaktadır (Pevet ve ark., 2017; Pfeffer ve ark., 2022). Melatonin hormonun düzeyleri SKÇ'nin ritmini etkilemektedir. Bu yüzden melatonin agonistleri jet lag veya gece çalışan kişilerde görülen gece-gündüz ritim dengesizliğini düzenlemek için kullanılmıştır (Pfeffer ve ark., 2022). Melatonin agonistleri bozuk olan sirkadiyen ritimin düzenini ayarlamak için nörolojik problemlerde ve uyku bozukluklarında kullanılmıştır. Özellikle dışardan verilen melatonin agonistleri uyku döngüsünün yirmi dört saatlik ritime uygun olarak ayarlanmasını sağlar. Her iki tip reseptöre spesifik ilaçların geliştirilmesiyle tedavide daha çok kullanılabileceği düşünülebilir. Sonuç olarak melatonin agonistlerinin farmakolojik bir ajan olarak tedavide belli endikasyonlarda kullanılabilmektedir (Pevet, 2014; Pevet ve ark., 2017).

Daha önce yapılan çalışmalarda memelilerde, sirkadiyen ritmin SKÇ tarafından düzenlendiği belirlenmiştir. Bununla birlikte SKÇ'nin, periferik dokulardaki sirkadiyen ritimlerin ifadesi için de gerekli olduğu düşünülmektedir. mPer2Luc proteini nakavt olan ve SKÇ'de lezyonu bulunan fareler kullanılarak çalışma yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada, periferik dokular izole edilmiş ve önceki çalışmaların aksine periferik dokuların, çoğu döngüsünü kendi kendine devam ettirebildiği ve sirkadiyen salınımlar yapabildiği görülmüştür. Farklı dokuların her birinde, her dokunun birbirinden oldukça farklı olduğu ve dokularda farklı sirkayen periyodlar ve faz özellikleri olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, mPer2Luc nakavt farelerde, SKÇ'de lezyon bulunduğu için normalde dokularda oluşmaması beklenen sirkadiyen ritimin beklenmedik şekilde periferik dokularda kaybolmadığı tespit edilmiştir. Yani, SKÇ'de lezyon olması halinde beklenilen şekilde sirkadiyen ritimi ortadan kaldırmamış ama farklı dokulardaki fazlar arası aykırılık ve farelerde senkronize olmayan fazlar gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın bulguları SKÇ'nin sirkadiyen ritim üzerindeki rolünün açıklanabilmesine yardımcı olmuştur. SKÇ bütün dokulardaki ritimleri koordine etmekte ve dokulardaki periferik saatler arasında uyum olmasını sağlamaktadır. Sonuç olarak SKÇ periferik salınımları oluşturan hız belirleyici olarak adlandırmak yerine bütün periferik saatlerin ritmik ve uyum içinde çalışmasını sağlayan bir koordinatör olarak adlandırılabilir (Yoo ve ark., 2004).

SKÇ sadece günlük eylemlerin ve fizyolojik durumları etkileyen ritimleri ya da sirkadiyen ritimin kordinasyonunu etkilemez aynı zamanda hormonal salınımları da düzenlediği için vücuttaki hormon seviyelerini de etkilemektedir. Bu hormonlardan bazıları ACTH, melatonin, kortizol, büyüme hormonu, prolaktindir (Mayer - Bernstein ve ark., 1999). Aynı zamanda, sempatik sinir iletimini sağlar. Tiroid bezi, yağ bezleri gibi hormon üreten bezlerin uyarılmasını sağlar. (Bartness ve ark., 2001). Bu yüzden SKÇ, ritmin düzenlemesinin yanında çok sayıda sinir, hormon ve organlar gibi vücuttaki yaygın bir alanı etkilediği için vücudun çoğu fonksiyonda görev almaktadır.

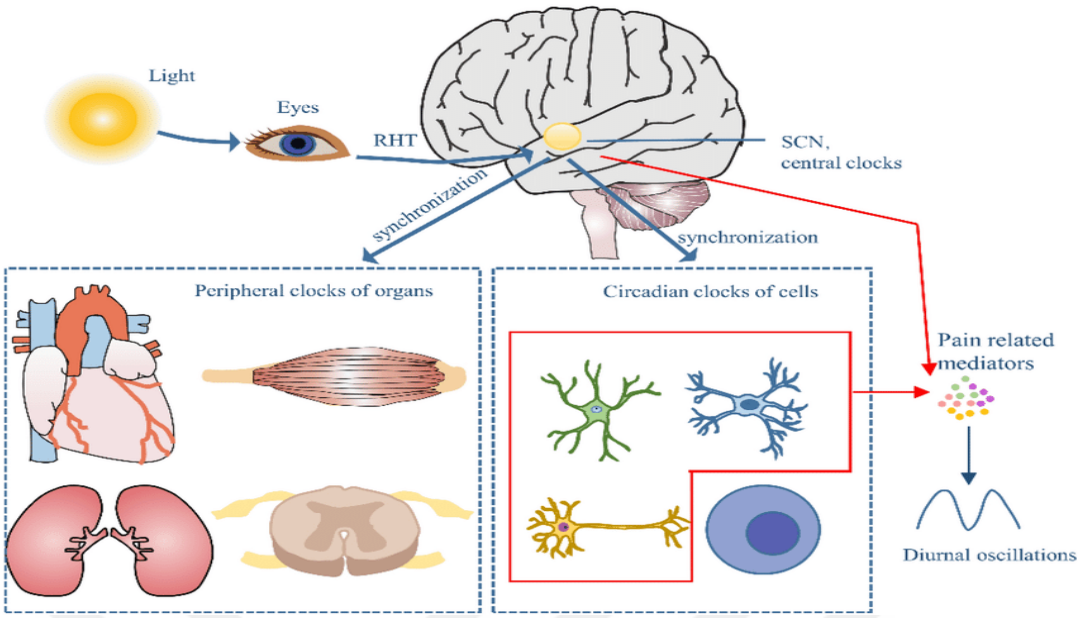
2.1.2. Periferik Saatler

Memelilerde bütün hücrelerde ve dokularda sirkadiyen saat geni bulunduğu görülmüştür. Bunun sonucu olarak üretilen proteinlerin ifadelerinde de belli bir ritim olduğu görülmüştür. Bu ritim kültüre alınan hücrelerde de görüldüğü için SKÇ'in etkisi olmadığında başka hücrelerden de endojen sirkadiyen salınımı yapılabildiğini ortaya çıkarmıştır (Mohawk ve ark., 2012). Merkezi saat, ana saat düzenleyicisi olmasına rağmen periferdeki dokular lokal olarak kendi dokularındaki ritimleri düzenleyebilmektedir. Periferik saatler neredeyse tüm periferik dokularda bulunur. Bağışıklık hücreleri, yağ dokusu, karaciğer ve böbrek dokusu ve vasküler sistem bu dokulardandır (Man ve ark., 2021).

Periferik saatler dokulardaki salınan ritimleri etkileyerek çok sayıdaki önemli fizyolojik fonksiyon düzenlenmesini sağlar. Bu sayede periferik saatler karaciğer, böbrek, ince bağırsak tarafından gerçekleştirilen ksenobiyotik detoksifikasyonunu; karaciğer, kas ve yağ dokusu tarafından karbonhidrat ve lipit metabolizmasının düzenlenmesini; renal plazma akışı, idrar üretimi, kalp atım hızı ve kan basıncı gibi kardiyovasküler sistemin parametreleri de kapsayan kritik fizyolojik fonksiyonları etkilemektedir. Ayrıca karaciğer, kalp ve böbrek üstü bezi üzerinde gerçekleştirilen genom profilleme çalışmalarında pek çok hücresel fonksiyonun sirkadiyen sistem tarafından düzenlendiği sonucuna varılmıştır. Kullanılan dokuya bağlı olarak da tespit edilen tüm genlerin %10'a kadar ritmik olarak ifade edildiği belirlenmiştir. Karaciğer bu konuda en kapsamlı çalışılan organ olmuştur. Bağımsız çalışmalarda karaciğerde 1000'e yakın transkript olduğu tespit edilmiştir. Karaciğerde ritimik olarak ifade edilen bu genler pek çok yolakta yer alan enzimleri kodlayarak fizyolojik olayları etkilemektedir (Dibner ve ark., 2010).

Merkezi ve çevresel saate bağlı salınımların her ikisindeki hücrelerden de otonom salınımlar yapılabilir ve her ikisinde de benzer salınım mekanizmaları bulunmaktadır. Merkezi salınım fonksiyonunu etkileyen genetik mutasyonlar periferik osilatörler üzerinde de benzer etkilere sahiptir (Kowalska ve Brown, 2007). Bazı dokular doğrudan merkezi saat tarafından düzenlenirken bazı dokular ise dokulardaki hücresel saatler tarafından dolaylı olarak düzenlenebilmektedir. Örneğin, fareler sürekli olarak anormal zamanlarda besleniyorsa farelerin karaciğer, böbrek ve diğer organlardaki periferik saatleri sirkadiyen fazlarını yeni beslenme zamanına göre değiştirmektedir. Merkezi saat ise gün ışığına göre senkronizasyon yapmaya devam edecektir. Merkezi saat ve periferik saat arasındaki bu farklılık dış faktörlere uyum sağlayabilme açısından potansiyel bir fayda oluşturmuştur (Brown ve ark., 2011).

Periferik saatlerin lokal doku fizyolojisini düzenlemede anahtar rolü olduğu düşünülmektedir. Periferik saatlerin tanımlanmasıyla birlikte sirkadiyen ritimleri anlamamızda temel bir farklılık oluşmuştur. Bu sayede zamansal organizasyonun hemen hemen tüm hücre, doku ve organların fizyolojisiyle bağlantılı olduğu bulunmuştur (Fisk ve ark., 2018). Merkezi saat ve periferik saatin farklı organ ve hücrelere etkisi (Şekil 2.3)'de gösterilmiştir.



Şekil 2-3: Merkezi saatin periferdeki hücre ve organları senkronize etmesi - Chu ve ark., 2022'den.

Işıktan gelen uyarı gözdeki fotoreseptörleri kullanarak retinohipotalamik yol aracılığıyla SKÇ'ye ulaşır. Merkezi saat bu sayede periferdeki çok sayıdaki organ ve hücrelerin senkronizasyonunu sağlayarak vücuttaki birçok fizyolojik olayı kontrol etmiş olur.

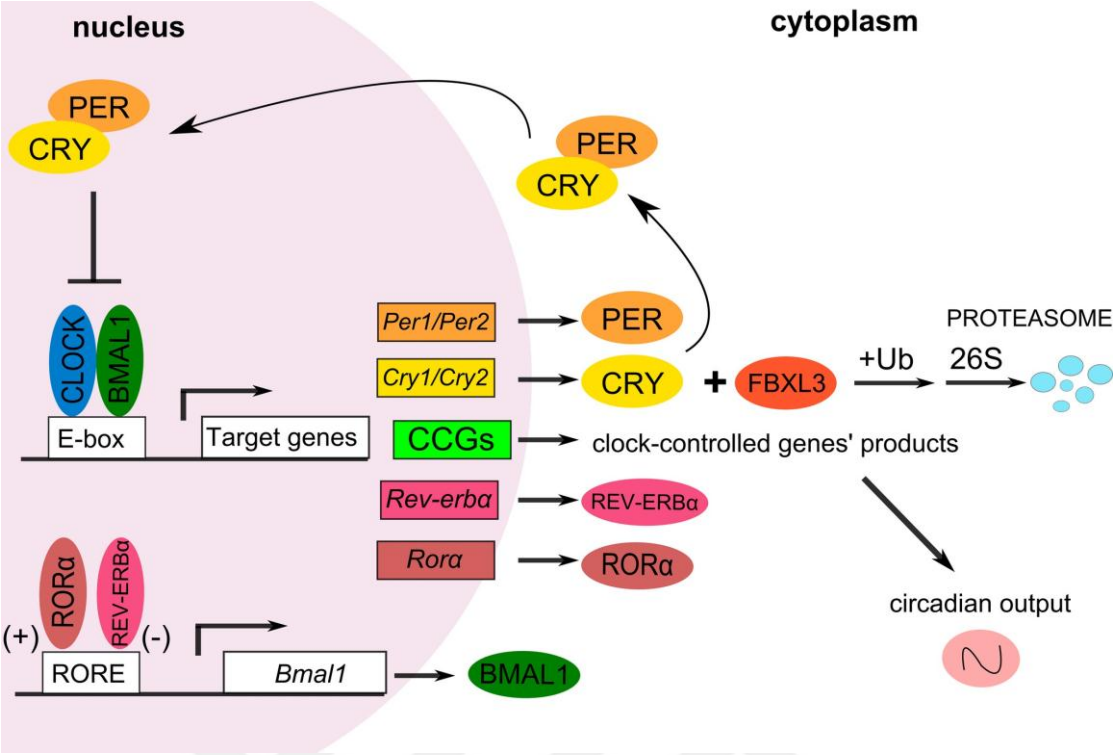
2.2. Moleküler Sistemin Sirkadyen Saate Etkisi

Tek hücreli bir alg olan Chlamydomonas, mantar Neurospora ve Drosophila üzerinde yapılan çalışmalar saat genlerinin keşfedilmesini sağlamıştır. Memeli çekirdek saat geni olan periyod (Per) drosophila mutantlarında yapılan çalışmalarda ilk keşfedilen saat geni olmuştur. Daha sonra genlerin sirkadiyen ritim gösterdiği tespit edilmiş ve Per proteinin, per geninin ifade edilmesini sağladığı bulunmuştur. Araştırıcılar tarafından Drosophilada yapılan çalışmaları takiben ileri genetik izleme çalışmalarıyla Circadian locomotor output cycles kaput (Clock) geni farelerde bulunmuştur (Badiu, 2003; Cox ve Takahashi, 2019).

Memelilerde sirkadiyen saat; pozitif ve negatif faktörleri, feedback mekanizmaları ve sirkadiyen saatleri kodlayan genleri içeren bir düzenleyicidir. Sirkadiyen saatin yolakları arasında bulunan transkripsiyon geri besleme döngüsü (TTFL), memeli sirkadiyen saatinin düzenlenmesinde esas alınır (Lui ve ark., 2007; Ye ve ark., 2014). Moleküler saat mekanizmasında birbirine bağlı transkripsiyon geri besleme döngüleri (TTFL) bulunur ve TTFL yolakları, ritmik ifade edilme durumunu yaklaşık 24 saat boyunca kontrol eder (Mteyrek ve ark., 2017). Sirkadiyen salınımlar

transkripsiyonel olarak oluşurlar ve sirkadiyen salınımlar oluştuktan sonra transkripsiyonel geri besleme döngüleri bir pozitif yani aktive edici tarafı ve bir de negatif yönde düzenleyici tarafı içermektedir ve salınımların düzenlenmesini sağlamaktadır. Dört adet ana saat geni bulunmaktadır bunlardan Brain-muscle-arnt-like 117 protein 1 (BMAL1) ve CLOCK iki temel transkripsiyon faktörüdür. BMAL1, CLOCK ve Nöronal PAS protein 2 (NPAS2) geri bildirim döngülerinin pozitif tarafını oluştururken Per ve kriptokrom (Cry) proteinleri negatif tarafını oluşturur. (Levi ve Schibler, 2007; Öztürk ve ark., 2017). Özellikle CLOCK-BMAL1 ve NPAS2-BMAL1 protein dimerleri, moleküler saatin negatif kolu alarak adlandırılan Cry ve Per saat genlerinin transkripsiyonunu aktive ettiği için bu dimerler moleküler saatler içinde çok önemli bir rol üstlenmiştir (Levi ve ark., 2010). Oluşan BMAL1-CLOCK protein dimeri, hedef genlerin promotor bölgelerini içeren E-kutusuna bağlanır ve böylece Per saat geninin üç alt türünün (Per1, Per2, Per3) ve Cry saat geninin iki alt türünün (Cry1, Cry2)'nin ifadesini sağlar. İfade edilen Per ve Cry saat proteinleri, kazein kinaz enzimi ile etkileşime girmektedir. Daha sonrada Per ve Cry, sitoplazmadan hücrenin çekirdeğine ulaşarak BMAL1-CLOCK protein dimerlerinin DNA'dan ayrılmasını sağlar ve böylece hedef genlerin aktive edilmesini baskılamış olurlar. Yani, Per ve Cry proteinleri, BMAL1-CLOCK protein dimeri tarafından yapılan transripsiyonun negatif düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır (Langmesser ve ark., 2008; Gül ve ark., 2022; Koch ve ark., 2022). Bazı çalışmalarda, BMAL1 proteinin seviyeleri gündüz yüksek, gece ise düşük seviyede seyrettiği bulunmuştur. Ancak BMAL1 proteinin geceleri pik seviyede, sabaha doğru ışık ile temas sonrasında hızla seviyesinin düştüğünü gösteren çalışmalar da vardır. Clock proteinin ise 24 saatlik döngüde stabil seviyeler gösterdiği bulunmuştur. Farelerde yapılan çalışmalarda, BMAL1-CLOCK proteinlerinin dimer oluşturup aktive edilmesinin gündüz meydana geldiği bulunmuştur. Dolayısıyla Per ve Cry genleri öğleden sonra ifade edilmeye başlanır. Baskılayıcı olarak bilinen Per ve Cry genleri, öğleden sonra ifade edilmesinin ardından gün sonunda zirveye ulaşmaktadır. Per ve Cry genleri geceleri hücre çekirdeğine ulaşarak BMAL1-CLOCK dimer proteinini baskılarlar. Böylece Per ve Cry proteinleri kendi transkripsiyonlarını baskılamış olurlar. Transkripsiyonlarının baskılanması sonucu Per ve Cry proteinlerinin seviyeleri sabah saatlerinde hızlı bir şekilde düşer. Per ve Cry genlerinin kazein kinaz enzimiyle olduğu kadar kendi aralarında da etkileşimleri bulunmaktadır (Richter ve ark.,2004; Takahashi, 2017; Tartour ve Padmanabhan, 2022).

İkinci feedback mekanizması, nükleer reseptörler olan REV-ERB ve ROR reseptörlerinin faaliyetlerinden oluşur. Rev-Erb α ve β nükleer reseptör proteinleri (REV-ERBα ve REV- ERBβ), BMAL1 transkripsiyonunu bastırırken ROR proteinleri BMAL1 transkripsiyonunu aktive ederler (Doruk ve ark., 2020, Morris ve ark., 2020). Nükleer reseptörlerden REV-ERBα ve onun yakın homologu REV-ERBβ, heme bağımlı transkripsiyonel baskılayıcılar olarak adlandırılırlar. REV-ERBα ve REV-ERBβ nükleer reseptörleri sırasıyla NR1D1 ve NR1D2 genleri tarafından kodlanmaktadır. (Zhao ve ark., 2014; Zou ve ark., 2020; Preitner ve ark., 2002). REV-ERB proteinleri, RORE (Retinoik asid ilişkili bağlayıcı element) olarak adlandırılan DNA bağlanma bölgesine bağlanırlar. ROR (retinoik asit ile ilişkili yetim reseptörler) de aynı bölgeye bağlandığından bu bölge için birbirleriyle rekabet etmektedirler (Zhao ve ark., 2014; Dallman ve ark.,2014). BMAL1- CLOCK dimer proteini, Cry, Per proteinlerindeki gibi genlerin E-kutusu dizisine bağlanarak REV-ERB proteinlerinde de transkripsiyonlarının aktivasyonunu sağlar. Proteinlerin transkripsiyonundan sonra REV-ERBα proteini sitoplazmadan çekirdeğe geçerek BMAL1 ve Cry genlerinin transripsiyonun baskılanmasını sağlamaktadır (Fu ve Lee, 2003). REV-ERB proteinleri sirkadiyen saat üzerindeki önemli moleküler işlevinin yanında zamanlama sistemindeki periyot uzunluğu belirlenmesini de sağlamaktadır (Preitner ve ark., 2002). Moleküler saatin düzenlenmesinden sorumlu tüm genler, sirkadiyen saat sisteminin oluşmasından sorumlu moleküler düzeydeki sistem ve mekanizmalar (Şekil 2.4)'de özetlenerek gösterilmiştir.



Şekil 2-4: Moleküler saatin mekanizmasının şekil üzerinde gösterilmesi - Kavaklı ve ark., 2017'den.

BMAL1-CLOCK yapısı DNA'ya bağlanarak Cry, Per, Rev-erb ve Ror genlerinin transkripsiyonunu gerçekleştirir. Transkripsiyonu yapılan proteinlerden Cry ve Per sitoplazmadan hücrenin çekirdeğine geçerek BMAL1-CLOCK transkripsiyonunu baskılamaktadır. Rev-erb ve Ror proteinleri Rore bölgesine bağlanırlar. Rev-erb BMAL1-CLOCK transkripsiyonunu baskılarken Ror ise kompleksin transkripsiyonunu aktive eder. Per ve Cry proteinleri fosforile edildikten sonra proteozam yolak ile parçalanır.

Sirkadiyen saat sisteminin transkripsiyon sonrası düzenlenmesi bazı posttranskripsiyonel modifikasyonlarla gerçekleşir. Bu düzenlemeler saat genlerinin transkripsiyonlarıyla uyumlu olarak yürütülür. Per protein seviyesinin düzenlenmesinde kazein kinaz 1 alfa ve kazein kinaz epsilon (CK1δ, CKε)'nun biyokimyasal rolü vardır. β-Transdusin içeren protein (β-TrCP), bir F-kutusu proteinidir ve ubikuitin ligaz kompleksi (SCF) ve E3 übikinasyon ligaz kompleksinin bağlayıcı bir birimidir. CK1δ ve CKε, birçok noktada mPER proteinlerine bağlanır ve β-TrCP proteinin bağlanabilmesi için bir tanınma bölgesi oluşturur. β-TrCP bağlanması ile fosforilasyon gerçekleşir. Fosforilasyonun bir ubikütin ligaz tarafından tanınmayı kolaylaştırdığı düşünülmektedir ve fosforilasyon gerçekleştikten sonra Cry proteini bir ubikütin kinaz aracılığıyla proteozom yolak ile bozunmaya hazır hale gelir. Yapılan bir çalışmada CKε fosforilasyon bölgesinde bir nokta mutasyonu görüldüğünde sirkadiyen periyod süresi önemli ölçüde kısalır. Yapılan çalışmalardan edinilen bilgilere göre CKε aktivitesi

azaldığında da sirkadiyen periyod uzunluğu kısalmaktadır (Eide ve ark., 2005; Hirano ve ark., 2013; Eng ve ark., 2017). Yapılan çalışmalarda, Cry proteininin fosforilasyonunun AMP ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) aracılığıyla gerçekleştiği belirlenmiştir. Fosforilasyonun ardından, Cry proteinlerinin stabilizasyonu bozularak yıkılır (Lamia ve ark., 2019; Yoo ve ark., 2013).

Sirkadiyen saat ile ilişkili bazı transkripsiyon faktörleri ve proteinler tanımlanmıştır. Bu faktörler sirkadiyen saat ritiminin sürmesi için zorunlu değildirler ama Proline-acidic amino acid-rich basic leucine zipper (PAR bZip) transkripsiyon faktörleri ve içerdiği proteinler sirkadiyen saat mekanizmasıyla ilişkilidir. BMAL1-CLOCK protein kompleks dimeri, prolin acidic-rich basic leucine zipper (PAR-bzip) transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonunu düzenlemektedir. Tirotrop embriyonik faktörü (TEF), Hepatik lösemi faktörü (HLF) ve albümin D-bağlayıcı protein (DBP) proteinleri PAR bZip transkripsiyon faktörü ailesi içinde yer alır. Bu ailede bulunan bu üç protein de ilaçların metabolizma reaksiyonlarında, detoksifikasyon metabolizmasını düzenleyen proteinlerin ekspresyonlarını sağlar. PAR bZip transkripsiyon faktörü ayrıca ilaç metabolizması özellikle faz 1, faz 2 kısmında görev alan çok sayıda genin transkripsiyonunun düzenlenmesini sağlamaktadır. Detoksifikasyon metabolizmasındaki bu görevi nedeniyle yapılan çalışmalarda bu proteinlerin nakavt olduğu farelerin antikanser ilaçların zararlı etkilerine karşı hassas olduğu görülmüştür. Ayrıca PAR bZip, ilaç metabolizmasında yer alan nükleer reseptörlerden konstitutif androstan reseptörü (CAR) ve aril hidrokarbon reseptörlerinin sirkadiyen ekspresyonlarını düzenlemektedir (Levi ve ark., 2010; Öztürk ve ark., 2017; Gül, 2019).

2.3. Moleküler Genlerdeki Değişimlerin Fizyolojik Sisteme Etkisi

Sirkadiyen sistemin doğru bir şekilde fonksiyon göstermesi hücresel, psikolojik ve fizyolojik süreçlerin devamı için oldukça önemlidir. Sirkadiyen ritim işleyişinin bozulması ile çeşitli patolojilerin başlangıç ve ilerlemesi arasında ilişki olduğu bulunmuştur. Sirkadiyen ritmin bozulması uyku-uyanıklık döngüsünün değişimi, çevresel faktörlerin değişimi (ışık karanlık döngüsü, mevsim değişimleri, gün uzunluğu) ya da merkezi ve periferik ritimlerin doğrudan etkisiyle gerçekleşebilir (Baron ve Reid, 2014; Farhud ve Aryan 2018; Yalçın ve ark., 2022). Endojen ritimlerin bozulması; obezite, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kanser gibi önemli hastalıkların görülme

sıklığının artmasına neden olduğu belirlenmiştir (Farhud ve Aryan 2018; Bae ve ark., 2019).

Meme kanseri, artan morbidite ve mortalite ile kendini gösteren bir hastalıktır. Yapılan bazı çalışmalarda, hastalığın nedenlerinden birinin geceleri ışığa maruz kalmanın neden olduğu sirkadiyen ritim bozuklukları olduğu gösterilmiştir (Lesicka ve ark., 2016). Bunun gece melatonin üretiminin baskılanması, sirkadiyen ritmi oluşturan genlerin ekspresyonlarının değişmesi ve hormon seviyelerindeki değişimler gibi birbiriyle ilişkili bir dizi biyolojik mekanizma yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir (Ritonja ve ark., 2019). Yapılan çalışmalarda aynı zamanda kanda da sirkadiyen genlerin ifadelerinin değiştiği gözlemlenmiştir. Bu değişiklikler özellikle de gece vardiyalı çalışan kadınlarda meme tümör dokusunda ve kandaki lökosit hücrelerinde gözlemlenmiştir (Lesicka ve ark., 2016). 2007 yılında, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC), yapılan çalışmalarda ulaşılan bu sonuçlara dayanılarak sirkadiyen ritimin bozulmasına etkisi nedeniyle gece vardiyalı çalışmayı olası kanserojen olarak (Grup 2A) sınıflandırmıştır. 2018'de ABD'de Ulusal Toksikoloji Programı gece vardiyalı çalışmayı meme kanseri için bilinen bir kanserojen olarak belirlemiştir (Lin ve Farkas, 2018; Ritonja ve ark., 2019). Melatonin anti-östrojenik etkiye sahip olduğu için gece vardiyasında çalışanların meme, prostat ve endometriyal kanser gibi hormona bağlı kanserlere karşı duyarlılığını arttırabileceği düşünülmektedir (Ritonja ve ark., 2019). Beş yıl süreyle gece vardiyalı çalışan bir grup üzerinde yapılan çalışmada prostat kanseri riskinde anlamlı bir artış olduğu belirtilmiş ve sirkadiyen ritimin bu şekilde bozulması sonucu prostat kanseri gelişmesi riski arasındaki bağlantı tespit edilmiştir (Rao ve ark., 2015). Ayrıca melatoninin etkisinin hormona bağlı olmayan kanserleri de etkilediği ancak etkilerin daha az belirgin olduğu gözlemlenmiştir (Ritonja ve ark., 2019).

Yapılan ayrı bir çalışmada Tayvanlı 55 meme kanseri kadın vakada Per geninin üç alt türünde (Per1, Per2, Per3) gerçekleşen moleküler değişiklikler analiz edilmiştir. Sonuçlarda, kanserli hücrelerde sağlıklı hücrelere kıyaslandığında %95'den fazla bir oranda üç Per alt geninin de ekspresyonlarında bozulma görülmüştür (Chen ve ark., 2005). İnsanlarda sirkadiyen ritimdeki bozulmalar sadece meme ve prostat kanserleri oluşma riskini artırmaz ayrıca endometriyal, kolon, akciğer, yumurtalık ve hepatosellüler kanser türlerinin oluşmasını da tetiklediği bildirilmiştir. Ayrıca,

radyoterapi ve anti-kanser ilaçların etkinliği ve toksititesi ilacın dozlama zamanı ile de ilişkilidir. Bu yüzden sirkadiyen ritim ve kanser arasındaki bağlantı, kanserin nedenini oluşturabileceği gibi tedavinin optimize edilip tedaviden en yüksek faydanın elde edilmesini de sağlayabilir (Lin ve Farkas, 2018).

Sirkadiyen saat daha önceki bölümlerde açıkladığı üzere gen ekspresyonu etkilediği için sirkadiyen ritimde bozulma veya mutasyonların birçok hastalığa yatkınlığı arttırması beklenen bir sonuçtur. Sürekli karanlıkta, Bmal1 geni nakavt farelerde sirkadiyen ritimlerin tamamen kaybolduğu görülmüştür. Yine ön beyin alınmış farelerde, Bmal1 üretimi çok azaldığı için tam olarak bir sirkadiyen ritim kaybı görülür. Bunun sonucunda sürekli karanlıkta periferik dokularda ise sirkadyen ritm oluşmuş ancak oluşan ritmin senkronize olmadığı görülmüştür. Bmal1, olmaması halinde tam bir sirkadiyen ritim kaybına neden olan tek çekirdek saat genidir. Clock mutasyonu olan farelerde, sirkadiyen saat periyodu yaklaşık 4 saat uzar ve sürekli karaklıkta ritim aritmik hale gelmektedir (Maury ve ark., 2010; İzumo ve ark., 2014). Bmal1 nakavt farelerde glukoz ve trigliseridlerin kana salımında azalma meydana gelir. Bmal1 nakavt farelerde ayrıca insülin seviyesindeki düşmeden dolayı glukoz intoleransı görülür. Karaciğer dokusuna özgü Bmal1 nakavt olduğunda açlık hipoglisemisi gözlenir. Yapılan bir çalışmada da Bmal1 nakavt farelerde kontrol grubuna kıyasla artmış yağ oranı gözlemlenmiştir. Bmal1 yokluğunda yaşlanmanın hızlandığı ve farelerde yaşam süresinin kısaldığı da bulunmuştur. Ayrıca yapılan bir çalışmada da Bmal1 nakavt farelerde saç büyümesinin tetiklendiği tespit edilmiştir. (Shostak, 2012; Sahar ve Corsi, 2012; Yang ve ark., 2016).

Clock mutant farelerde obezite ve hiperfaji oluşması ve düşük enerji harcaması görülmüştür. Ayrıca bu farelerde hiperglisemi ve bunun sonucu olarak hipoinsülinemi gözlenir. Obezite ile ilişkili olan leptin hormonunun kandaki düzeyinin artışı olan hiperleptinemi, lipit metabolizmasının düzensizlik olması sonucu gelişen hiperlipidemi ayrıca karaciğer yağlanması görülür ve bütün bu hastalıklarla karekterize bir metobolik sendrom oluştuğu tespit edilmiştir. Bu farelerde ayrıca hipotalamusta beslenme ve enerji harcamasını düzenleyen nöropeptidleri kodlayan mRNAların ifadelerinde değişiklik belirlenmiştir (Turek ve ark., 2005; Pijut, 2017). Clock geni nakavt olduğunda arteriyal kan basıncı düşmektedir. Böbrek fonksiyonları da etkilenmiş ve daha seyreltilmiş yoğunlukta idrar atılımının gerçekleştiği belirlenmiştir (Sahar ve Corsi, 2012).

Standart diyet ile beslenen ve Cry saat geninin iki alt türü (Cry1, Cry2) nakavt olan farelerde fenotiplerinde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiş ve farelerin kontrol gruplarıyla benzer vücut ağırlıklarında olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda yüksek yağlı diyetle beslenen Cry2 nakavt farelerde de vücut ağırlıklarında herhangi bir değişim olmadığı görülmüştür. Ancak yine yüksek yağlı diyet ile beslenen Cry1 nakavt farelerde kilo alımı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin şekilde azalmıştır. Ancak farelerde gıda alımında azalma olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle Cry1 nakavt farelerde vücut ağırlığındaki azalmanın sebebi enerji harcamasının artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Enerji harcamasındaki artışın ve kilo almaya karşı direnç artışının sebebi olarak sempatik sistemdeki aktivitenin artışı ve böylece yağ dokusunu etkileyip hipermetobolizmayı tetiklemesi gösterilmiştir. Bu sonuçlar Cry saat geninin enerji homeostazının önemli bir düzenleyicisi olduğunu göstermiş ve yalnızca Cry1 nakavt farelerde yağlı diyetle beslenmeye bağlı obeziteye bile direnç oluştuğu gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda da saat genlerinde oluşabilecek mutasyonların sadece alt türlerinin farklı olmasının bile değişimlere sebep olabileceği söylenebilir (Griebel ve ark., 2014). Yapılan ayrı bir çalışmada, Cry2 geninin nakavt olmasının farelerde bazı depresyon türlerinin oluşmasında etkisi olduğu bazı testlerde belirlenmiştir. Cry2 geni nakavt olduğunda amygaladaki saat genleri ve büyüme faktörlerinin etkilenmesi görülen depresyonun sebebi olarak bulunmuştur. Cry saat geninin iki alt türünün de nakavt olduğu farelerde ise dolaşımda yüksek kortizol seviyeleri bulunmuştur. Bu da hipofiz-adrenal bez feedback mekanizmasının baskılanmasının azaldığını göstermektedir (Savalli ve ark., 2015). Cry1 nakavt farelerde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sirkadiyen saat periyodu 1 saat kısalmıştır. Cry2 nakavt farelerde ise kontrol grubuna göre sirkadiyen saat periyodu 1 saat uzamıştır (Ko ve Takahashi, 2006). Yine Cry1 ve Cry2 her ikisinin de nakavt olduğu durumlarda bozulmuş bir şeker metabolizması ve hiperglisemi görülür. Şeker metabolizmasının bozulması ve hiperglisemi diyabetin önemli semptomlarıdır ve bu mutasyonun diyabete yatkınlığı arttırdığı söylenebilir (Sahar ve Corsi, 2012; Pijut 2017).

Per1 nakavt farelerde sirkadiyen saat periyodu kontrol grubuna göre yarım saat kısalmıştır. Per2 nakavt farelerde ise 1,5 saat kısalmıştır ve Per2 nakavt farelerin bazılarında sirkadiyen ritim aritmik hale gelmiştir (Ko ve Takahashi, 2006). Yapılan çalışmalarda Per1 nakavt farelerin gıda alımları aynı olmasına rağmen kontrol grubuna

göre daha az ağırlığa sahip oldukları gözlenmiştir. Aynı şekilde Per2 nakavt farelerin de kontrol gruplarına göre daha az ağırlıkta oldukları görülmüştür. Ancak yüksek yağlı diyet ile beslenen Per2 nakavt farelerin hiperfajik hale geldiği ve kontrol gruplarından daha fazla kilo aldıkları gözlenip farklı bir sonuç elde edilmiştir. Ayrıca Per1/Per2/Per3 üç alt tür nakavt olduğunda yüksek yağlı diyetle beslenen farelerin kontrol gruplarına göre yüksek oranda kilo aldığı gözlemlenmiştir (Shostak, 2012; Fonken 2013). Per1 nakavt farelerde sodyumun idrarda fazla atıldığı görülmüştür. Buna bağlı olarak Per1 saat geninin nakavt olmasıyla düşük tansiyon arasında bağlantı kurulabilir. Per2 nakavt farelerde, glukokortikoid salım ritiminde bozulmalar olduğu gözlenmiş ve ayrıca lipit metabolizmasında da bozulmalar olduğu tespit edilmiştir (Sahar ve Corsi, 2012; Pijut 2017).

Ökaryotlardaki hücre döngüsü G1, S, G2 ve M fazı olmak üzere dört fazdan oluşur ve M fazı sitoplazmanın bölündüğü sitokinezi içermektedir. Hücre döngüsü aşamalarının doğru ilerlemesi, bir sonraki aşamaya geçmeden önce bir önceki aşamanın doğru şekilde tamamlanmasına bağlıdır. Hücre döngüsünde bir sonraki aşamaya geçmeden önce çeşitli hücre döngüsü kontrol noktaları mevcuttur. G1/S bu kontrol noktalarından biridir ve kısıtlama noktası olarak adlandırılır. Oluşan bir mutasyon veya bir yanlış dizilimin kontrol noktalarında tespit edilmesi önemlidir. Çünkü oluşan mutasyon veya yanlış dizilim kontrol noktasında hatalı bir şekilde geçmesi durumunda kanser oluşumuna sebep olabilmektedir. Hücre döngüsünün ilerlemesini sikline bağımlı kinazlar (CDK) ve bunların alt birimleri yönlendirir. CDK aktivitesi, DNA replikasyonunu destekleyerek G1 fazından S fazına geçişi sağlar ve bunun sonucunda hücre bölünmesi indüklenir. (Bertoli ve ark., 2021; Wang, 2021).

Ataxia telangiectasia mutated (ATM), DNA replikasyonu için DNA sarmalının çözülmesiyle aktive olan bir kinazdır. Bu aşamada bir hasar tespit edildiğinde ATM, DNA onarımını ve apoptozu sağlayan p53 proteinini ve CDK2'yi fosforile etmektedir. Bu da kontrol noktalarından biridir ve fosforile edilen p53 proteini tümörü suprese eden etkenlerden birisidir (Shostak, 2017; Kwok ve Stankovic, 2019). Tümör oluşumuna yatkın kişilerin meme bezlerinde veya diğer hücrelerde p53 geninde mutasyon olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca BMAL1 saat geni, p53 tümör baskılayıcı yolağı kontrol ettiği belirlenmiştir. BMAL1 geninin pankreas kanserinde belirlenen antiproliteratif rolünün bu mekanizmayı etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Shostak, 2017).

Yapılan bir çalışmada Per1 ve per2 saat genlerinde eksiklik olan farelerde γ- radyasyonu ile birlikte lenfoma oluşma riski artmış ve apoptoz oranını azaltmıştır. Farelerde Per2 geninin eksikliğinde hücre döngüsünün etkilenmesinin yanı sıra farelerde DNA hasarına cevap veren yollar aracılığıyla yapılan tümör oluşumunu baskılama yeteneği de azalmıştır. Fare karaciğerlerinde Per2 geninde mutasyon görülmesi halinde sonuçlarda beklenenin dört katı fazla oranda karaciğer kanseri tespit edilmiştir. Bir fare tümör modelinde de düzgün çalışmayan Per2 geninin çalışması düzenlendiğinde tümör büyümesini baskıladığı görülmüştür. Bozulmuş Per geninin ifadesinin, hücrelerdeki apoptozun inhibisyonuna ve onkolojik sinyalleşmenin artmasına sebep olduğu görülmüştür ve bu sonuçlar Per geninin hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Per1 ve Per2'nin her ikisinin de azalmış ifadelerinde gliomlar, pankreas kanserleri ve meme kanserleri görüldüğü tespit edilmiştir. Ayrıca, ailesel öyküsü bulunan meme kanseri tümörlerinde sağlıklı meme dokusu ile karşılaştırıldığında Per1 ve Per2 seviyelerinin düşük olduğu görülmüştür. Ailesel meme kanserlerinde tesadüfi vakalarla bile karşılaştırıldığında özellikle Per1 seviyelerinin bu vakalarda düşük olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar ailesel meme kanserinin gelişiminde anormal saat ekspresyonunun önemli olabileceğini göstermiştir ve Per geninin tümör baskılayıcı olarak kullanılabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır (Morgan ve ark., 2019).

Bmal1 geni, sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesinde temel bir faktördür. İnsanlarda Bmal1 geni meme, pankreas, tiroid kanseri gibi birçok kanser türü ile ilişkilendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, Bmal1'in hücre kültürü ve hayvan modellerinde tümör büyümesini baskıladığı görülmüş ve belirli kanser türlerinde tümör oluşumundan sonra Bmal1 seviyesiyesinin azaldığı belirlenmiştir. Akciğer kanserli hücrelerde yapılan bir çalışmada BMAL1 genine müdahale edilerek nakavt hale getirildiğinde hücrelerin, kanser hücrelerinin istilasına karşı daha savunmasız hale geldiği görülmüştür. Aşırı ekspresyonunda ise kanser hücrelerinin istilasının önlendiği gözlemlenmiştir. Ayrıca Bmal1'in kanser hücrelerinin istilasını p53 proteininden bağımsız bir şekilde bastırdığı tespit edilmiştir (Junk ve ark., 2013; Stephenson, 2022). Benzer şekilde, pankreas kanser hücrelerinde de kanserli olmayan kontrol gruplarına göre daha az Bmal1 proteini tespit edilmiştir. Ancak tiroid kanseri ve malign akciğer zarı kanserinde Bmal1 seviyelerinin yüksek olduğu görülmüştür. İnsanlarda Bmal1 geninin endokrin kanserlerle arasında bağlantı bulunduğu tespit edilmesine rağmen Bmal1'in tümör oluşumunda endokrin sistemle bağlantısı henüz ortaya

çıkarılamamıştır. Ancak yumurtalık tümörlerinde, sağlıklı yumurtalık dokusu ile karşılaştırıldığında Per1/2, Cry2, Clock ve Bmal1 genlerinin ifadelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde kronik miyeloid lösemi hastalarında da sağlıklı kontrol gruplarına göre kanlarında bu genlerin azaldığı tespit edilmiştir. Sirkadiyen ritim tarafından ifadeleri düzenlenen çok sayıda genin kanserle ilişkili olduğu görülmüştür. Bütün çalışmalardan çıkarılan sonuç olarak, sirkadiyen ritimde oluşan düzensizliğin tümör oluşumunda ve tümör ilerlemesinde önemli rol aldığı söylenebilir (Morgan ve ark., 2019; Stephenson 2022).

İnsanlarda Clock proteini ise östrojen sinyalleri ve meme kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca kolorektal kanserli hastalardan alınan örneklerin %53'ünde Clock geni mutasyonu bulunmuştur (Morgan ve ark., 2019; Stephenson 2022).

2.3.1. Cry Genindeki Değişimlerin Bazı Önemli Hastalıklardaki Rolü

Baskılayıcı gen olarak bilinen p53 geni kanser vakalarında en sık mutasyona uğradığı tespit edilen gendir. P53 proteini, DNA'da hasarın oluşması gibi bazı sinyaller alınması üzerine aktive olur ve antiproliferatif etki göstererek DNA hasarının ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır. Ayrıca p53 proteini, uzun süreli hasar durumunda biriken mutasyonları azaltmak için apoptotik hücre ölümlerini indüklemektedir. Prof. Dr. Aziz Sancarın grubu tarafından p53 mutasyonun görüldüğü farelerde bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada p53 geni düşürülmüş arka planda bulunan farelerde Cry1 ve Cry2 genleri de düşürülmüştür. Üçlü nakavt geni bulunan farelerde hızlı bir şekilde kanser oluşması beklenirken beklenmedik şekilde farelerde sağ kalım süresinin 1,5 kat kadar arttığı görülmüştür (Öztürk ve ark., 2009; Korkmaz ve ark., 2018; Gül, 2019; Sancar ve Gelder, 2021). Bu çalışma sonucunda Cry1 ve Cry2 proteinlerinin yıkımını sağlayacak küçük moleküller bulmaya teşvik edici olmuştur çünkü keşfedilecek moleküllerin p53 mutasyonunun sebep olduğu kanserlere karşı sağkalımı artırıp apoptozu sağlayabileceği hipotezi ortaya çıkmıştır.

Cry'nin kanserden sonra bir diğer önemli hastalık olan diyabet üzerinde de etkisi olabileceği bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda Cry'nin siklik adenozin monofosfat (cAMP) aktivitesini düzenlediği bulunmuştur. Glukagon hormonu kana salındıktan sonra G-proteine bağlı reseptörler aracılığıyla cAMP sinyalini uyarır. Glikojenin yıkımında cAMP aktivitesi etkilidir ve cAMP miktarı arttığında glikojenin yıkımı gerçekleşmektedir. Cry'nin ise cAMP birikimi üzerinde bir inhibitör etkisi olduğu

belirlenmiştir. Sabah saatlerinde Cry proteininin seviyesi yüksek olduğundan dolayı bu inhibitör etki fazla iken gece Cry protein seviyesi azaldığı için inhibitör etki düzeyi de azalmaktadır. Bu inhibitör etkiden dolayı Cry seviyesi arttıkça cAMP düzeyi azalacağından dolayı kandaki glukoz miktarının azalabileceği düşünülmektedir. Cry seviyelerinin kandaki glukoz miktarına etki etmesinin yanında aynı zamanda insülin seviyelerine de etki ettiği bulunmuştur. Cry'nin aşırı ekspresyonunda kandaki insülin seviyesi azalmıştır. Bu sayede Cry1 seviyesi yüksek olduğunda insülin direnci bulunan farelerde insülin direncinin azaldığı ve kan şekerinin düştüğü görülmüştür (Gül, 2019).

Elde edilen bütün verilere göre sirkadiyen saati etkileyen genlerin birçok hastalığın oluşumunda ve tedavisinde etkisi olduğu görülmüştür. Özellikle Cry geni kanser ve tip 2 diyabet gibi iki önemli hastalığın tedavisi ile ilişkilendirilmiştir. Buna göre Cry proteinin kararlılığının artmasının diyabet tedavisinde kullanılabileceği öngürülmüş ve Cry proteinin kararlılığının azalmasının yani bu proteinin yıkımını sağlanmasının ise kanser tedavisinde kullanılabileceği ortaya çıkarılmıştır. Bu yüzden kriptokromların yarı ömrü ve aktivitesini düzenleyerek etkisini gösteren küçük moleküller bulunmaya çalışılmaktadır. Bu moleküllerin kanser ve diyabet tedavisi için kullanılabileceği düşünülmektedir. Bizim de yaptığımız çalışmada kullandığımız M47 molekülü, Cry proteininin yarılanma ömrünü azaltıp yıkımını sağlayarak etkisini göstermektedir ve bu yolla kanser tedavisinde yararlı bir ajan olabileceği düşünülmektedir.

2.4.Toksikoloji Bilimi ve Toksik Etkiler

Toksikoloji kimyasalların biyolojik sistemler üzerindeki olumsuz ya da yan etki olarak adlandırılan etkilerini inceleyen multidisipliner bir bilimdir. Toksikoloji ilaçların yan etkileri ve ilaçların hastalar üzerindeki terapötik etkileriyle ilgilenmektedir ve son yıllarda artan üretim faaliyetleri sonucunda endüstride kullanılan kimyasalların insanlara ve çevreye etkileri artmaktadır. Kimyasalların çevreye ve insanlara etkileri de toksikolojinin konuları arasındadır. Toksikoloji biliminin önemli görevlerinden biri de belli standartlardan yararlanarak halk sağlığını bazı olumsuz etkilerden korumaktır. Bu amaçla çok çeşitli kimyasalların toksik etkileri araştırılır ve eğer bu kimyasallarda toksik etki belirlenirse kimyasalın üretimi, kullanımı ve imha edilmesi kontrol altında olmalıdır (Eaton ve Gallagher, 2010).

Canlılar çok çeşitli sentetik ve doğal kaynaklı kimyasallara maruz kalmakta ve bu maruziyet miktarı yıllar içerisinde giderek artmaktadır. Zararlı kimyasallara maruziyetler çevresel temaslar aracılığıyla oluşur ve direkt ve indirekt temaslar nedeniyle bu kimyasallara maruziyet, aylar hatta yılları bulabilen uzun süreler sürebilir. Bu tür maruziyetler düşük dozda ve uzun süreli olduğundan aynı kimyasala kısa süreli ve yüksek doz maruz kalınmasıyla karşılaştırıldığında etki olarak daha farklı sonuçlara sebep olabilmektedir. Bu kronik maruziyet olarak adlandırılan maruziyetlerin etkileri modern toksikolojik yöntemler kullanılarak değerlendirilebilmektedir (Eaton ve Gallagher, 2010; Vandivort ve Eaton, 2014).

2.5. Toksisite Testleri

Toksisite testleri, toksik bir maddenin oluşturabileceği toksik etkilerin sistematik bir şekilde değerlendirilmesidir. Toksisite testleri akut, kronik, subakut ve subkronik testler olmak üzere gruplara ayrılır ve yeni ilaç olma ümidi taşıyan moleküllerin bulunma aşamasında gerçekleştirilmesi gereken rutin testlerdir. İlaçların piyasaya çıkabilmesi için toksisiteleri yönünden yüksek derecede kanıt gerektirdiği için bu araştırmalar birçok ilacın piyasaya çıkmasına engel olarak kabul edilebilir. Ancak bu sayede zararlı ve aynı zamanda etksiz olan ilaçların piyasaya çıkması önlenmiş olur ancak yapılan sıkı kontroller bazı yararlı ajanların onay almamasına sebep olabilir. Örneğin, propulsid piyasa isimli ilacın etkin maddesi olan sisaprid kalp ritmini etkileyerek ölüme sebep olmuştur ve bu sebeple ilaç piyasadan kaldırılmıştır. Ancak bu ilacın serebral palsili hastalarda sindirime destek olmada başarılı olduğu görülmüştür o yüzden bazı durumlarda ciddi toksitlere neden olabilen ilaçlar bile farklı endikasyon ve amaçlarla daha düşük dozlarda kullanılabilir (Vandivort ve Eaton, 2014; Kumar ve ark., 2018; Fischer ve ark., 2020).

Toksisite testleri genellikle deney hayvanları kullanılarak yapılmıştır ve bu testlerde çok çeşitli türler kullanılmıştır. Genellikle tercih edilen türler sıçan ve fare gibi kemirgenlerdir ancak bunun yanında daha büyük türler de (tavşan ve köpek gibi) bazı deneylerde tercih edilmiştir. Ayrıca bazı çalışmalarda bakteriler, bitkiler ve bazı omurgasız hayvanlar da kullanılmıştır. Toksisite testleri önemli faydalar sağlamaktadır ve genellikle hayvanlar üzerinde yapılması tercih edilmektedir. Bu faydalardan bazıları şunlardır: Toksik maddeye maruziyetin ve maruz kalma süresinin rahatlıkla belirlenebilmesi, kolay kontrol edilebilmesi ve eğer hayvanlar sakrifiye edilecekse tüm

dokularda ilacın etkilerini görebilme fırsatı bu faydalar arasında sayılabilir. Ancak son yıllarda, yeni bazı yöntemler de uygulanarak kullanılacak hayvan sayısının düşürülmesi hedeflenmiştir. Bu alternatif yöntemler kullanılacak hayvan sayısını azaltmayı, hayvanların deney sırasındaki refahını artırmayı ve eğer mümkünse deney hayvanı kullanılmadan yerine başka yöntemler kullanılmasını hedeflemektedir (Erkekoğlu ve ark., 2011; Arome ve Chinedo, 2013; Worth, 2019).

2.5.1. Akut Toksisite Testleri

Akut toksisite, madde veya ilacın 24 saat zaman aralığında tek doz veya çoklu doz olarak uygulanmasından sonra aniden ya da kısa süre sonrasında oluşan olumsuz etkilerdir. Akut sistemik toksisite testleri uygulanarak bu olumsuz etkiler değerlendirilir. Akut toksisite testleri bu doza bağımlı olan yan etkileri göstermesi açısından önemlidir. Buna ek olarak, akut toksisite testleri, ölüm insidansı gibi akut toksisitenin en önemli belirteçleri dahil olmak üzere akut toksisite oluştuğunu gösteren bütün bilgileri açığa çıkarması açısından da kritik önemdedir (Chinedu ve ark., 2013). Akut toksisite testlerinin yapılmasındaki amaçlar şu şekilde sıralanabilir:

- Test edilecek maddenin toksisite derecesinin nicel olarak ifade edilmesi, ve diğer toksik maddelerle test maddesinin toksisite yönünden kıyaslayabilmek (Toksik maddenin LD50 değerinin belirlenmesi),
- Toksik maddenin zarar verip hasar oluşturabileceği organların tespit edilebilmek,
- Toksik etkinin geriye dönüştürülebilir olup olmadığını saptayabilmek,
- İnsanlarda tek doz olarak kullanıldığında güvenilir doz aralığını belirleyebilmek
- Kronik toksisite çalışmaları için bilgi sağlamak,
- Oluşabilecek toksisiteye dayanıklı ve duyarlı türleri tespit edebilmek,
- Toksik maddeye temas veya oral olarak alınması sonucu oluşabilecek klinik semptomları tespit etmek ve olası zehirlenme vakalarında doktorların teşhis ve tedavi protokolü oluşturmaları için bilgi sağlamaktır (Eaton ve Gallagher, 2010; Colerangle, 2013; Sass, 2020).

Akut toksisite testleri, LD_{50} (Lethal doz 50) ve ölüm oranı gibi önemli toksisite belirteçleriyle ilişkilidir. Maddenin uygulanmasından sonra gerçekleşebilecek ölümlerin oranı net bir şekilde belirlenmek istenirse bunun için LD_{50} değeri kullanılır. Akut toksisitede önemli bir kriter olan LD_{50}, test edilen maddenin uygulanmasıyla deney hayvanlarının %50'sini öldürdüğü kabul edilen doz olarak tanımlanmaktadır (Walum, 1998; Akhila ve ark., 2007). Trevan 1927 yılında LD_{50} toksisite testlerini ilk olarak yapmıştır. 1970'li yıllara gelindiğinde ise LD_{50} üzerinden yapılan toksisite testleri, ilaçlar ve birçok kimyasal için uygulanması bir zorunluluk haline gelmeye başlamıştır. Bu teste 100'e yakın hayvan kullanılması gereklidir (Botham, 2002).

LD_{50} çalışmalarında deney hayvanlarında genellikle tür olarak fare ve sıçanlar tercih edilir. Çalışmalar her iki cinsiyetde de yapılmaktadır. Bu çalışmalarda, test edilen maddeyi insanların aldığı uygulama yolları daha çok tercih edilmektedir. Dozlama yapıldıktan sonra özellikle ilk 24 saatte hayvanlarda gözlenen değişiklikler ve ölümler dikkatle takip edilir ve ölüm gözlenirse mutlaka kayıt altına alınır. Bu gözlemler 14 gün boyunca devam ettirilir ve farklı dozlarda uygulama yapılan deney hayvanlarında gözlemlenebilecek davranış değişiklikleri ve klinik belirtiler takip edilir. Bu çalışmaların son aşamasında genellikle deney hayvanlarının tümü sakrifiye edilir ve bu aşamada maddenin uygulanmasıyla birlikte etkilenen organlarda oluşabilecek lezyonlar nekropsi yapılarak gözlemlenir. Histopatolojik yöntemler kullanarak da oluşabilecek organ hasarları tespit edilmiş olur. Aynı zamanda hayvanlardan alınan kan ile hematolojik ve biyokimyasal analizler yapılır. Böylece histopatolojik, biyokimyasal, hematolojik analizler ve morfolojik gözlemler yapılmış olur (Walum, 1998; Parasuraman, 2011).

İnsanların kullanabileceği ilaç ve diğer kimyasal maddeler için akut toksisite testleri gereklidir. Çünkü maddelerin toksisitesinin insan kullanımına uygunluğunun değerlendirilmesi gereklidir. Akut toksisite testleri çoğu zaman kimyasal maddelere uygulanan ilk toksisite testleridir. Bu testlerin sonrasında maddenin özelliklerine göre daha ileri testler uygulanabilir (Erhırhıe ve ark., 2017). Akut testlerde sonucu tespit edilen LD_{50} değerlerine göre kimyasalların toksisite dereceleri değerlendirilmektedir. Bu değerlerdirmede kullanılan LD_{50}'nin kritik seviyeleri ve bu değere denk gelen toksisite seviyesi aşağıdaki tabloda (Tablo 2-1)'de gösterilmiştir.

Tablo 2-1: LD_{50} değerlerine göre kimyasalların toksisite seviyeleri - Erhırhıe ve ark. (2017)'den değiştirilerek.

LD_{50} değerleri	Toksisite Seviyesi
5 mg/kg	Çok toksik
5-50 mg/kg	Yüksek Seviyede toksik
50-500 mg/kg	Orta Seviyede toksik
500-5000 mg/kg	Az seviyede toksik
5000-15000 mg/kg	Toksik olmayan
15.000mg/kg	Zararı olmayan

Kimyasal maddenin LD50 değeri 5mg/kg'dan daha küçük bir değerse bu kimyasalın toksisite seviyesi çok toksik olarak adlandırılır. Eğer kimyasal maddenin LD50 değeri 15.000 mg/kg'dan daha büyük bir değerse kimyasal maddenin toksisite seviyesi zararsız olarak adlandırılır. Buna göre, 5-15.000 mg/kg arasındaki LD50 değerlerine sahip kimyasalların toksisite seviyeleri bu tabloyla açıklanmıştır.

2.5.1.1. Klasik Akut Toksisite Testlerine Alternatif Metodlar

OECD (Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü) 1981'de yayınladığı kılavuzda LD_{50} testleriyle ilgili bazı değişiklikler yayınlamıştır. LD_{50} testlerinde kullanılan doz-ölüm eğrisine bu kılavuzda yer verilmemiştir. Bu farklı metodlar sayesinde LD_{50} değerinin belirlendiği testlerde bir tür için test edilmesi gereken yüz deney hayvanına kadar çıkabilen sayı düşürülmüştür. Bu çalışmalarda her bir doz grubunda beş adet deney hayvanı bulunacak şekilde farklı dozlardan oluşan üç adet doz grubu belirlenmektedir. Diğer cinsiyet içinde bu çalışma tekrarlanır. Dozlar daha önce yapılmış çalışmalara bakarak belirlenir. Dozlarda da verilebilecek en yüksek doz 2000 mg/kg olarak belirlenmiştir. Bu çalışma, LD_{50} testlerine yaptığı kısıtlamalardan dolayı limit testi olarak adlandırılmaktadır (Erkekoğlu ve ark., 2011; Walum, 1998).

Limit testi olarak adlandırılan test ile birlikte OECD başka kılavuzlarda yayınlamış ve bu kılavuzlarda klasik akut toksisite testlerinden farklı metodlar belirlemiştir. Bu metodlar sabit doz metodu, akut toksik sınıflandırma metodu ve yukarı-aşağı metodudur. Bu metodlarla testlerde kullanılan deney hayvanı sayısı 5 ila 9 hayvana kadar düşürülmüştür (Strickland ve ark., 2018).

Sabit Doz Metodu: 1984 yılında İngiliz Toksikoloji Derneği akut toksisite testlerine alternatif bir yaklaşım önermiştir. Bu metod yapılan in vivo çalışmalarda denenmiş ve kabul görmüştür. Bunun üzerine 1992 yılında yayınladığı OECD 420 kılavuzuna eklenmiştir. Bu yöntemde 5, 50, 500 ve 2000 mg/kg sabit olarak belirlenmiş dozlardan biri seçilerek ilk doz olarak deney hayvanlarına uygulanır. Bu sabit dozlardan biri seçilerek ilk doz olarak deney hayvanlarına uygulanır. Doz seçiminde toksik

etkilerin gözlemlenebileceği ama ölüme neden olmayacak doz seçilmeye çalışılır. Uygulanan dozda ölüm gözlenirse daha düşük doza geçilerek devam edilir. Eğer hiçbir etki görülmezse de daha yüksek doz uygulanarak deneye devam edilir. Bu yöntemde beş dişi ve beş de erkek olmak üzere on deney hayvanı kullanılır. Doz düzeyleri sadece bir kere uygulanır ve bu yöntemde kullanılan deney hayvanı sayısı 40'ı geçmemelidir. Bu metodda ölüm görülen dozun tespiti hedeflenmemektedir. Uygulanan sabit dozlardan bazılarında toksisite belirtilerinin tespit edilmesi amaçlanmaktadır (OECD, 2001; Stallard ve Whitehead, 1995).

Akut Toksik Sınıflandırma Metodu: İlk haliyle 1996 yılında yayınlanmış olan akut toksik sınıflandırma metodu OECD 423 kılavuzunda açıklanmıştır. Bu metodda uygulanan her doz için aynı cinsiyetten üç deney hayvan kullanılır. Dozlama yapıldıktan sonra üç hayvanda görülen ölüm sayısına göre diğer doza geçilir. Doz uygulandıktan sonra hayvanlarda ikiden fazla ölüm görülürse daha düşük doza geçilirken ikiden az ölüm görülürse daha yüksek doza geçilir. Yüksek ya da düşük dozlarda ekstra üç hayvan daha kullanılır. Bu testin amacı kimyasal maddeleri toksisiteleri açısından sınıflandırmaktır (OECD, 2001; Walum, 1998).

Yukarı-Aşağı Metodu: Bu metod Dixon ve Mood tarafından 1948 yılında bulunmuştur. Bu metodda başlangıç dozu olarak daha önce yapılmış çalışmalarda belirlenen LD50 değerinden daha düşük bir doz kullanılmalıdır. Eğer çalışma yapılacak madde ile ilgili hiçbir veri yoksa ilk doz olarak 175 mg /kg dozu kullanılabilir. Bir hayvana ilk doz uygulanarak başlanır ve iki doz arasında en az 48 saat beklenir. Bu sürede doz uygulanan hayvanların durumları gözlemlenir. Eğer bu sürede hayvanın öldüğü görülürse bir sonraki hayvana daha düşük doz verilir. Eğer bu sürede hayvanın yaşadığı görülürse bir sonraki hayvana daha yüksek bir doz uygulanır. Test edilen maddenin LD_{50} değerine yaklaşıldığında veya madde için bir güven aralığı tespit edildiğinde test sonlandırılır. Bu metodda testlerde kullanılan deney hayvanı sayısı genellikle dördü geçmemektedir ve testlerde dişi sıçanlar daha çok tercih edilmektedir (OECD, 2008; Cunny ve Hodgson, 2004; Bruce, 1985). Bu testte yaklaşık olarak LD_{50} değerini belirleyebilmek, ölüm oranları hakkında bilgi sahibi olmak ve ilaçların güvenli kullanabileceği doz aralıklarının belirlenmesi amaçlanmaktadır (Cunny ve Hodgson, 2004).

2.5.2. Maksimum Tolere Edilebilir Doz (MTD) Çalışması

MTD dozu deney hayvanlarında mortalite oluşturmayan ancak belirgin derecede toksisiteye neden olabilecek en yüksek doz olarak tanımlanmaktadır. Bir kimyasalın toksisite seviyesi ne kadar yüksek olursa o kimyasalın MTD'si o kadar düşük değerlerde olmaktadır (Berlo ve ark., 2022; Amerikan Ulusal Araştırma Konseyi, 1993). Zhang ve ekibi tarafından Inauhzin molekülü için farelerde MTD çalışması yapmıştır. Inauhzin, p53'ü aktive ettiği için anti-kanser tedavide kullanılması hedeflenen bir moleküldür. Bu çalışma üç adet doz grubu ve bir adet kontrol grubu olmak üzere toplam yirmi dört farede yapılmıştır. Öncesinde dört ayrı doz tek doz olarak uygulanmıştır. Bu sayede ana çalışmadaki dozlar belirlenmeye çalışılmıştır. Molekül beş gün boyunca tek doz olarak farelere i.p yol ile uygulanmıştır. Bu çalışmada analiz yöntemi olarak biyokimyasal, hematolojik, histopatolojik analizler kullanılmıştır. Analizlerin sonucunda elde edilen veriler, mortalite oranları, hayvanların vücut ağırlıklarındaki değişiklikler ve hayvanlarda görülen davranış değişiklikleri değerlendirilmiştir. Bu çalışma ile Inauhzin molekülünün toksik etkileri ve MTD'si belirlenmeye çalışılmıştır (Zhang ve ark., 2015). Çalışmada kullanılan deney planı, MTD çalışmaları için tipik bir örnektir.

Madde veya ilaç, MTD'nin altında bir dozda uygulandığında deney hayvanlarında ölüm görülmesi beklenmemektedir. Vücut ağırlıklarında ise az miktarda düşüş görülebilir. MTD dozu aşıldığında ise mortalite görülebilir ve vücut ağırlıklarında belirgin bir azalmayla birlikte ciddi derecede toksisite belirtileri tespit edilir (Gad, 2014). EPA'nın (Amerika Çevre Koruma Ajansı) belirlediği MTD ile ilgili kriterlere göre, vücut ağırlığındaki azalma miktarı yüzde onu geçtiğinde MTD dozu aşılmış olmaktadır. Bu kriterlere göre aynı zamanda patoloji sonuçlarında görülebilecek lezyonlarda MTD dozunun aşılmış olduğunu göstermektedir (Cunny ve Hodgson, 2004).

MTD genellikle ilaç geliştirme aşamasında faz 1 deneylerinde kullanılmaktadır. Özellikle kanser gibi hastalıkların tedavisinde bu dozun kullanımı tercih edilmektedir. Çünkü ciddi hastalıkların tedavisinde etkili sonucun alınabilmesi için ilaçların genelde yüksek dozda reçete edilmesi tercih edilmektedir. Bu tür hastalıkların dışında kronik hastalıklarda kullanılan ilaçlarda bu doz seviyesi ancak tedavide yarar sağlayacağına

dair bilgi varsa kullanılabilir. Çünkü, yüksek dozların kullanımı ile yan etki görülme olasılığı artmaktadır (Chevret, 2014; Stampfer ve ark., 2019).

Ölüme kadar gidebilen ciddi toksik etkilerin oluşmaması ve bu toksik etkilerin hangi dozdan itibaren görülebileceğinin tespit edilebilmesi çok kritiktir. Toksisite açısından riskli dozların tespit edilebilmesi ve ilaçların güvenli bir aralıkta kullanılabilmesi açısından MTD çalışmaları oldukça önemlidir. Ayrıca MTD çalışmaları kronik testlerde uygulanacak dozların belirlenmesine yardımcı olmaktadır.

2.5.3. Subakut Toksisite Testleri

Subakut toksite testleri genellikle on dört gün uygulanır. Test edilen maddenin uygulama yolu seçilirken insanların daha çok kullandığı uygulama yolu tercih edilir. Bu testlerde tür olarak daha çok fare ve sıçan kullanılır ancak daha büyük türler de (köpek gibi) tercih edilebilir. Üç farklı doz belirlenerek deney hayvanlarına uygulanır. Bu dozlar belirlenirken test edilen madde için daha önce yapılmış LD_{50} çalışmalarından yararlanılır. Sıçanlarda ya da farelerde bu testler uygulanıyorsa bir doz için genellikle bir cinsiyetten on hayvan kullanılır. Eğer köpeklerde bu test uygulanıyorsa genellikle bir dozda bir cinsiyetten dört hayvan kullanılır. Madde uygulandıktan sonra bazı analizler yapılır ve hayvanların klinik durumları değerlendirilir. Deney sonunda hayvanlar sakrifiye edilip ve alınan dokular üzerinde histopatolojik çalışmalar yapılır. Bu test ile uygulanan maddenin toksisite belirtileri tespit edilir ve daha sonra yapılabilecek subkronik ve kronik testler için veri oluşturulur. (Saygı, 2003; Eaton ve Gallagher, 2010).

2.5.4. Subkronik Toksisite Testleri

Subkronik toksisite testleri doksan gün süren testlerdir. Vücutta birikme eğiliminde olduğu düşünülen maddeler için bu test uygulanabilir. Bu tür maddeler akut toksisite oluşturmayabilir ancak bu tür maddelerde kronik toksisite görülme olasılığı çok yüksektir (Saganuwan, 2017).

Subkronik toksisite testleri iki tür üzerinde uygulanır ve uygulama yolu olarak genelde oral yol tercih edilir. Bu testler üç doz olarak uygulanır. Deney sonunda istenen analizler yapılır ve deney hayvanlarında sakrifikasyon gerçekleştirilir (Eaton ve Gallagher, 2010).

Subkronik toksisite testleri, test edilen maddelerin kronik toksisiteleri hakkında fikir verir ve ayrıca maddenin verilmesiyle toksik olarak etkilediği organlar hakkında bilgi verir. Kronik toksisite çalışmaları için de bir ön çalışma sağlamaktadır (Cunny ve Hodgson, 2004).

2.5.5. Kronik Toksisite Testleri

Kronik toksisite testi, toksik etkili maddelerin çok uzun süreli kullanımda ortaya çıkan toksik etkileri değerlendirmek için kullanılan bir toksisite testidir (Saygı, 2003). Bu testler iki tür üzerinde yapılır. Bu türler genellikle biri fare ya da sıçan diğer tür ise köpek olarak tercih edilir (Rang ve Hill, 2013). Madde, hayvanların yemlerine ve suyuna karıştırmak veya hayvanların soluyabileceği gaz olarak verilmektedir. Uygulama yolu olarak gavaj daha az tercih edilir (Cunny ve Hodgson, 2004).

Bu testler yüksek derecede birikme eğilimi gösterebilecek maddeleri ve subkronik çalışmaların yapılma süresi olan 90 günlük sürede tespit edilemeyecek, gecikmiş toksik etkileri belirlemek için yapılır. Kronik testlerde verilecek dozların belirlenmesini yapılan MTD çalışmaları sağlamaktadır (Eaton ve Gallagher, 2010). Seçilen dozlardan biri genellikle belirlenmiş MTD dozudur. Diğer iki dozda ise MTD'den daha düşük olan dozlar seçilir. Yapılan testler sonucunda oluşan toksisitenin analiz edilebilmesi için diğer toksisite testlerinde olduğu gibi biyokimyasal ve hematolojik analizler gerçekleştirilir. Ayrıca, deney hayvanlarının hepsi sakrifiye edilerek histopatolojik analiz yapılır. Bu testlerde, hayvanların bir kısmının deneyin sonu beklenilmeden belirli süre aralıklarında sakrifiye edilmesi de tercih edilebilir (Cunny ve Hodgson, 2004).

İnsanlarda sürekli ilaç kullanımı gerektiren hastalıklarda (hipertansiyon, hipotiroidi, diyabet gibi) kullanılan ilaçların toksitelerinin belirlenmesinde kronik toksisite testlerinin yapılması oldukça önemlidir (Aladağ, 2005).

2.5.6. Diğer Özel Amaçlarla Yapılan Toksisite Testleri

Bu testler; spesifik amaçlara yönelik yapılan toksisite testleridir. Karsinojenite testleri, üreme toksisitesi testleri, teratojenitenin belirlendiği testler, bazı alerji testleri ve spesifik organlar üzerine yapılan toksisite testleri belli bir amaca yönelik yapılan toksisite testleridir (Saygı, 2003).

Karsinojenite testleri kronik testlerde yapılan benzer deney prosedürlerini içerir. Bu testlerde daha fazla sayıda (elliyi aşan) deney hayvanı kullanılır ve testlerin uygulanma süresi kronik toksisite testlerinde olduğu gibi uzundur (Cunny ve Hodgson, 2004). Maddenin kanserojenite seviyesini kategorize etmek için MTD prosedürünün deney hayvanlarında denenmesi son yıllarda yetkililer tarafından talep edilmektedir (Carr ve Kolbye, 1991).

Üreme toksisite testleri, her iki cinsiyet içinde kimyasal maddelerin üreme fonksiyonlarına yapacağı toksik etkilerin değerlendirildiği testlerdir. Bu testlerde deney hayvanı olarak sıçan tercih edilmektedir (Sachana ve Hargreaves, 2012).

2.6. M47 Molekülü

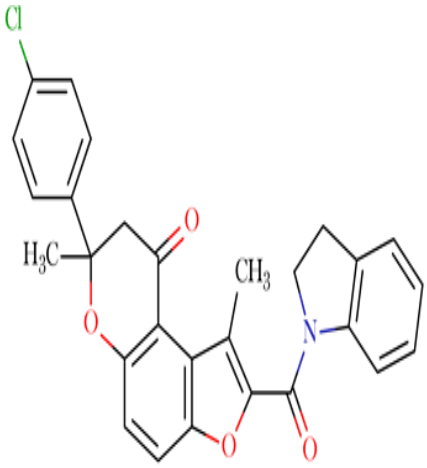
2.6.1. M47 Molekülünün Fizikokimyasal Özellikleri

M47, sarı ve açık sarı renkte bir tozdur. M47, suda çözünmez ve erime noktası 190-194 (°C) aralığındadır. Molekülün kloroformda ve DMSO'de çözündüğü tespit edilmiştir. Moleküler ağırlığı 471 gramdır. M47'nin açık kimyasal adı kimyasal adı 11-(4-klorofenil)-4-(2,3-dihidro-1H-indol-1-karbonil)-3,11-dimetil-5,10-dioksatrisiklo [7.4.0.0,2,6]-trideka-1,3,6,8-tetraen-13-on'dur.

Prof. Dr. Halil Kavaklı ve ekibi tarafından yapılan çalışmalarda M47 ismiyle kullanılmıştır. İlaç olarak veya başka amaçlarla kullanımı herhangi bir sağlık otoritesi tarafından onaylanmamıştır. Yapılacak toksikolojik ve farmakokinetik çalışmalar molekülün etki ve yan etki profilinin tam olarak aydınlatılabilmesi için önem taşımaktadır.

2.6.2. M47'nin Moleküler Formülü

M47'nin moleküler formülü (Şekil 2.5)'de gösterilmiştir.



Şekil 2-5: M47 molekülünün açık kimyasal formülü - Gül ve ark., 2022'den.

2.6.3. M47 ile Yapılan İn Vitro Çalışmalar

M47 molekülü, yapı bazlı ilaç tasarımı kullanarak bulunmuştur. Çalışmalarda Cry1 geninin kristal yapısına göre çok sayıda molekül taranmıştır. Bu çalışmalarda moleküller taranırken osteosarkoma hücrelerinde belirlenen moleküller toksisite ve sirkadyen ritme etkileri açısından denenmiştir. Çalışmalar sırasında sirkadyen periyodun uzunluğuna etki edebilecek çok sayıda molekül tespit edilmiştir. Fibroblast hücrelerinde her iki alt tür Cry nakavt olduğunda M47'nin etki göstermediği ortaya konulmuştur. Yine belirli hücrelere M47 molekülü verildiğinde Cry1'in yarılanma ömrünü verilen doza bağlı olarak azalttığı, Cry2'nin ise yarılanma ömründe herhangi bir değişiklik oluşturmadığı görülmüştür. Böylece M47 molekülünün Cry1 spesifik olarak bağlanıp etkisini gösterdiği kanıtlanmıştır. İn vitro çalışmalarda M47'nin Cry1'e FAD bağlanma bölgesi üzerinden bağlanması test edilmiştir. Ayrıca M47'nin Cry1 üzerinden degredasyonu sağladığı protein analizleri ile test edilmiş ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında degradasyonun yüksek olduğu kanıtlanmıştır. Sonuç olarak yapılan toksisite çalışmaları ve analizlerle taranan iki milyon molekül arasından en uygun molekül adayının M47 olduğu belirlenmiştir (Gül, 2019; Gül ve ark., 2022).

2.6.4. M47 ile Yapılan İn Vivo Çalışmalar

P53 geni tümör baskılayıcı faktör olarak adlandırılmaktadır ve P53 geninde bir mutasyon görülmesi durumunda hücrelerde kanser görülme riski artmaktadır. Ancak Prof. Dr. Aziz Sancar ve grubu tarafından yapılan araştırmada, P53 mutasyonu görülen

farelerde Cry geni de nakavt olduğunda beklenilenin aksine kanserli hastalarda sağ kalım süresinin arttığı gözlenmiştir (Öztürk ve ark., 2009).

Yapılan başka bir çalışmasa p53 nakavt olan farelerde gerçekleştirilmiştir. 50 mg/kg dozda M47 i.p olarak p53 nakavt olan farelere uygulanmış ve M47'nin p53 nakavt farelerde ortalama yaşam süresine etkisi gösterilmek istenmiştir. M47 ile tedavi edilen p53 nakavt farelerin ortalama yaşam ömrünün 29,5 hafta, p53 nakavt olan farelerin ise ortalama yaşam ömrünün 24 hafta olduğu bulunmuştur. Buna göre M47 uygulamasının p53 nakavt farelerde hayatta kalma oranını arttırdığı tespit edilmiştir. Karaciğer hücrelerinde M47'nin etkisinin denendiği bir başka çalışmada M47 uygulanan fare karaciğer hücrelerinde Cry1 düzeylerinde azalma olduğu görülmüştür. Ayrıca oksaliplatin ile kullanıldığında ilacın antikanser etkinliğini artırdığı bulunmuştur (Gül ve ark., 2022). Bu sonuçlardan yola çıkılarak Cry proteinin kararlılığını azaltan moleküllerin keşfi doğrultusunda çalışmalar yapılmıştır. M47 molekülünün P53 mutasyonunun görüldüğü kanserlerin tedavisinde ilaç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. (Gül, 2019).

2.6.5. M47 Molekülünde Yapılan Farmakokinetik ve Toksikolojik Çalışmalar

2.6.5.1. M47'nin Deney Hayvanlarındaki Farmakokinetineği

Dişi farelerde yapılan bir çalışmayla M47'nin farmakokinetik parametreleri belirlenmiştir. Yapılan çalışmada, M47 molekülü 100 mg/kg dozu bir kez uygulandıktan sonra deney hayvanlarından belirli saatlerde kan alınmıştır. Alınan kanlar çeşitli prosedürlerden geçirildikten sonra analitik yöntemler kullanılarak analiz edilmiştir. M47'nin yarılanma ömrünün yaklaşık olarak 6 saat olduğu belirlenmiştir. $AUC_{0-\infty}$ değeri 4926 ng.sa/ml bulunmuştur. M47'nin kandaki maksimum konstrasyonuna ulaşması için gereken sürenin (t_{maks}) 2-4 saatleri arasında olduğu bulunmuştur. M47'nin kandaki maksimum konstrasyonu 1150.5 ng/ml, eliminasyon sabiti ise (k_{el}) 0.127 1/saat olarak hesaplanmıştır. Ayrıca bu çalışmada M47'nin SSS'ye geçip geçemediği beyin dokusunda incelenmiştir. Uygulama yapıldıktan sonra aynı prosedür izlenerek beyin dokusundan kan alınarak analiz edilmiştir. Analiz sonucunda beyin dokusunda M47 molekülünün konsantrasyonu saptanmıştır. Sonuç olarak M47 molekülü kan-beyin bariyerini geçebildiği tespit edilmiştir (Gül, 2022).

2.6.5.2. M47'nin Deney Hayvanlarındaki Toksisite Profili

M47'nin toksisite seviyesini ölçebilmek için farelerde bir çalışma yapılmıştır. Fareler dört doz grubuna ayrılmış ve her bir gruptaki farelere bu dört dozdan biri i.p yolla ve tek seferde uygulanmıştır. 1000 mg/kg yüksek doz uygulanan hayvanlarda; hipotermi, nefes alma güçlüğü, lokomotor aktivitede azalma ve kambur duruş gibi ciddi toksisite semptomları görülmüştür. Daha düşük dozların uygulandığı hayvanlarda herhangi bir olumsuz semptom görülmemiştir. Vücut sıcaklığı ölçümlerinde, 300 mg/kg dozunun uygulanmasını takiben ilk saatlerde vücut sıcaklığında hafif bir düşme olduğu belirlenmiştir. Daha düşük dozların uygulandığı gruplarda ise vücut sıcaklığında anlamlı bir düşüş görülmemiştir. Ayrıca, dozun uygulandığı ilk gün özellikle 300 mg/kg doz grubunda olmak üzere hayvanların canlı vücut ağırlığıklarında kayıp yaşandığı görülmüştür. Sonuç olarak M47'nin farelerde uygulanmasında, hayvanlarda bazı davranış değişiklikleri, vücut ağırlığı ve vücut sıcaklıklarında düşmeler gibi bazı toksisite göstergeleri belirlenmiştir. Benzer toksisite belirtileri aynı çalışmanın 5 gün tekrarlı doz uygulamasında da görülmüştür (Gül, 2022).

2.6.6. M47'nin Genel Toksik Etkilerinin Sınıflandırılması

İş sağlığı ve Güvenliği İdaresi (OSHA), Mart 2018'de maddelerin yapabileceği dermal iritasyon ve toksisite etkilerine göre bazı sınıflandırma kriterleri belirlemiştir. M47 molekülü bu sınıflandırmada 2.kategoride bulunur. Kategori 2 iritasyon derecesinde, uygulamadan sonra en az iki deney hayvanında hiperkeratoz ve pullanma görülebilmektedir (OSHA, 2018). OSHA tarafından Mart 2018'de maddelerin gözde oluşturabileceği toksik etkiler açısından bazı sınıflandırma kriterleri belirlemiştir. M47, bu kriterlere göre sınıflandırıldığında yine 2. kategoride yer almaktadır. Kategori 2 toksisite derecesinde, test edilen üç deney hayvanından ikisinde gözde toksisite görülebilir (OSHA, 2018). OSHA, Mart 2017'de bu sefer tek doz uygulama sonucu hedef organlarda görülebilecek toksitenin sınıflandırabilmesi için bazı kriterler belirlemiştir. Bu kriterlere göre M47 3.kategoride yer almaktadır. Maddenin uygulanmasından kısa bir süre sonra baş dönmesi, uyuşukluk ve solunum yollarında hasar oluşması gibi olumsuz etkilere bakılarak bu derecelendirme yapılmıştır (OSHA, 2017).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Deney Hayvanlarının Seçimi ve Yaşam Koşulları

Çalışmamızda, İÜ Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünde (Aziz Sancar DETAE) Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı'na bağlı Deney Hayvanı Üretim ve Saflaştırma Bölümünden 8 haftalık, 140-180 gram canlı aralığa sahip Wistar soyu dişi sıçanlar kullanılmıştır. Deneysel aşamada, hayvan refahı bakımından türlerine uygun polistiren kafeslerde barındırılan sıçanlara ideal ortam koşulları (21±2ºC sıcaklık, %40-60 bağıl nem ve 40 lükslük ışık şiddeti) sağlanmıştır. Hayvanlar ad libitum tarzda standart pellet yem ve çeşme suyu ile beslenmişlerdir. Deney süresince sıçanlara herhangi bir yem ve su kısıtlaması yapılmayıp, sakrifikasyon işleminin bir saat öncesinde beslenmeleri kesilmiştir. Sıçanlar, 12 saat aydınlık (Light, L) ve 12 saat karanlık (Dark, D) periyodunda tutularak senkronizasyonları sağlanmıştır.

Yapılan deneyler, İ.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) 03.12.2021 tarihli, 2021/38 no.lu kararına uygun olarak ve etik ilkeler doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

3.2. Deneyde Kullanılan Malzeme ve Aletler

3.2.1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

M47: (Enamine, Ukrayna)

DMSO: (Merck, Almanya)

Cremophor EL: (Merck, Almanya)

İzotonik NaCI: (Gifrer, Türkiye)

Ksilen: (İsolab, Türkiye)

Pikrik Asid: (Sigma Aldrich, Almanya)

EDTA içeren Hemogram Tüpleri: 2 ml'lik (BD Vacutainer, ABD)

Sarı Kapaklı Biyokimya Tüpleri: 5 ml'lik (BD Vacutainer, ABD)

Mikro tüpler: 1,5 ml'lik (BD Vacutainer, ABD)

ALT Analiz Kiti: (MVM, Türkiye)

AST Analiz Kiti: (MVM, Türkiye)

Total Biluribin Analiz Kiti: (MVM, Türkiye)

Kreatinin Analiz Kiti: (MVM, Türkiye)

Sevofluran: (Abbvie, Türkiye)

Çözeltinin sıçanlara uygulanabilmesi için 2 ml'lik yeşil enjektörler, Histopatolojik analizleri için ise tespit solüsyonu, alkol, parafin bloğu, lam, lamel, filtre kâğıdından yararlanılmıştır.

Hayvanlara uygulanacak çözeltinin hazırlanabilmesi için spatül, parafilm, otomatik pipet uçları, makas, alüminyum folyo, 15 ml'lik tüpler ve bazı laboratuvar malzemeleri kullanılmıştır.

3.2.2. Deneyde Kullanılan Aletler

Hassas Terazi: Doku ve organ tartılmasında kullanılan (Radwag, Poland)

Hassas Terazi: Çözelti hazırlanmasında kullanılan (Ax200 Shimadzu, Japon)

Terazi: Sıçanların tartılmasında kullanılan (Dikomsan, Türkiye)

Rektal Termometre: (Harvard Apparatus, ABD)

Su Banyosu: (Elektro-Mag, Türkiye)

Girdap Karıştırıcı: Microspin FV-2400 (Biosan, Litvanya)

Otomatik Mikropipetler: 1000 mikrolitre (Eppendorf, Almanya)

Otomatik Mikropipet: 20-200 mikrolitre ve 10-100 mikrolitre (Biohid, Finland)

Cerrahi Aletler: Makas, Pens, Portegü vb. (WPI, ABD)

Santrifüj Cihazı: WF 800 (Nüve, Türkiye)

Analizör (Biyokimya): Vet Test 8008 (MVM, Türkiye)

Analizör (Hemogram): Abacus Junior Vet (Idexx, ABD)

Buzdolabı (+4° C) (Arçelik, Türkiye)

Derin Dondurucu (-20° C) (Arçelik, Türkiye)

3.3. Toksisite Çalışması

3.3.1. M47'nin Çözeltisinin Hazırlanması

Çalışmamızda M47'nin sıçanlara i.p olarak uygulanabilmesi için çözelti şeklinde hazırlanmıştır. İstenilen doza uygun olarak tartılan M47 molekülü üzerine, belli oranlarda saf dimetil sülfoksid (DMSO), Cremophor El (CrEl) ve izotonik NaCl eklenerek çözelti hazırlanmıştır. M47 molekülü sadece izotonik NaCl kullanılarak çözünmediği için diğer çözücülerde çözeltiye eklenmiştir. Bütün doz grupları ve kontrol grubu ayrı tüplerde hazırlanmıştır. Doz gruplarında istenilen doza göre içermesi gereken M47 miktarı ve formülasyonda bulunması gereken çözücü hacimleri (mikrolitre biriminde) deney öncesinde hesaplanmıştır. Formülasyonda bulunan M47 molekülünün gramı, deney hayvanına verilecek doza göre ve hayvanın deney yapılacak günün sabahı ölçülen ağırlığına göre hesaplanmıştır. Deney günü M47 molekülü hassas terazide tartılır ve çözeltinin hazırlanacağı falkon tüpüne aktarılır. Çözelti hazırlanırken çözücülerden ilk önce DMSO otomatik mikropipet ile istenilen hacimde çekilip M47'nin bulunduğu tüpe eklenmiştir. Bu karışım girdap karıştırıcı ile bir dakika boyunca karıştırılmıştır. Üstüne CrEl otomatik pipet ile çekilip aynı tüpe eklenir ve yine girdap karıştırıcı ile karıştırma işlemi yapılır. Daha sonra çözeltinin bulunduğu tüp su banyosunda 30-35° C' de 2-3 dakika bekletilerek çözeltinin iyice çözünmesi sağlanır. En son çözücü olarak NaCl otomatik mikropipet ile istenen hacimde çekilir ve tüpe eklenir. Son olarak yine girdap karıştırıcı ile birkaç dakika karıştırılır. Kontrol grubu M47 içermez. Doz grubuna eklenen çözücüler eklenerek hazırlanır. Kontrol grubu hazırlanmasında M47'nin tartılıp eklenmesi haricinde aynı prosedür takip edilmiş ve ayrı bir tüpte hazırlanmıştır. Bu çözelti deneyin yapılacağı günün sabahında taze olarak hazırlanmıştır. Çökelti oluşmasını engellemek için her uygulamadan önce girdap karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Daha sonra sıçanların ağırlığına göre uygulanacak ilaç miktarı (enjektöre çekilmesi gereken) hesaplanmıştır ve hesaplanan hacimde ilaç enjektöre çekilip hayvanlara i.p olarak uygulanmıştır.

3.3.1.1. Çözelti Hazırlanmasında Yapılan Hesaplamalar

Çözelti hazırlanırken ilk olarak çözeltiyi oluşturan çözücüler ve etkin maddelerin miktarları hesaplanmıştır. Çözelti hazırlanırken 1L çözücüde 1 mg madde çözünecek konsantrasyonda hazırlanmıştır. Doz eskalasyon çalışmasında 10, 25, 100, 250 ve 300 mg/kg dozlar sıçanlar üzerinde denenmiş ve her doz için ayrı hesaplama

yapılmıştır. Örnek olarak 10 mg/kg dozunu hazırlarken, 1000 gram için 10 mg m47 çözünmesi istenir. 120 gram sıçan için orantı kurularak bu değer 2,4 mg olarak bulunur. Çözeltide 1 L çözücüde 1 mg madde olması istendiği için 2,4 ml toplam hacimde çözücüler bulunur. M47 maddesinin çözünebilmesi için çözeltide bulunan çözücülerin yüzdeleri %2,5 DMSO, %15 Cremophor EL ve %82,5 NaCl olmalıdır (Gül, 2019). Toplam hacim olan 2,4 ml bu oranlara göre çözücüler arasında paylaştırılmıştır. Mikropipetler ile çekebilmek için mikrolitreye çevrildiğinde bu hacimler; 60 µl DMSO, 360 µl CrEl ve 1980 µl NaCl olarak bulunmuştur. Uygulamanın yapılacağı gün çözelti hazırlanmadan önce deney gruplarında bulunan sıçanlar tartılmıştır. Standart 120 grama göre hesaplanmış olan M47 miktarı ve çözücü hacimleri, hayvanların o günkü ağırlıklarına göre doğru orantı kurularak hesaplanmıştır. Böylece o gün hazırlanacak toplu çözeltideki miktarlar bulunmuş olur. Diğer dozlarda bulunması gereken m47 miktarı ise 10 mg/kg doz üzerinden orantı kurularak hesaplanmıştır. Her bir doz için ayrı bir tüpte çözeltiler hazırlanmıştır. İstenilen dozda hazırlanmış toplu çözeltiden bir sıçana uygulanacak enjeksiyon hacmi, uygulama yapılacak tek sıçanın ağırlığı üzerinden (hacim sabit olduğu için) oranlanarak bulunmuştur. Bulunan bu değerler tablo haline getirilerek uygulama öncesi hazırlanmıştır. Sıçana i.p yolla yapılan uygulamalarda ideal hacim 5-10 ml/kg, sıçanın alabileceği maksimum hacim ise 20 ml/kg olarak belirlenmiştir (Gad ve ark., 2016). İntraperitoneal uygulamada sıçanlara verilebilecek maksimum hacim miktarı aşılmamıştır. Belirlenen dozlarda M47 her bir enjeksiyonda farklı enjektör kullanılarak sıçanlara uygulanmıştır. Böylece istenen dozda M47 sıçanlara uygulanmış olur. Toplu çözelti hazırlanırken %5 oranında çözelti fazla hazırlanarak enjeksiyon sırasında oluşabilecek kayıplar önlenmiştir.

3.3.2. Doz Eskalasyon Çalışması

M47 molekülü ilk defa sıçanlara uygulanacağı için tolere edilebilir dozu belirlemek için ilk olarak bir doz eskalasyon çalışması yapılmıştır. 10 mg/kg dozunda M47 içeren çözelti iki sıçana i.p enjeksiyon yoluyla verilmiştir. Kontrol grubu olarak bir adet sıçan kullanılmış ve M47 içermeyen basit vehikül karışımı verilmiştir. Diğer gün iki adet sıçana M47 25 mg/kg dozunda, iki adet sıçana da 100 mg/kg dozunda enjeksiyon yoluyla uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak da bir adet sıçan kullanılmıştır. Ertesi gün üç adet sıçana M47 300 mg/kg dozunda i.p yolla verilmiştir. Bu doz için kontrol grubu olarak bir adet sıçan kullanılmıştır. M47, sıçanlara iki ml'lik enjektör

kullanarak uygulanmıştır. Hayvanların klinik durumları ve sıçanlardaki mortalite oranları takip edilerek not alınmış ve buna göre maksimum tolere edilebilir doz çalışması için doz belirlenmesi sağlanmıştır.

3.3.3. Maksimum Tolere Edilebilir Doz (MTD) Çalışması

Çalışmanın ikinci kısmında doz eskalasyon çalışması sonucu belirlenen dozlar kullanılmıştır. Sıçanlar belirlenen dozlara göre 80mg/kg, 120 mg/kg ve 300mg/kg dozu ve kontrol grubu olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. İlk olarak, 80 mg/kg ve 120 mg/kg M47 dozları üçer adet sıçana i.p olarak uygulanmıştır. Kontrol grubunda ise üç adet sıçan kullanılmış ve M47 içermeyen basit vehikül karışımı i.p yolla verilmiştir. Enjeksiyonlar saat 11.00'de olmak üzere beş gün boyunca uygulanmıştır. Uygulamayı takiben aynı gün saat 13.00 ve saat 15.00'de rektal rektal prob (Harvard Apparatus, ABD) aracılığıyla sıçanların vücut sıcaklıkları ve yine aynı gün saat 16.00'da sıçanların vücut ağırlıkları ölçülmüştür. Bu takipler 5 gün boyunca yapılmış ve sonuçlar kaydedilmiştir. Doz eskalasyon çalışmasında olduğu gibi uygulamanın yapıldığı günlerde sıçanlarda klinik durum takip edilmiştir. Hayvanlarda mortalite görüldüğünde kaydedilmiştir.

Deneyin son kısmında M47 300 mg/kg dozu (yüksek doz olarak) beş adet sıçana i.p yolla verilmiştir. Bu doz için kontrol grubundaki iki adet sıçana M47 içermeyen çözücü karışımı i.p yolla uygulanmıştır. Beş gün boyunca düşük dozlarda olduğu gibi yüksek doz grubunda da 13.00 ve 15.00 saatleri itibarıyla rektal prob yardımıyla sıçanların vücut sıcaklıkları, saat 16.00'da ise canlı vücut ağırlıkları ölçülmüştür. Bu aşamada yapılan klinik gözlem, sıçanlarda mortalite durumu, vücut sıcaklığı ve vücut ağırlığı ölçüm sonuçları kaydedilmiştir.

3.4. Sıçanların Sakrifiye Edilmesi

Sıçanlara beş gün M47 uygulaması yapılıp iki gün beklenmiştir. Sekizinci gün MTD çalışmasında kullanılan sıçanların tümü sakrifiye edilmiştir. İşlemin bir saat öncesinde sıçanların pellet yem tüketimine izin verilmemiştir. Doz eskalasyon çalışmasında kullanılan sıçanlarda sakrifikasyon işlemi uygulanmamıştır.

Hayvanların vücut ağırlığı ölçümleri M47 uygulaması yapılmadan önce ve uygulamanın yapıldığı beş gün boyunca aynı saatlerde yapılıp sonuçlar kayıt altına alınmıştır. Aynı şekilde sakrifikasyon yapılmadan önce sıçanların vücut ağırlıkları

ölçülüp kaydedilmiştir. Daha sonra sıçanlar kulak işaretlemelerine bakılarak kafeslerinden alınıp içinde sevofluran anestezik maddesinin bulunduğu kaba aktarılmıştır. Bu kapta 1-2 dk bekletilerek sıçanların anesteziye girmeleri sağlanmıştır. Anestezinin derecesi gözle kontrol edilmiştir. Anestezinin devamlılığı ise prosedürün her aşamasında kontrol edilmiştir. Bütün sıçanlar, sevofluran anestezisi altında toraksları açılıp enjektör yardımıyla kalplerinin sağ ventrikülünden 5-6 ml kan alındıktan sonra sakrifiye edilmiştir. Hematolojik ve biyokimyasal analizlerin yapılabilmesi için gerekli miktarda alınan kan sırasıyla mor kapaklı EDTA içeren hemogram tüplerine ve sarı kapaklı biyokimya tüplerine aktarılmıştır. Tüpler elde yavaş hareketlerle ters-düz edilmiştir. Nekropsi işlemi yapılıp gözlemler kaydedilmiştir. Özellikle karaciğer, böbrek, ince bağırsak, dalak gibi organlarda ve peritonda tespit edilen yaygın beyaz lezyonlar not alınarak kaydedilmiştir. En sonunda histopatolojik analizde kullanılacak olan karaciğer ve böbrek dokuları hassas bir şekilde çıkarılmıştır. Çıkarılan karaciğer ve iki böbreğin ağırlıkları tartılıp kaydedildikten sonra histopatolojik analizlerde kullanılmak üzere uygun koşullarda muhafaza edilmiştir. Daha sonra 300 mg/kg yüksek doz uygulanan altı adet sıçanın da aynı yöntemle sakrifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.5. Kullanılan Analiz Yöntemleri

3.5.1. Biyokimyasal ve Hematolojik Analizler

Biyokimyasal ve hematolojik analizler, Bezmiâlem Vakıf Üniversitesinin Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (DUAM) bağlı Araştırma laboratuvarları ve Deney Hayvanları Laboratuvarı (BEDEHAL) altyapı olanakları dahilinde gerçekleştirilmiştir.

3.5.1.1. Biyokimyasal ve Hematolojik Analizlerde Uygulanan İşlemler

Biyokimyasal analizlerde serum elde edilmesi için santrifüj işlemi yapılmıştır. Biyokimyasal analizlerin gerçekleştirilebilmesi için hayvanlardan alınan kan örneklerinin bulunduğu godeler santrifüj cihazına dengeli bir şekilde yerleştirilerek 1000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj işlemi yapılmıştır. Santrifüj sonucu elde edilen serumlar 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine alınmış ve -80 °C'de derin dondurucuda bekletilmiştir.

Hayvanlardan alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda Aspartat amino transferaz (AST) ve Alanin amino transferaz (ALT) enzimlerinin düzeyleri enzimatik kinetik olarak analiz kitleri (VetTest ALT Alanine amino transferaz 12 test ve VetTest AST Aspartat amino transferaz 12 test, MVM, Türkiye) kullanılarak otoanalizörde (Vet Test 8008, MVM, Türkiye) tayin edilmiştir. Aynı şekilde total bilirubin (VetTest TBIL Total Bilirubin 12 test, MVM, Türkiye) ve kreatinin (VetTest CREA Creatinine 12 test, MVM, Türkiye) düzeyleri de otoanalizör aracılığıyla ölçülmüştür.

Biyokimyasal analizler santrifüj işlemi sonucu elde edilen serumlarda gerçekleştirilmiştir. Biyokimyasal analize analiz kitleri cihaza tek tek tanıtılarak başlanmış ve analiz otoanalizörün kullanım talimatlarına uyularak gerçekleştirilmiştir.

Hematolojik analizler için toplanan kan örnekleri, EDTA'lı mor kapaklı tüplere alınmıştır ve analiz tam kanda uygulanmıştır. Hematolojik analizler, Abacus Junior Vet analizöründe (Idexx, ABD) kulanım talimatlarına uyularak gerçekleştirilmiş ve sonuçlar kayıt altına alınmıştır.

Kullandığımız biyokimyasal analiz cihazı analizleri numunelerde renk değişimi olması ve bu renk değişiminin yoğunluğuna göre değerlerin hesaplanması esasına göre çalışmaktadır. Hemogram sonuçlarında bulunan parametreler (Tablo 3-1) ve biyokimya sonucunda bulunan parametreler (Tablo 3-2) aşağıdaki tablolarda açıklanmıştır.

Tablo 3-1: Hemogram testlerindeki parametreler.

Parametreler	İngilizce Adı	Türkçe Adı	Görevi
WBC	White Blood Cell	Beyaz Kan Hücresi	Bir kan hücresi çeşididir. Vücut savunulmasında görev alır.
LYM	Lymphocyte	Lenfosit	Beyaz kan hücre çeşitlerinden

			biridir.
MONO	Monocyte	Monosit	Beyaz kan hücre çeşitlerinden biridir.
GRA	Granulocyte	Granülosit	Beyaz kan hücre çeşitlerinden biridir.
LY%	Percentage of Lymphocytes	Lenfosit Yüzdesi	Beyaz kan hücre çeşitlerinden biri olan lenfositlerin kanda bulunma yüzdesini verir.
MONO%	Percentage of Monocyte	Monocyte Yüzdesi	Beyaz kan hücre çeşitlerinden biri olan monositlerin kanda bulunma yüzdesini verir.
GR%	Percentage of Granulocyte	Granülosit Yüzdesi	Beyaz kan hücre çeşitlerinden biri olan granülositlerin kanda bulunma yüzdesini verir.
RBC	Erythrocyte (Red blood Cell)	Eritrosit	Dokulara oksijen taşınmasını sağlayan bir kan hücresi çeşididir.
HGB	Hemoglobin	Hemoglobin	Eritrositlerin içinde bulunan oksijenin

			taşınmasını sağlayan bir proteindir.
HCT	Hematocrit	Hematokrit	Kırmızı kan hücrelerinin toplam kan hacmine oranını verir.
MCV	Mean Corpuscular Volume	Ortalama Korpüsküler Hacim	Eritrositlerin ortalama boyutunu gösteren bir değerdir.
MCH	Mean Cell Hemoglobin	Ortalama hücre Hemoglobin	Kırmızı kan hücresi başına içerdiği ortalama hemoglobin miktarını gösterir.
MCHC	Mean Corpuscular hemoglobin concentration	Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu	Kırmızı kan hücresi başına ortalama hemoglobin konsantrasyonunu gösterir.
RDWc	Red Cell Distribution Width	Eritrosit Dağılım Genişliği	Alyuvarlardaki hacim ve büyüklüklerde meydana gelen değişimleri göstermektedir.

PLT	Platelets	Platelet	Kanın pıhtılaşmasında görev alan hücre pulcuklarıdır.
PCT	Procalcitonin	Prokalsitonin	Prokalsitonin vücutta iltihabi reaksiyonların ortaya çıkmasını takiben kanda yükselen peptitlerden biridir.
MPV	Mean Platelet Volume	Ortalama Trombosit Hacmi	Trombositlerin ortalama boyutlarının ölçülmesine dayanan bir değerdir.
PDWc	Platelet Distribution Width	Platelet Dağılım Genişliği	Trombosit boyut farklılığını gösteren bir değerdir. Boyut farklılığı artıkça bu değer yükselir.

Tablo 3-2: Biyokimyasal testlerindeki parametreler.

Parametreler	**Adı**	**İşlevi**
ALT	Alanin Aminotransferaz	Karaciğer hücrelerinde üretilen bir enzimidir.
AST	Aspartat Transaminaz	Karaciğer hücrelerinde üretilen bir enzimidir.

Total Bilirubin	Kanda bulunan Alyuvar hücrelerin yıkılması sonucu ortaya çıkar.	Karaciğer fonksiyonlarında bozulma olursa kanda değeri artan bir proteindir
Kreatinin	Karaciğerde üretimi yapılan bir proteindir.	Böbrek fonksiyonlarında bozulma olursa kanda değeri artan bir proteindir.

3.6. Histopatolojik Analizler

Histopatolojik analiz sırasında dokulara sırasıyla şu işlemler uygulanmaktadır. İlk önce dokular bir tespit (fiksasyon) sıvısına alınır. Dokuların tespit sıvısında bekletilmesindeki amaç hücrelerin ölüm anındaki durumlarında sabitlenmesidir. Deneyimizde sakrifikasyon işleminden hemen sonra sıçandan karaciğer ve böbrek dokuları histolojik incelemeler için dikkatlice alınmıştır. Daha sonra bu dokular Bouin fiksatifinde bir gece boyunca tespit edilmiştir. Örnekler, tespit işlemini takiben %70 oranındaki alkole alınmış ve fiksatifin dokudan çıkarılması için 1-2 hafta süre ile %70 alkolde yıkanmışlardır. Ardından yüksek derecede alkol serisinden geçirilen örnekler ksilolde saydamlaştırılmıştır. Daha sonra örnekler parafinle bloklanmıştır. Sıçanların karaciğer ve böbrek bloklarından Leitz 1212 mikrotomu aracılığıyla 5-6 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Albumin mayerle kaplanmış lamlara yapıştırılan kesitler Hematoksilin ve Eozin (HE) boya maddeleri kullanılarak boyanmıştır. Periyodik asit ve Schiff ayırıcı kullanılarak kesitlerde boyama ayrıca uygulanmıştır (Humason, 1972). Hazırlanan bu ışık mikroskopu preparatlarından Carçal-Zeiss Ultrapod II fotomikroskopu aracılığıyla fotoğraflar çekilmiştir.

Sıçanların karaciğer ve böbrek dokuları cerrahi işlem sonrasında herhangi bir zarara uğratılmadan vücut dışına çıkarılmıştır. Dokuların histopatolojik analizleri İ.Ü Fen Fakültesi Biyoloji bölümünde, Prof. Dr. Engin Kaptan'ın kontrolünde gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde histopatolojik hasar skorlaması yapılarak

M47'ye bağlı oluşabilecek karaciğer ve böbrek hasarlarının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için Graphpad Prism 9.0 programı kullanılmıştır. Çalışmanın sonuçları ortalama±standart sapma (X±SD) olarak verilmiş ve 0.05'in altındaki P değerleri, istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir. Hematolojik parametrelerdeki değişimlerin değerlendirilmesinde ise $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ ve $p<0,0001$ anlamlılık düzeyleri kullanılmıştır. MTD çalışmasında yapılan vücut sıcaklığı ve vücut ağırlığı ölçümlerinin istatistiksel değerlendirilmesinde 1-yönlü ANOVA'yı takiben Bonferronni post hoc test kullanılmıştır. Hematolojik ve biyokimyasal analiz sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesinde 1-yönlü ANOVA'yı takiben Bonferronni post hoc test kullanılmıştır. Histopatolojik analizlerde istatistiksel anlamlılığının değerlendirilmesinde 1-yönlü ANOVA testi kullanılmıştır. 1-yönlü ANOVA testinden sonra grupların kontrol grubuna göre değerlendirilmesinde Dunnet's çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Doz Eskalasyon Çalışması Sonuçları

Bu çalışma için 10, 25, 100 ve 300 mg/kg dozları kullanılmıştır. Dozlar sıçanlara tek doz ve i.p. yolla uygulanmıştır. Doz eskalasyon çalışmasında sıçanların klinik gözlem, vücut sıcaklığı ve vücut ağırlığı ölçümleri yapılmıştır.

4.1.1. Doz Eskalasyon Çalışmasında Yapılan Klinik Gözlemler

Belirlenen dozlar sıçanlara uygulandıktan sonra sıçanlarda görülen klinik farklılıklar takip edilmiştir. Klinik gözlemlerde sıçanlarda piloereksiyon ve lokomotor aktivitede azalması gibi değişiklikler üç gün boyunca takip edilmiştir. Klinik gözlemlerde elde edilen sonuçlar (Tablo 4-1)'de gösterilmiştir.

Tablo 4-1: Doz eskalasyon çalışması için yapılan klinik gözlem sonuçları.

Doz	Klinik Belirtiler		
	Gün 1	**Gün 2**	**Gün 3**
Kontrol Grubu (n=3)	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi
10 mg/kg M47 (n=2)	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi
25 mg/kg M47 (n=2)	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi
100 mg/kg M47 (n=2)	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi
300 mg/kg M47 (n=3)	Uygulamadan 10 dakika sonra sıçanlarda lokomotor aktivitede azalma meydana geldi. Sıçanlardan birinde vücut ağırlığında belirgin düşüş görülmüştür.	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi

Uygulanan dozlardan sonra Sotocinal ve ekibi (2011) tarafından geliştirilen Sıçan Yüz Burusturması Derecelendirmesi (The Rat Grimace Scale, RGS) adlı yönteme göre ağrı mimikleri değerlendirilmiş ve herhangi bir ağrı belirtisi saptanmamıştır.

4.1.2. Doz Eskalasyon Çalışmasında Yapılan Vücut Ağırlığı Ölçümleri

Doz eskalasyon çalışmasında sıçanların vücut ağırlıkları üç gün boyunca ölçülmüştür. Yapılan vücut ağırlığı ölçüm sonuçları (Tablo 4-2)'de gösterilmiştir.

Tablo 4-2: Doz eskalasyon çalışması için yapılan vücut ağırlığı ölçümlerinin sonuçları (Ort±SD).

Doz	Gün 0	Gün1	Gün2	Gün3
Kontrol Grubu	149±20,5	153±19,1	153±17,9	156±19,5
10 mg/kg Grubu	143±13,4	143±13,4	144±12,0	146±12,0
25mg/kg Grubu	147±0,4	146,8±1,1	145±2,8	149±1,8
100mg/kg Grubu	144±0,0	144±2,1	141,3±1,8	145,8±1,1
300 mg/kg Grubu	172±10,2	165±5,7	166±7,5	170 ±5,9

4.1.3. Doz Eskalasyon Çalışmasında Yapılan Vücut Sıcaklığı Ölçümleri

Doz eskalasyon çalışmasında yüksek doz olan 300 mg/kg dozu verilen sıçanlarda vücut sıcaklığı ölçümü yapılmıştır. Yapılan vücut sıcaklığı ölçüm sonuçları (Tablo 4-3)'de gösterilmiştir.

Tablo 4-3: Doz eskalasyon çalışması için yapılan vücut sıcaklığı ölçümlerinin sonuçları.

	1.Gün	2.Gün	3.Gün
Doz	1.Ölçüm/2.Ölçüm	1.Ölçüm/2.Ölçüm	1.Ölçüm/2.Ölçüm
Kontrol Grubu	38.4/36.3	36.9/37.5	36.9/37.5
300 mg/kg-S-1	37.7/37.0	37.9/36.7	37.7/36.7
300 mg/kg-S-2	38.0/36.9	37.6/37.0	37.5/37.0
300 mg/kg-S-3	36.9/37.3	37.6/36.5	37.4/37.0

4.2. MTD Sonuçları

MTD çalışmasında, doz eskalasyon çalışma sonuçlarına bakılarak belirlenen 80, 120 ve 300 mg/kg dozları beş gün boyunca uygulanarak tekrarlı dozlarda toksisite çalışması yapılmıştır. MTD çalışmasında sıçanların klinik gözlem, vücut sıcaklığı,

vücut ağırlığı ölçümleri belirli saatlerde yapılmıştır. Ayrıca, çalışmanın sonunda hematolojik, biyokimyasal ve histopatolojik analizler yapılıp toksik etkilerden etkilenen parametreler tespit edilmiştir.

4.2.1 Klinik Gözlem Sonuçları

M47 molekülünün uygulandığı beş gün boyunca sıçanlar klinik belirtiler açısından takip edilmiştir. Sıçanlardaki davranış değişiklikleri ve klinik belirtiler takip edilerek kayıt edilmiştir. Bu aşamada sıçanlarda kambur duruş, piloereksiyon ve lokomotor aktivite azalması gibi bulgular açısından takip edilmiştir. M47 molekülünün uygulanması sırasında sıçanlarda yapılan klinik gözlem sonuçları (Tablo 4-4) gösterilmiştir.

Tablo 4-4: M47 molekülünün uygulanması sırasında yapılan klinik gözlem sonuçları.

Doz	Klinik Belirtiler				
	Gün 1	**Gün 2**	**Gün 3**	**Gün 4**	**Gün 5**
Kontrol Grubu (n=5)	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi
80 mg/kg M47 (n=3)	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Dozun uygulandığı hayvanların birinde hareketsizlik gözlendi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi
120 mg/kg M47 (n=3)	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi
300 mg/kg M47 (n=5)	Dozun uygulandığı bütün hayvanlarda piloereksiyon görülmüştür. Hayvanlardan birinde mortalite görülmüştür.	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi	Herhangi bir olumsuz durum gözlenmedi

Uygulanan dozlardan sonra Sotocinal ve ekibi (2011) tarafından geliştirilen Sıçan Yüz Burusturması Derecelendirmesi (The Rat Grimace Scale, RGS) adlı yönteme göre ağrı mimikleri değerlendirilmiş ve herhangi bir ağrı belirtisi saptanmamıştır.

4.2.2. Vücut Ağırlığı Ölçümleri

Ağırlık ölçümlerinden ilki, M47 uygulanmasından önce saat 10.00'da yapılmıştır. İkinci ölçüm M47 uygulaması yapıldıktan sonra saat 16.00'da yapılmıştır. Uygulan farklı dozlarda sıçanların vücut ağırlık ölçümlerinin farklı günlerdeki sonuçları (Tablo 4-5)'de gösterilmiştir. Farklı dozlarda M47 uygulanan sıçanlarda vücut ağırlıklarının ölçüm sonuçları (Ort±SD) şeklinde (Tablo 4-6)'da, vücut ağırlığındaki değişimler istatistiksel olarak (Şekil 4-1)'de gösterilmiştir.

Tablo 4-5: Farklı dozların uygulandığı sıçanlarda vücut ağırlık ölçümlerinin sonuçları.

	Vücut Ağırlığı (gram)				
	1.Gün	**2.Gün**	**3.Gün**	**4.Gün**	**5.Gün**
Kontrol 1	168	170	171	170	169
Kontrol 2	170	175	176	176	171
Kontrol 3	170	171	172	171	171
Kontrol 4	146	150	157	159	163
Kontrol 5	148	156	160	157	160
ort	**160**	**164**	**167**	**166**	**167**
SD	**12,3**	**10,8**	**8,2**	**8,2**	**5**
SE	**5,5**	**4,8**	**3,7**	**3,7**	**2,2**
80 mg/kg S-1	169	168	165	170	167
80 mg/kg S-2	167	165	162	163	167
80 mg/kg S-3	164	163	162	164	162
ort	**167**	**165**	**163**	**166**	**165**
SD	**2,5**	**2,5**	**1,7**	**3,8**	**2,9**
SE	**1,5**	**1,5**	**1**	**2,2**	**1,7**
120 mg/kg S-1	159	162	160	156	159
120 mg/kg S-2	155	153	155	153	150
120 mg/kg S-3	161	164	162	158	159
ort	**158**	**160**	**159**	**156**	**156**
SD	**3,1**	**5,9**	**3,6**	**2,5**	**5,2**
SE	**1,8**	**3,4**	**2,1**	**1,5**	**3**
300 mg/kg S-1	114	122	123	126	128
300 mg/kg S-2	118	127	127	125	128
300 mg/kg S-3	133	142	143	144	148
300 mg/kg S-4	121	125	127	128	133
300 mg/kg S-5	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex
ort	**121**	**129**	**130**	**131**	**134**
SD	**8,2**	**8,9**	**8,9**	**8,9**	**9,5**
SE	**4,1**	**4,5**	**4,4**	**4,5**	**4,7**

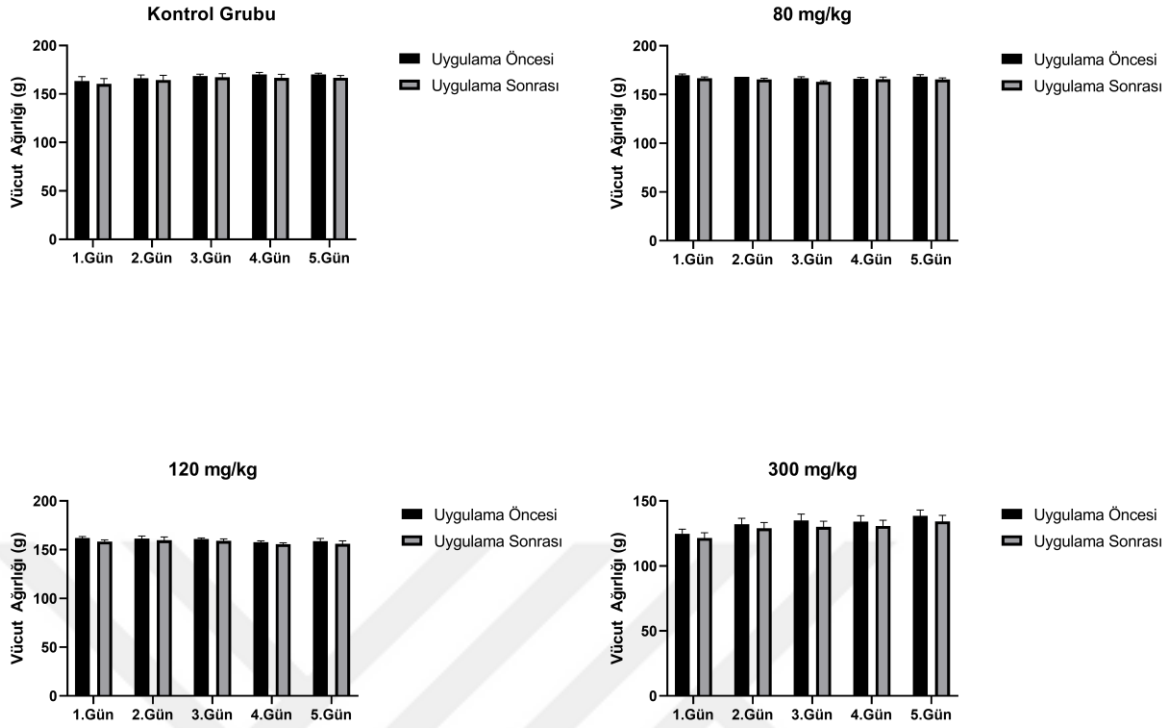
Tabloda gösterilen değerler, M47 molekülü uygulandıktan sonra saat 16.00'da yapılan ağırlık ölçüm sonuçlarını göstermektedir.

Tablo 4-6: Farklı dozların uygulandığı sıçanlarda vücut ağırlık ölçüm sonuçları (Ort±SD).

Doz	**Gün-1**		**Gün-2**		**Gün-3**		**Gün-4**		**Gün-5**	
	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra
Kontrol Grubu	163±10,1	160±12,3	166±7,5	164±10,8	169±3,9	167±8,2	170±5,2	166±8,2	170±2,7	167±5,0
80 mg/kg Grubu	170±2,3	167±2,5	168±0,0	165±2,5	167±2,9	163±1,7	166±2,7	166±3,8	168±3,5	165±2,9
120 mg/kg Grubu	162±2,7	158±3,1	161±4,7	160±5,9	161±2,0	159±3,6	158±2,5	156±2,5	159±4,9	156±5,2
300 mg/kg Grubu	125±7,1	121±8,2	132±9,4	129±8,9	135±9,8	130±8,9	134±9,4	131±8,9	139±9,1	134±9,5

Tabloda önce olarak geçen kısım uygulama öncesi yapılan ölçümleri, sonra olarak geçen kısım uygulama sonrası yapılan ölçümleri ifade etmektedir. Uygulama öncesindeki ölçümler, M47 molekülünün uygulamasından önce saat 10'da yapılmıştır.

Uygulamanın yapıldığı gün bütün doz gruplarında hafif derecede kilo kayıpları ölçülmüştür ancak ertesi gün sabah yapılan ölçümlerde sıçanların toparladıkları ve kilo aldıkları görülmüştür. Hayvanlarda en fazla kilo kaybı 300 mg/kg doz grubunda üçüncü gün ölçülmüştür.



Şekil 4-1: M47 molekülünün uygulanmasından önce ve sonra sıçanlardaki vücut ağırlık ölçümlerinin gösterimi.

Analizde ANOVA ve Bonferroni post hoc test kullanılmıştır. * $p \leq 0,05$

Analize göre M47 uygulamasından önce ve sonra ölçülen vücut ağırlıklardaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p \geq 0,05$).

4.2.3. Vücut Sıcaklığı Ölçümleri

M47 molekülünün uygulandığı beş gün boyunca günde üç kez olmak üzere sıçanlarda vücut sıcaklık ölçümleri yapılmıştır. Oluşan sıcaklık değişiklikleri takip edilmiş ve ölçüm sonuçları kaydedilmiştir. Hayvanların vücut sıcaklığı ölçümlerinde rektal prob kullanılmıştır. İlk ölçüm M47 uygulanmadan önce yapılmış, ikinci ve üçüncü rektal sıcaklıklar uygulamadan sonra belirlenmiş saatlerde ölçülmüştür. Farklı dozların uygulandığı sıçanlarda vücut sıcaklık ölçümlerinin farklı günlerdeki sonuçları (Tablo 4-7)'de gösterilmiştir. Farklı dozlarda M47 uygulanan sıçanlarda beş gün boyunca ölçülen vücut sıcaklıkları (Ort±SD) şeklinde (Tablo 4-8)'de ve vücut sıcaklığındaki değişimler istatistiksel olarak (Şekil 4-1)'de gösterilmiştir.

Tablo 4-7: Farklı dozların uygulandığı sıçanlarda vücut sıcaklık ölçümlerinin sonuçları.

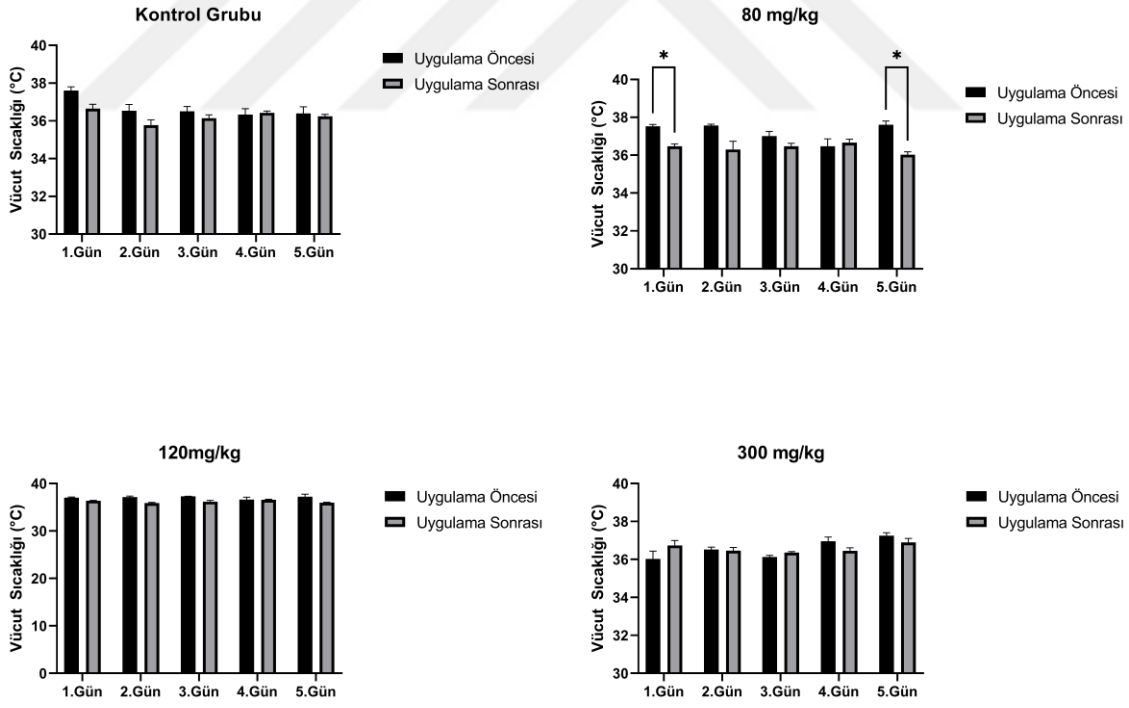
	1.Gün		2.Gün		3.Gün		4.Gün		5.Gün	
	Vücut Sıcaklığı (°C)									
	Önce	**ort**	**Önce**	**ort**	**Önce**	**ort**	**Önce**	**ort**	**Önce**	**ort**
Kontrol 1	37,5	37,3	37,6	36,4	37,5	36,1	35,6	36,3	37,1	36,1
Kontrol 2	38,0	37,2	36,2	36,2	36,4	36,4	36,0	36,7	36,0	36,5
Kontrol 3	38,1	36,3	37,0	35,8	36,0	35,8	36,0	36,7	37,3	36,0
Kontrol 4	37,4	36,3	36,0	35,9	36,3	36,7	37,3	36,3	35,5	36,2
Kontrol 5	37,0	36,3	35,9	34,7	36,3	35,9	36,8	36,3	36,1	36,5
ort	**37,6**	**36,7**	**36,5**	**35,8**	**36,5**	**36,2**	**36,3**	**36,5**	**36,4**	**36,3**
SD	**0,5**	**0,5**	**0,7**	**0,7**	**0,6**	**0,4**	**0,7**	**0,2**	**0,8**	**0,2**
SE	**0,2**	**0,2**	**0,3**	**0,3**	**0,3**	**0,2**	**0,3**	**0,1**	**0,3**	**0,1**
80 mg/kg S-1	37,7	36,5	37,5	35,7	37,3	36,8	36,7	37	37,2	36,1
80 mg/kg S-2	37,5	36,3	37,5	37,2	36,5	36,2	35,7	36,6	37,7	35,8
80 mg/kg S-3	37,4	36,7	37,7	36,1	37,2	36,5	37,0	36,4	37,9	36,3
ort	**37,5**	**36,5**	**37,6**	**36,3**	**37,0**	**36,5**	**36,5**	**36,7**	**37,6**	**36,1**
SD	**0,2**	**0,2**	**0,1**	**0,8**	**0,4**	**0,3**	**0,7**	**0,3**	**0,4**	**0,3**
SE	**0,1**	**0,1**	**0,1**	**0,4**	**0,3**	**0,2**	**0,4**	**0,2**	**0,2**	**0,1**
120 mg/kg S-1	36,7	36,3	36,6	35,6	37,3	35,8	36,1	36,5	38,3	36,1
120 mg/kg S-2	37,1	36,3	37,3	36,0	37,3	36,0	36,1	36,5	36,8	35,8
120 mg/kg S-3	37,2	36,8	37,4	36,1	37,2	36,8	37,6	36,8	36,5	36
ort	**37,0**	**36,5**	**37,1**	**35,9**	**37,3**	**36,2**	**36,6**	**36,6**	**37,2**	**36,0**
SD	**0,3**	**0,3**	**0,4**	**0,3**	**0,1**	**0,5**	**0,9**	**0,2**	**1,0**	**0,2**
SE	**0,2**	**0,2**	**0,3**	**0,2**	**0,0**	**0,3**	**0,5**	**0,1**	**0,6**	**0,1**
300 mg/kg S-1	37,2	36,8	36,6	36,4	36,1	36,5	37,5	36,6	37,5	37,2
300 mg/kg S-2	35,4	36,7	36,8	36,1	36,2	36,3	36,9	36,1	37,4	37,1
300 mg/kg S-3	36,0	36,1	36,5	36,7	36,3	36,3	36,4	36,9	36,8	37,1
300 mg/kg S-4	35,5	37,4	36,2	36,8	35,9	36,4	37,0	36,3	37,3	36,3
300 mg/kg S-5	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex
ort	**36,0**	**36,8**	**36,5**	**36,5**	**36,1**	**36,4**	**37,0**	**36,5**	**37,3**	**36,9**
SD	**0,8**	**0,5**	**0,2**	**0,3**	**0,2**	**0,1**	**0,5**	**0,4**	**0,3**	**0,4**
SE	**0,4**	**0,3**	**0,1**	**0,2**	**0,1**	**0,0**	**0,2**	**0,2**	**0,2**	**0,2**

Tablolarda öncesi olarak geçen kısım, M47 verilmeden önce yapılan rektal vücut sıcaklık ölçümlerini ifade etmektedir. Ort olarak geçen kısım, M47 molekülü uygulandıktan sonra yapılan 1.ölçüm ve 2.ölçüm sonuçlarının ortalamasını ifade etmektedir. 1.ölçüm beş gün boyunca M47 uygulandıktan sonra (saat 11.00' de) saat 13.00'de gerçekleştirilmiştir. 2.ölçüm beş gün boyunca saat 15.00'de gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4-8: Farklı dozların uygulandığı sıçanların vücut sıcaklık ölçümleri (Ort±SD).

Doz	Gün-1		Gün-2		Gün-3		Gün-4		Gün-5	
	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra	Önce	Sonra
Kontrol Grubu	37,6±0,5	36,7±0,5	36,5±0,7	35,8±0,7	36,5±0,6	36,2±0,4	36,3±0,7	36,5±0,2	36,4±0,8	36,3±0,8
80 mg/kg Grubu	37,5±0,2	36,5±0,2	37,6±0,1	36,3±0,8	37,0±0,4	36,5±0,3	36,5±0,7	36,7±0,3	37,6±0,4	36,1±0,3
120 mg/kg Grubu	37,0±0,3	36,5±0,3	37,1±0,4	37,3±0,1	36,4±0,5	36,2±0,5	36,6±0,9	36,6±0,2	37,2±1,0	36,0±0,2
300 mg/kg Grubu	36,0±0,8	36,8±0,5	36,5±0,2	36,5±0,3	36,1±0,2	36,4±0,1	37,0±0,5	36,5±0,4	37,3±0,3	36,9±0,4

Birinci ve ikinci ölçümlerde vücut sıcaklığında hafif seviyede düşüşler saptanmıştır.



Şekil 4-2: M47 molekülünün uygulanmasından önce ve sonra sıçanlardaki vücut sıcaklık ölçülerinin gösterimi.

Analizde ANOVA ve Bonferroni post hoc test kullanılmıştır. * $p \leq 0,05$

Analize göre kontrol grubu, 120 ve 300 mg/kg dozlarında M47 uygulamasından önce ve sonra yapılan vücut sıcaklık ölçümlerindeki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p \geq 0,05$). 80 mg/kg doz grubunda sadece birinci ve beşinci günlerdeki uygulama öncesi ve sonrasında yapılan vücut sıcaklık ölçümlerindeki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$).

4.2.4. Sıçanların sakrifiye edilmesi ve nekropsi sonuçları

Çalışmanın sonunda MTD çalışmasında kullanılan bütün sıçanlar sakrifiye edilmiştir. Sakrifikasyon sırasında sıçanlara nekropsi işlemi yapılmıştır. Sakrifikasyon öncesinde ölçülen sıçanların vücut ağırlıkları, organ ağırlıkları ve nekropsi gözlemleri (Tablo 4-9)'da gösterilmiştir.

Tablo 4-9: Sıçanların organ ve vücut ağırlıkları ve nekropsi sonuçları.

		Sıçanların Böbrek Ağırlıkları			
Sıçan No	Karaciğer	Sağ Böbrek	Sol Böbrek	Sıçanların Ağırlığı	Nekropsi Sonucu Sıçanların Durumu
Kontrol 1	6,72	0,60	0,56	169	Olumsuz bir durum görülmemiştir.
Kontrol 2	7,49	0,62	0,58	173	Olumsuz bir durum görülmemiştir.
Kontrol 3	7,15	0,66	0,65	172	Olumsuz bir durum görülmemiştir.
Kontrol 4	8,3	1,07	0,96	183	Olumsuz bir durum görülmemiştir.
Kontrol 5	8,2	0,90	0,91	176	Olumsuz bir durum görülmemiştir.
80 mg/kg S-1	7,29	0,59	0,58	168	Yüzeysel beyaz lezyonlar karaciğerde, peritonda ve dalakta görülmüştür.
80 mg/kg S-2	8,21	0,64	0,6	167	Yüzeysel beyaz lezyonlar karaciğerde, peritonda ve dalakta görülmüştür.
80 mg/kg S-3	7,92	0,57	0,56	165	Yüzeysel beyaz lezyonlar karaciğerde, peritonda ve dalakta görülmüştür.

120 mg/kg S-1	7,31	0,56	0,59	158	Yüzeysel beyaz lezyonlar karaciğerde ve peritonda görülmüştür.
120 mg/kg S-2	7,57	0,53	0,54	155	Yüzeysel beyaz lezyonlar karaciğerde ve peritonda görülmüştür.
120 mg/kg S-3	7,24	0,64	0,54	163	Yüzeysel beyaz lezyonlar karaciğerde ve peritonda görülmüştür.
300 mg/kg S-1	6,95	0,75	0,72	141,5	Karaciğerin soluk ve açık renkte olduğu görülmüştür. Diğer organlar normaldir.
300 mg/kg S-2	7,13	0,70	0,89	151,5	Karaciğerin soluk ve açık renkte olduğu görülmüştür. Etkin maddenin periton boşluğuna ve bütün organlara dağıldığı görülmüştür. Yüzeysel beyaz lezyonlar görülmüştür.
300 mg/kg S-3	8,77	0,97	0,87	166	Karaciğerin soluk ve açık renkte olduğu görülmüştür. Etkin maddenin periton boşluğuna ve bütün organlara dağıldığı görülmüştür. Yüzeysel beyaz lezyonlar görülmüştür.
300 mg/kg S-4	6,94	0,76	0,7	147	Karaciğerin soluk ve açık renkte olduğu görülmüştür. Etkin maddenin periton boşluğuna ve bütün organlara dağıldığı görülmüştür. Yüzeysel beyaz lezyonlar görülmüştür.

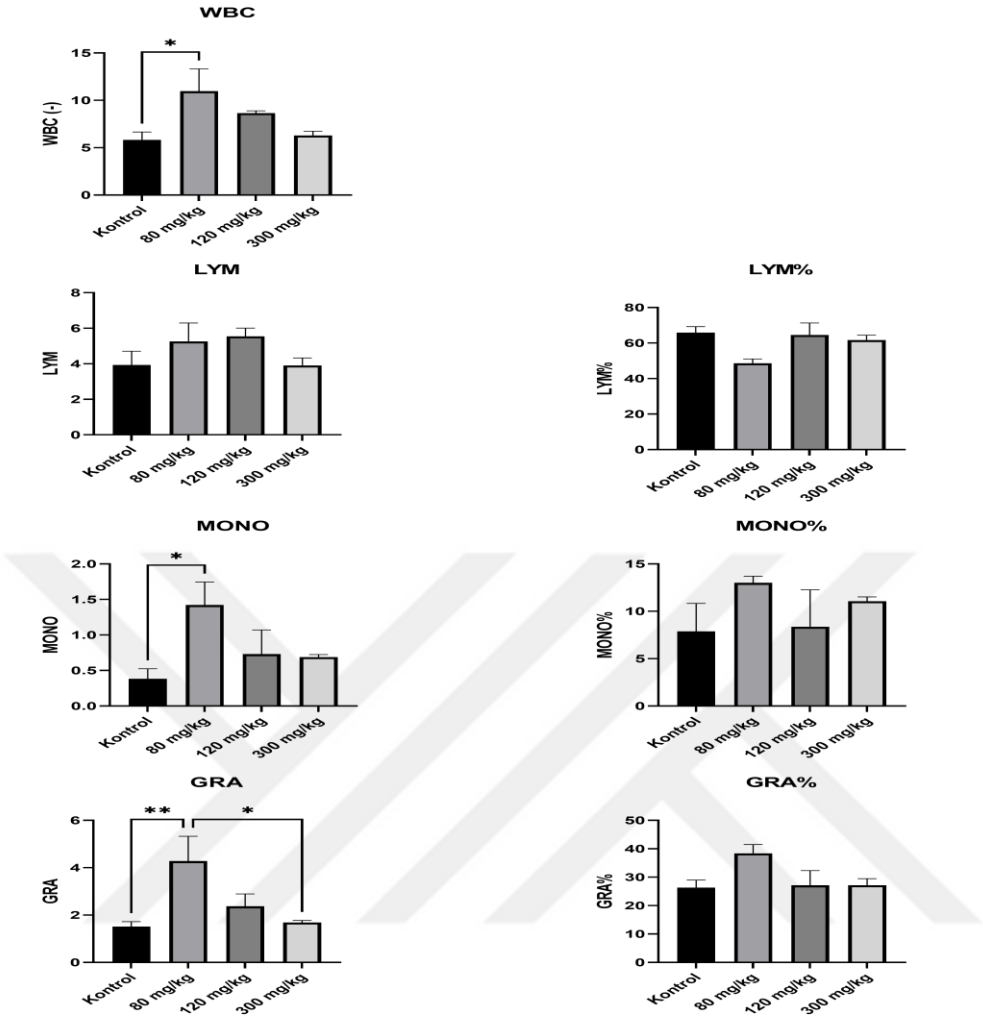
4.2.5. Hematolojik Analizler

Sakrifikasyon aşamasında sıçanlardan alınan kan örnekleriyle hematolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Hematolojik analizler, Abacus Junior Vet analizöründe gerçekleştirilmiştir. Bu analizlerde M47'nin hematolojik parametrelere etkisi araştırılmıştır. Hematolojik analiz sonucunda uygulanan doza bağlı olarak hematolojik parametrelerin değişimi (Tablo 4-10)'de gösterilmiştir. M47 molekülünün beyaz kan hücreleri, kırmızı kan hücreleri ve kan pulcukları ile ilgili hematolojik parametrelere etkisi sırasıyla (Şekil 4-3), (Şekil 4-4) ve (Şekil 4-5)'de istatistiksel olarak gösterilmiştir.

Tablo 4-10: Uygulan doza göre hemogram testindeki parametreler.

	WBC	LYM	MONO	GRA	LY%	MONO%	GR%	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	RDWc	PLT	PCT	MPV	PDWc
Kontrol 1	8,95	6,83	0,05	2,07	76,3	0,60	23,1	6,17	12,3	34,5	56	20	35,8	16,6	975	0,59	6,1	32,6
Kontrol 2	4,51	2,49	0,56	1,45	55,3	12,5	32,2	6,38	12,7	37,3	58	19,9	34,2	16,8	905	0,56	6,2	32,2
Kontrol 3	5,83	3,88	0,04	1,92	66,5	0,7	32,9	6,81	12,3	34,2	50	18,1	36	16,7	1034	0,62	6	32,6
Kontrol 4	4,4	2,77	0,57	1,06	63	12,9	24,1	6,29	13,6	38,4	61	21,7	35,5	11,9	984	0,604	6,1	10
Kontrol 5	5,47	3,71	0,7	1,06	67,9	12,7	19,4	5,92	13	37,4	63,2	22	34,8	11,8	952	0,577	6,1	10
ort	**5,83**	**3,94**	**0,38**	**1,51**	**65,8**	**7,88**	**26,3**	**6,31**	**12,8**	**36,3**	**57,6**	**20,3**	**35,3**	**14,8**	**970**	**0,59**	**6,10**	**23,5**
SD	**1,85**	**1,72**	**0,31**	**0,47**	**7,64**	**6,60**	**5,94**	**0,33**	**0,54**	**1,89**	**5,08**	**1,58**	**0,75**	**2,66**	**47,1**	**0,02**	**0,07**	**12,3**
SE	**0,83**	**0,77**	**0,14**	**0,21**	**3,41**	**2,95**	**2,66**	**0,15**	**0,24**	**0,85**	**2,27**	**0,70**	**0,33**	**1,19**	**21,1**	**0,01**	**0,03**	**5,50**
80 mg/kg S-1	15,3	7,27	2,06	5,97	47,5	13,5	39	7,34	14	40,5	55	19	34,5	16,2	1448	0,88	6,1	31,7
80 mg/kg S-2	10,36	4,66	1,20	4,50	45,0	11,6	43,4	7,35	13	37,5	51	17,7	34,6	17,2	478	0,29	6	32,6
80 mg/kg S-3	7,26	3,87	1,01	2,38	53,3	13,9	32,8	6,92	12,6	36,5	53	18,2	34,6	16,2	1043	0,62	6	31,7
ort	**11,0**	**5,27**	**1,42**	**4,28**	**48,6**	**13,00**	**38,4**	**7,20**	**13,2**	**38,1**	**53,00**	**18,3**	**34,6**	**16,5**	**990**	**0,60**	**6,03**	**32,0**
SD	**4,05**	**1,78**	**0,56**	**1,80**	**4,26**	**1,23**	**5,33**	**0,25**	**0,72**	**2,10**	**2,00**	**0,66**	**0,06**	**0,58**	**487**	**0,30**	**0,06**	**0,52**
SE	**2,34**	**1,03**	**0,32**	**1,04**	**2,46**	**0,71**	**3,07**	**0,14**	**0,42**	**1,21**	**1,15**	**0,38**	**0,03**	**0,33**	**281**	**0,17**	**0,03**	**0,30**
120 mg/kg S-1	8,44	6,26	0,05	2,13	74,1	0,6	25,3	7	13,2	37,82	54	18,8	34,9	16,2	1028	0,63	6,1	32,2
120 mg/kg S-2	9,13	4,69	1,07	3,37	51,4	11,7	36,9	7,37	13,4	38,72	53	18,2	34,7	16,9	833	0,54	6,5	33,8
120 mg/kg S-3	8,38	5,7	1,07	1,61	68,1	12,8	19,2	7,08	13,1	39,42	55	18,5	33,3	16,6	1103	0,64	5,8	31,2
ort	**8,65**	**5,55**	**0,73**	**2,37**	**64,5**	**8,37**	**27,1**	**7,15**	**13,23**	**38,7**	**54,0**	**18,5**	**34,3**	**16,6**	**988**	**0,60**	**6,13**	**32,40**
SD	**0,42**	**0,80**	**0,59**	**0,90**	**11,8**	**6,75**	**8,99**	**0,19**	**0,15**	**0,80**	**1,00**	**0,30**	**0,87**	**0,35**	**139**	**0,06**	**0,35**	**1,31**
SE	**0,24**	**0,46**	**0,34**	**0,52**	**6,79**	**3,90**	**5,19**	**0,11**	**0,09**	**0,46**	**0,58**	**0,17**	**0,50**	**0,20**	**81**	**0,03**	**0,20**	**0,76**
300 mg/kg S-1	6,91	4,66	0,72	1,53	67,4	10,4	22,2	4,84	10,9	30,2	62,5	22,6	36,1	12,2	1061	0,64	6	9,3
300 mg/kg S-2	5,19	2,82	0,64	1,73	54,3	12,4	33,3	5,48	11,6	32,9	60,1	21,2	35,4	12,8	1135	0,69	6,1	9,3
300 mg/kg S-3	7,15	4,47	0,77	1,91	62,6	10,8	26,6	5,31	11,6	32,4	61	21,9	35,9	12,6	1207	0,73	6	9,3

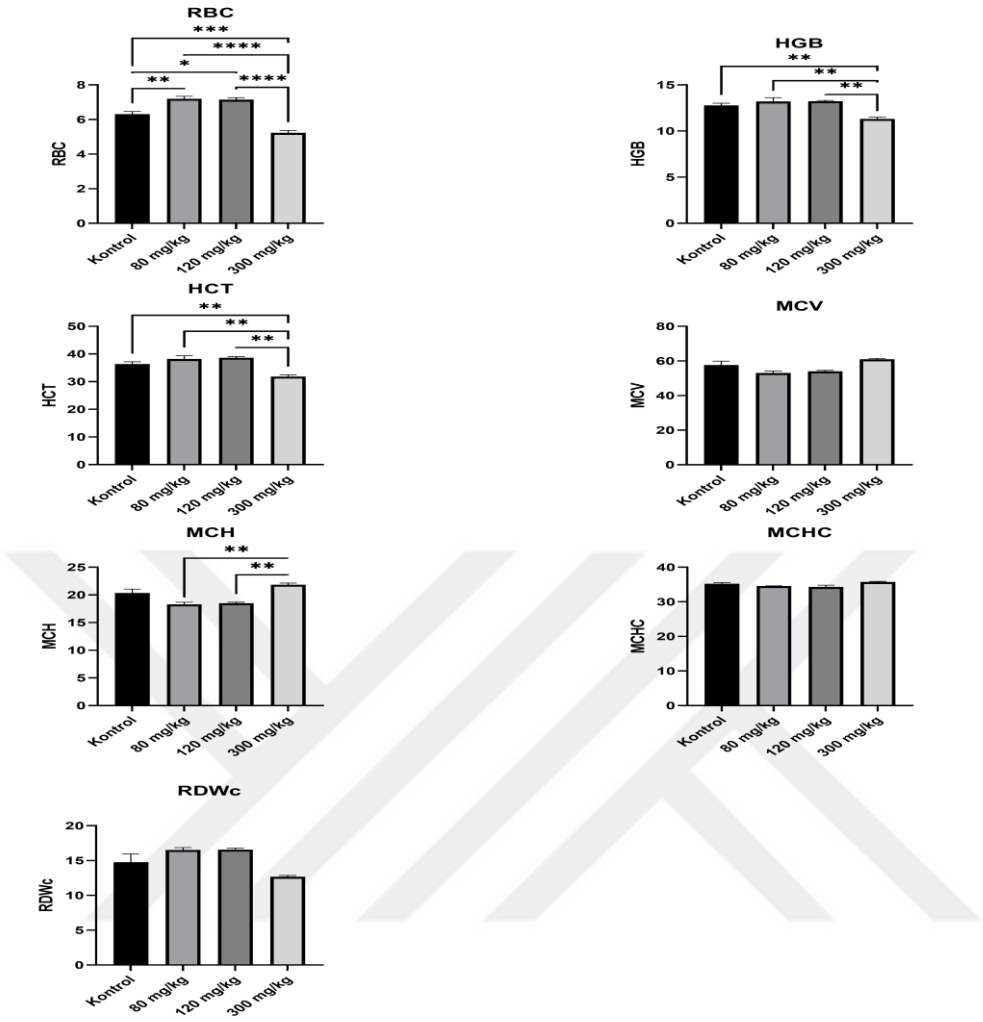
300 mg/kg S-4	5,91	3,7	0,63	1,58	62,6	10,7	26,7	5,3	11,2	31,9	60,2	21,7	35,6	13,1	1339	0,82	6,1	10
300 mg/kg S-5	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex
ort	**6,29**	**3,91**	**0,69**	**1,69**	**61,7**	**11,1**	**27,2**	**5,23**	**11,3**	**31,9**	**61,0**	**21,9**	**35,8**	**12,7**	**1185**	**0,72**	**6,05**	**9,48**
SD	**0,91**	**0,84**	**0,07**	**0,17**	**5,44**	**0,90**	**4,58**	**0,27**	**0,34**	**1,17**	**1,11**	**0,58**	**0,31**	**0,38**	**118**	**0,08**	**0,06**	**0,35**
SE	**0,45**	**0,42**	**0,03**	**0,09**	**2,72**	**0,45**	**2,29**	**0,1**	**0,2**	**0,6**	**0,6**	**0,3**	**0,2**	**0,2**	**59,2**	**0,0**	**0,0**	**0,2**



Şekil 4-3: M47 molekülünün beyaz kan hücreleri ile ilgili hematolojik parametrelere etkisinin gösterimi

Analizde ANOVA ve Bonferroni post hoc test kullanılmıştır. * $p \leq 0,05$ ve ** $p \leq 0,01$

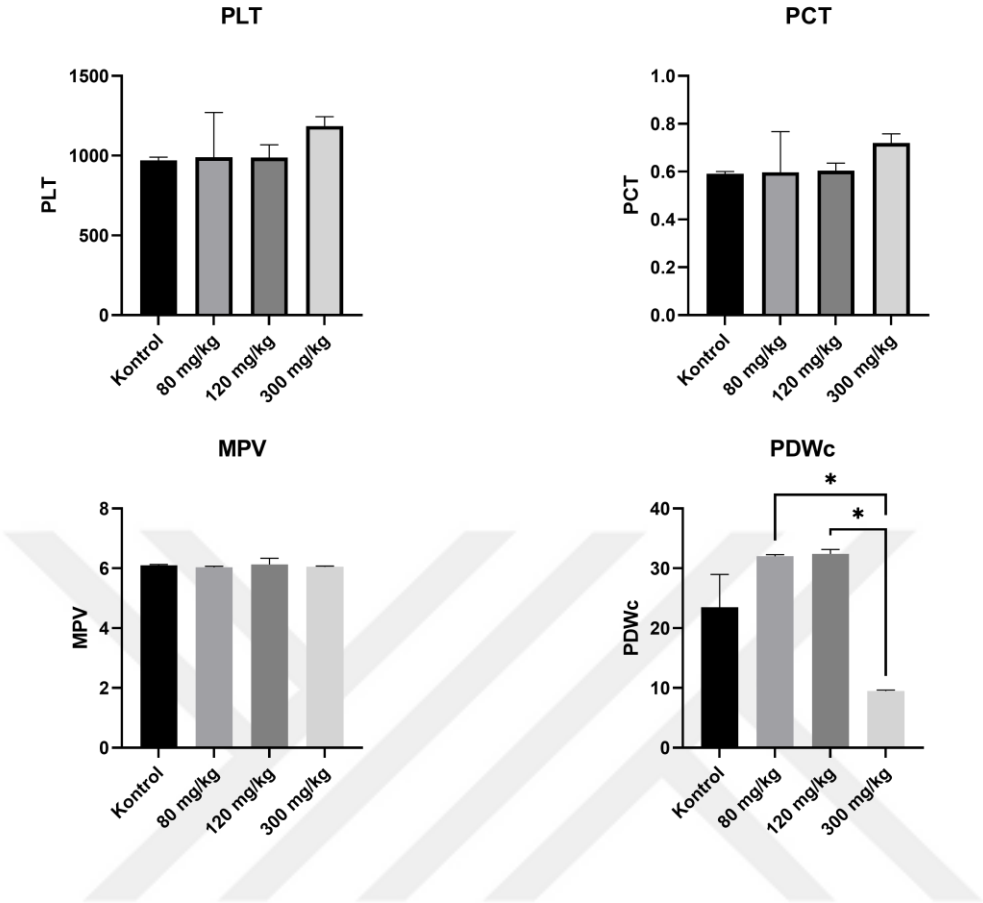
Analize göre lenfosit, lenfosit, monosit ve granülosit yüzdesi parametrelerinde görülen değişimler anlamlı bulunmamıştır ($p \geq 0,05$). 80 mg/kg doz grubunda beyaz kan hücresi, monosit ve granülosit seviyelerindeki artışlar kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$) ve ($p \leq 0,01$). Ayrıca 300 mg/kg doz grubunda granülosit seviyesindeki azalma anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$).



Şekil 4-4: M47 molekülünün kırmızı kan hücreleri ile ilgili hematolojik parametrelere etkisinin gösterimi

Analizde ANOVA ve Bonferroni post hoc test kullanılmıştır. * p≤0,05,** p≤0,01, *** p≤0,001 ve **** p≤0,0001.

Analizlerde 300 mg/kg doz grubunda kırmızı kan hücrelerinin seviyesindeki azalma kontrol ve diğer doz gruplarına göre anlamlı bulunmuştur (p≤0,001) ve (p≤0,0001). 300 mg/kg doz grubunda görülen hemoglobin ve hematokrit seviyelerindeki azalma kontrol ve diğer doz gruplarına göre anlamlı bulunmuştur (p≤0,01). 300 mg/kg doz grubunda kırmızı kan hücresi başına içerdiği ortalama hemoglobin seviyesinde bir artış görülmüştür ve görülen artış diğer doz gruplarına göre anlamlı bulunmuştur (p≤0,01).



Şekil 4-5: M47 molekülünün kan pulcukları ile ilgili hematolojik parametrelere etkisinin gösterimi

Analizde ANOVA ve Bonferroni post hoc test kullanılmıştır. * $p \leq 0,05$

Kan pulcuklarla ilgili parametrelerin seviyelerinde görülen değişimler anlamlı bulunmamıştır ($p \geq 0,05$). Sadece trombosit dağılım genişliğini gösteren parametrede 300 mg/kg doz grubunda görülen azalma anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$).

4.2.6. Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler, Vettest 8008 analizöründe gerçekleştirilmiştir. Sıçanlardan toplanan kan örneklerinden elde edilen serumlarda alanin aminotransferaz (ALT) ve aspartat aminotransferaz (AST), total bilirubin (TBIL) ve kreatinin (CREA) düzeyleri ölçülmüştür. Uygulanan M47 dozuna bağlı olarak biyokimyasal parametrelerin değişimi (Tablo 4-11)'de gösterilmiştir. M47 molekülünün biyokimyasal parametrelere etkisi (Şekil 4-6)'da istatistiksel olarak gösterilmiştir.

Tablo 4-11: Uygulan doza göre biyokimyasal testlerdeki parametreler.

	ALT (U/L)	AST (U/L)	CREA (mg/dl)	TBIL (mg/dl)
Kontrol 1	23	70	0,3	0,1
Kontrol 2	56	117	0,3	0,1
Kontrol 3	56	93	0,2	0,1
Kontrol 4	29	116	0,2	0,1
Kontrol 5	36	99	0,1	0,1
ort	**40**	**99**	**0,22**	**0,1**
SD	**15,3**	**19,3**	**0,08**	**0**
SE	**6,85**	**8,63**	**0,04**	**0**

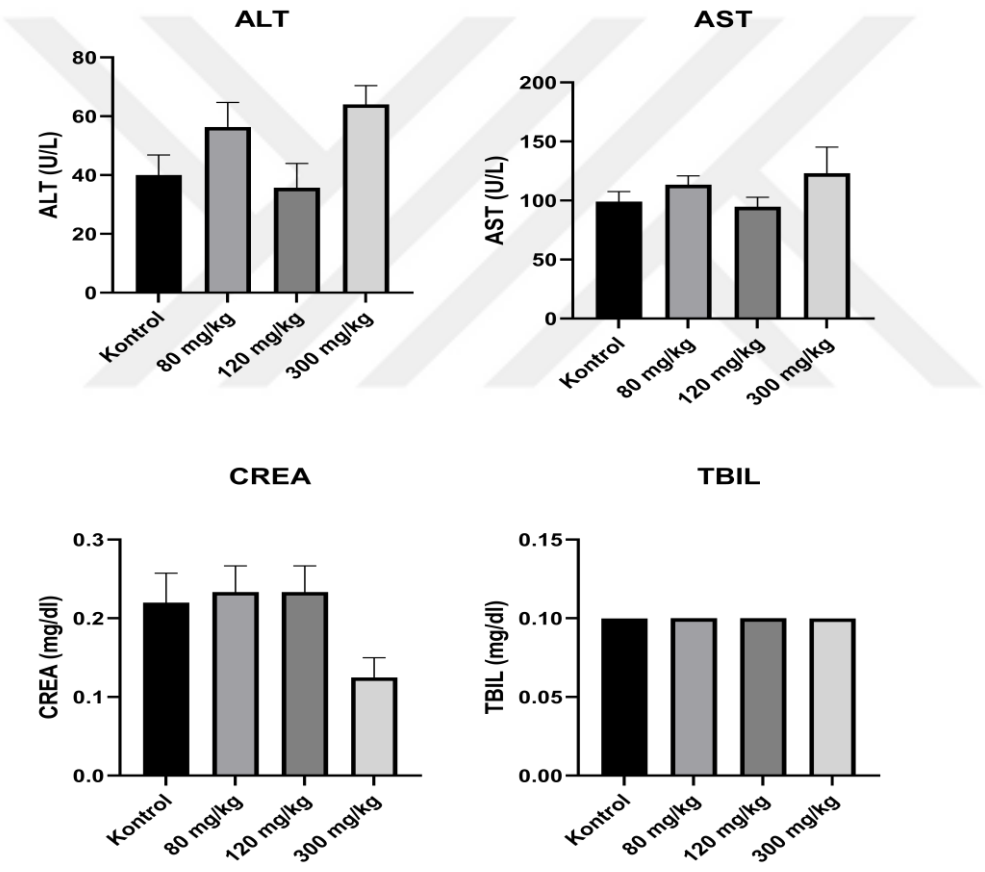
	ALT (U/L)	AST (U/L)	CREA (mg/dl)	TBIL (mg/dl)
80 mg/kg-S-1	73	127	0,3	0,1
80 mg/kg-S-2	49	101	0,2	0,1
80 mg/kg-S-3	47	112	0,2	0,1
ort	**56,3**	**113**	**0,23**	**0,1**
SD	**14,5**	**13,1**	**0,06**	**0**
SE	**8,4**	**7,5**	**0,03**	**0**

	ALT (U/L)	AST (U/L)	CREA (mg/dl)	TBIL (mg/dl)
120 mg/kg-S-1	25	110	0,2	0,1
120 mg/kg-S-2	52	91	0,2	0,1
120 mg/kg-S-3	30	83	0,3	0,1
ort	**35,7**	**94,7**	**0,23**	**0,1**
SD	**14,4**	**13,9**	**0,06**	**0**
SE	**8,29**	**8,01**	**0,03**	**0**

	ALT (U/L)	AST (U/L)	CREA (mg/dl)	TBIL (mg/dl)
300 mg/kg-S-1	55	97	0,1	0,1
300 mg/kg-S-2	60	145	0,2	0,1
300 mg/kg-S-3	83	174	0,1	0,1
300 mg/kg-S-4	58	76	0,1	0,1
300 mg/kg-S-5	Ex	Ex	Ex	Ex
ort	**64**	**123**	**0,13**	**0,1**
SD	**12,8**	**44,6**	**0,05**	**0**
SE	**6,42**	**22,3**	**0,03**	**0**

CREA: Kreatinin, TBIL: Total Bilirubin'i ifade etmektedir.

Biyokimyasal analize göre bütün biyokimyasal parametreler kontrol grubunda klinikte belirlenen normal seviyelerdedir. Doz gruplarındaki analiz sonuçlarına göre total biliribun ve kreatinin parametrelerinin ortalamasında bir artış görülmemiştir. Total biliribun seviyesinin ise bütün doz gruplarında aynı seviyede olduğu görülmüştür. Analiz sonucuna göre, 80 mg/kg ve 120 mg/kg doz gruplarında ALT ve AST enzim seviyelerinde, belirgin bir artış görülmemiştir. 300 mg/kg doz grubundaki bazı sıçanlarda ALT ve AST seviyelerinin klinikte belirlenen normal seviyelerin üzerinde olduğu görülmüştür.



Şekil 4-6: M47 molekülünün biyokimyasal parametrelere etkisinin gösterimi.

Analizde ANOVA ve Bonferroni post hoc test kullanılmıştır. * $p \leq 0,05$

Yapılan analize göre M47 uygulanmasıyla ALT, AST, CREA ve TBIL biyokimyasal parametrelerinin seviyelerinde görülen değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p \geq 0,05$).

4.2.7. Histopatolojik Analizler

Beş gün boyunca uygulama yapıldıktan sonra sıçanlar sakrifiye edilmiştir. Analiz edilecek karaciğer ve böbrek dokuları dikkatli bir şekilde çıkarıldıktan sonra sonra iki dokuya histopatolojik analiz uygulanmıştır. M47 molekülünün karaciğer ve böbrek dokusunda oluşturabileceği hasarı tespit edebilmek için iki dokunun analizinde histopatolojik skorlama uygulanmıştır. Histopatolojik hasar skorlama yöntemi kullanılarak hasar parametrelerinin araştırma yapılan organda etkisi derecelendirilmiştir. Skorlamada sıfır hasarın olmadığını, bir düşük derecede, iki orta derecede, üç şiddetli hasar olduğunu temsil etmektedir.

4.2.7.1. Karaciğerde Yapılan Histopatolojik Analiz

Karaciğerde oluşabilecek hasarlar histopatolojik analizde belirli parametreler kullanılarak değerlendirilmiştir. Parametrelerin şiddetine göre karaciğer hasarı için histopatolojik hasar skorlaması yapılmıştır. Balonlaşma dejenerasyonu (BD), nekroz (N) oluşumu, enflamatuvar hücre infiltrasyonu (ICI), karaciğer yağlanması (Sts), karaciğerde fibröz doku (Fb) oluşması ve lekeli nekroz oluşumu (SN) karaciğer için yapılacak histopatolojik skorlamada kullanılan parametrelerdir. Karaciğerde oluşan hasarın histopatolojik skorlaması (Tablo 4-12)'da yapılmıştır.

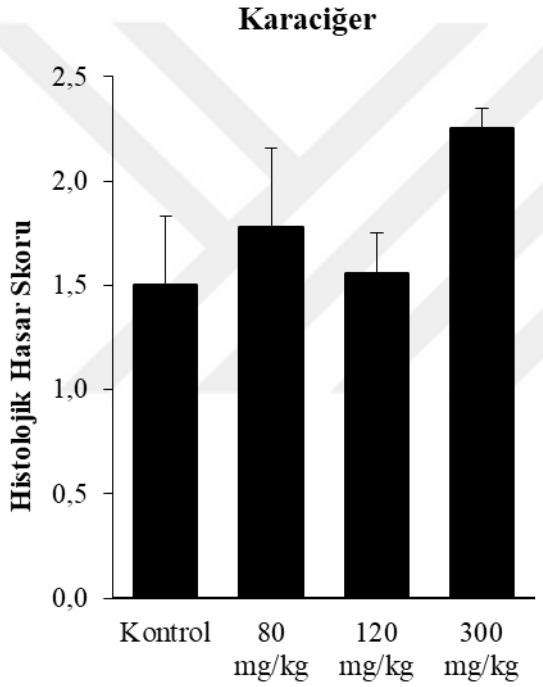
Tablo 4-12: Karaciğerde oluşan hasarın histopatolojik skorlaması.

	BD	**N**	**ICI**	**Sts**	**Fb**	**SN**	**Toplam**
Kontrol 1	1	1	1	0	0	0	3
Kontrol 2	2	2	1	0	0	0	5
Kontrol 3	2	2	1	0	0	0	5
Kontrol 1	2	2	1	0	0	0	5
Kontrol 2	2	3	2	0	0	0	7 **
80 mg/kg S-1	1	1	2	0	0	0	4
80 mg/kg S-2	1	3	2	0	0	0	6
80 mg/kg S-3	1	3	2	0	0	0	6
120 mg/kg S-1	1	1	2	0	0	0	4
120 mg/kg S-2	1	2	2	0	0	0	5
120 mg/kg S-3	1	2	2	0	0	0	5
300 mg/kg S-1	2	2,5	2	0	0	0	6,5
300 mg/kg S-2	1	2,5	3	0	0	0	6,5

300 mg/kg S-3	2	2	3	0	0	0	7
300 mg/kg S-4	2	2	3	0	0	0	7

** Kontrol 2 nolu sıçan devre dışı bırakılmıştır. Balonlaşma dejenerasyonu (BD), nekroz (N), enflamatuvar hücre infiltrasyonu (ICI), karaciğer yağlanması (Sts), karaciğerde fibroz doku oluşması (Fb) ve lekeli nekroz oluşumunu (SN) ifade etmektedir.

Karaciğerde oluşan hasarın değerlendirilmesinde istatiksel analiz kullanılmıştır. Karaciğerde oluşan hasarın istatiksel yöntemler kullanılarak yapılan değerlendirmesi aşağıda (Şekil 4-1)'de gösterilmiştir.



Şekil 4-7: M47 uygulanmasıyla oluşan karaciğer hasarının gösterimi.

Analizde ANOVA ve Dunnett's çoklu karşılaştırılma yöntemi kullanılmıştır. * $p \leq 0,05$

Yapılan analize göre 300 mg/kg dozunda görülen karaciğer hasarının kontrole göre anlamlı olduğu bulunmuştur ($p \leq 0,05$). Analize göre bütün dozlarda kontrole göre daha yüksek düzeyde karaciğer hasarı olduğu görülmüştür.

4.2.7.2. Böbrekte Yapılan Histopatolojik Analiz

Histopatolojik analizde; böbreklerde oluşabilecek hasarlar skorlamada kullanılan belirli parametreler değerlendirilmiştir. Parametrelerin şiddetine göre böbrek hasarının

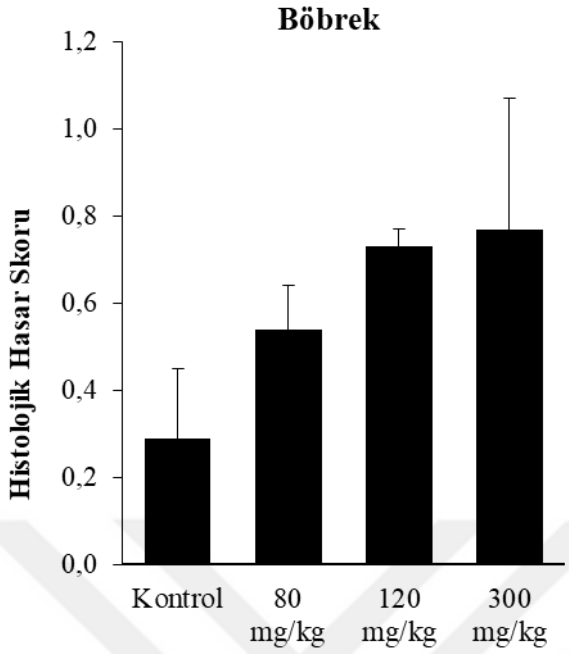
histopatolojik hasar skorlaması yapılmıştır. Glomerüler atrofi (GA), kapsülün distansiyonu (CSD), interstisyel ödem (IE), interstisyel konjesyon (IC), renal tübüler nekroz oluşumu (RTN), böbrekte fibrozis (KF) oluşması, böbrek tübüllerindeki mikrovillusların kaybı (LBB) ve enflamatuvar hücre infiltrasyonu (ICI) oluşması böbrekte yapılacak histopatolojik skorlamada kullanılacak parametrelerdir. Böbreklerde oluşan hasarın histopatolojik skorlaması (Tablo 4-13)'da yapılmıştır.

Tablo 4-11: Böbreklerde oluşan hasarın histopatolojik skorlaması.

	GA	CSD	IE	IC	RTN	KF	LBB	ICI	Toplam
Kontrol 1	0	0,5	0	0	2	0	0,5	0	3
Kontrol 2	0	0	0	1	1	0	0,5	0	2,5
Kontrol 3	0	0	0	2	1	0	1	0	4
Kontrol 1	0	0	0	0	0,5	0	0,5	0	1
Kontrol 2	0	0	0	0,5	0,5	0	0	0	1
80 mg/kg S-1	0	0	0	1	2	0	2	0	5
80 mg/kg S-2	0	0	0	2	1,5	0	1	0	4,5
80 mg/kg S-3	0	0	0	2	1	0	0,5	0	3,5
120 mg/kg S-1	0	0	0	2	2	0	1	0,5	5,5
120 mg/kg S-2	0	0	0	1	2	0	1,5	1,5	6
120 mg/kg S-3	0	0	0	1	2	0	1,5	1,5	6
300 mg/kg S-1	1	1,5	0	1	1,5	1	1	2	9
300 mg/kg S-2	0,5	0	0	1	1	0	0,5	0,5	3,5
300 mg/kg S-3	2	0	2	0,5	1	0,5	0,5	0,5	7
300 mg/kg S-4	1	0	1,5	0,5	1	0,5	0	0,5	5

Glomerüler atrofi (GA), kapsülün distansiyonu (CSD), interstisyel ödem (IE), interstisyel konjesyon (IC), renal tübüler nekroz oluşumu (RTN), böbrekte fibrozis (KF) oluşması, böbrek tübüllerindeki mikrovillusların kaybı (LBB) ve enflamatuvar hücre infiltrasyonunu (ICI) ifade etmektedir.

Böbreklerde oluşan hasarın değerlendirilmesinde istatiksel analiz kullanılmıştır. Böbrekte oluşan hasarın istatiksel yöntemler kullanılarak yapılan değerlendirmesi aşağıda (Şekil 4-2)'de gösterilmiştir.



Şekil 4-8: M47 uygulanmasıyla oluşan böbrek hasarının gösterimi.

Analizde ANOVA ve Dunnett's çoklu karşılaştırılma yöntemi kullanılmıştır. * $p \leq 0,05$ ve ** $p \leq 0,01$

Yapılan analize göre 300 mg/kg dozunda görülen böbrek hasarının kontrole göre anlamlı olduğu bulunmuştur ($p \leq 0,01$). 120 mg/kg dozunda görülen böbrek hasarının da kontrole göre anlamlı olduğu görülmüştür ($p \leq 0,05$). Analize göre doz artıkça artan bir böbrek hasarı oluştuğu saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

M47 gelecekte kanser tedavisinde kullanılması hedeflenen bir ilaç adayıdır. Çalışmamızda M47 molekülünün sıçanlar üzerinde oluşturduğu toksik etkiler bu tez çalışmasında belirlenmiştir.

MTD çalışması öncesinde M47 molekülü sıçanda ilk kez denendiği için bir doz eskalasyon çalışması yapılmıştır. Doz eskalasyon çalışmasında yapılan klinik gözlemlerde 300 mg/kg dozun uygulandığı sıçanlarda ilk gün lokomotor aktivitede azalma olduğu görülmüştür. Vücut ağırlığı ölçümlerinde ise 300 mg/kg dozunda özellikle bir sıçanda kilo kaybı olduğu belirlenmiştir. Hayvanlarda ilk günden sonra klinik belirtilerin azaldığı belirlenmiştir. MTD çalışması sırasında 300 mg/kg doz grubunda dozun uygulandığı ilk gün piloereksiyon ve bir sıçanda ölüm gözlenmiştir. Bu etkinin dışında dispne, ciddi derecede ağrı gibi ciddi toksisiteyi gösteren bulgulara rastlanmamıştır. Sonuç olarak klinik gözlemlere göre ağır toksisite belirtileri tespit edilmemiştir.

Vücut ağırlığındaki azalmalar önemli bir toksisite göstergesidir. Ölçümlerde hayvanların vücut ağırlıklarındaki düşüş miktarı %10 oranını geçmesi ilaç veya kimyasal için önemli bir toksisite parametresi olarak kabul edilmektedir (Kumar ve ark., 2014). Bütün gruplarda yaptığımız vücut ağırlığı ölçümlerinde yüzde 10'u aşan miktarda vücut ağırlığında azalma tespit edilememiştir. Aynı gün yapılan ölçümlerde bütün dozlarda hafif derecede kilo kayıpları olduğu görülmüştür. Fakat ertesi gün yapılan ölçümlerde sıçanların tekrar kilo aldığı ve toparladıkları tespit edilmiştir. Farklı günlerde yüzde olarak en yüksek kilo kayıplarının yüksek doz olan 300 mg/kg dozunda olduğu görülmüştür. Hayvanlarda 300 mg/kg dozunda ölçülen en fazla kilo kaybı uygulamanın üçüncü gününde ve yüzde 3,7 oranında olduğu bulunmuştur. Ölçümlerde kontrol grubunda da benzer kilo kayıpları olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak analiz edildiğinde M47 uygulanmasıyla birlikte gün içinde vücut ağırlıklarında ölçülen değişimler anlamlı bulunmamıştır ($p \geq 0,05$). Deney hayvanlarında akut olarak hipotermi görülmesi de deney hayvanları için önemli bir toksisite belirtisi olarak kabul edilmiştir (Gordon, 1991). Bütün gruplarda yaptığımız ölçümlerde, uygulama öncesi yapılan ölçümlere göre karşılaştırıldığında özellikle 1.ölçümlerde vücut sıcaklığında hafif seviyede düşüşler olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak analiz edildiğinde ise M47

molekülünün uygulanmasıyla birlikte aynı gün içinde vücut sıcaklığında ölçülen değişimler anlamlı bulunmamıştır ($p \geq 0,05$).

M47 keşfi yeni olan bir molekül olduğu için M47 ile ilgili hakemli dergilerde uluslararası yayınlanmış bir tane çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada M47 farelere ilk önce tek doz i.p. olarak uygulanmıştır. Tek doz uygulamasından sonra, çalışmamız ile benzer şekilde vücut sıcaklığı ve vücut ağırlığı ölçümleri yapılmış ayrıca klinik gözlem, davranış değişiklikleri ve ölüm görülüp görülmediği takip edilmiştir. Tek doz çalışmasının sonuçları değerlendirilmiş ve üç adet doz belirlenerek beş günlük toksisite çalışması uygulanmıştır. Son olarak tek bir doz belirlenerek farelerde on dört günlük subakut toksisite çalışması gerçekleştirilmiştir. Çoklu doz M47 uygulamalarında da tek doz çalışmasındaki ölçüm ve gözlemler yapılmıştır. 1000 mg/kg tek dozun uygulandığı çalışmada dispne, lokomotor aktivitede azalma, piloereksiyon, kambur duruş ve şiddetli hipotermi gibi ağır toksisite belirtileri tespit edilen hayvanlar sakrifiye edilmiştir. Daha düşük dozlarda hayvanlarda mortalite tespit edilmemiştir. Vücut sıcaklığı ölçümlerinde 300 mg/kg dozunda kontrol grubuna göre hafif derecede hipotermi oluştuğu görülmüştür. Vücut ağırlığı ölçümlerinde ise en fazla kilo kaybının (%7.7 oranında) 300 mg/kg dozunda olduğu bulunmuştur. Daha düşük dozlarda ise önemli kilo kayıpları tespit edilmemiştir. Tekrarlı doz beş gün uygulamasında ise 40, 80 ve 150 mg/kg dozları belirlenerek uygulanmıştır. Klinik gözlemlerde sadece 150 mg/kg dozunda farelerde lokomotor aktivitede düşüş görülmüştür. Düşük dozlarda ise belirgin bir klinik değişiklik saptanmamıştır. Tek doz uygulama sonuçlarına paralel olarak 80 ve 150 mg/kg dozlarında hafif derecede hipotermi oluştuğu gözlenmiştir. Ağırlık ölçümlerinde ise en yüksek kilo kaybının (%6.3 oranında) 150 mg/kg dozunda oluştuğu tespit edilmiştir. Subakut toksisite çalışmasında hayvanlarda yine hafif derecede hipotermi tespit edilmiştir (Gül ve ark., 2022). Bu sonuçlara göre bizim çalışmamızda kullandığımız tür olan sıçanın fareye göre M47 molekülünü daha iyi tolere ettiği sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda yaptığımız hematolojik analizlerde beyaz kan hücreleri ile ilgili parametrelerde bütün gruplarda anlamlı bir yükselme ya da düşüş tespit edilmemiştir. Genel olarak, gruplarda incelenen parametrelerin büyük çoğunluğu istenen referans değer aralığındadır. Buradan M47 uygulanmasıyla sıçanlarda bir enfeksiyon oluşmadığı sonucuna varılmıştır. Monositlerin kandaki yüzdesinde bütün gruplarda bir yükseklik

olduğu görülmüştür. Ancak bu değerler kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bulunmamıştır ($p \geq 0,05$). Monosit ve granülosit seviyelerinde ise sadece 80mg/kg doz grubunda görülen artış anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$). Kırmızı kan hücreleri ile ilgili parametrelerden RBC bütün gruplarda istenen referans aralığında olmasına rağmen hemoglobin değerlerinde bütün gruplarda hafif bir düşüklük olduğu görülmüştür. Yapılan istatistiksel analizlerde de 300 mg/kg doz grubunda görülen RBC, HGB ve HCT değerlerindeki düşüş diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$). Hayvanlarda hafif seyreden bir anemik tablo olduğu söylenebilir ancak hematokrit harici diğer parametreler kontrol gruplarında da düşük olduğu için görülen bu durum M47 uygulanmasıyla ilişkili bulunmamıştır. Trombosit ve pıhtılaşma ile ilişkili parametrelerin beklenen değer aralıklarında olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre M47'nin pıhtı ile ilgili parametrelere etkisi olmadığı söylenebilir.

ALT ve AST enzimleri karaciğer hücreleri tarafından sentezlenir ve bu enzimlerin düzeylerinin artması karaciğer hasarının göstergesidir (Ersoy, 2012). ALT, ASY'ye göre karaciğere daha spesifik bir enzim olarak tanımlanmaktadır. AST enzimi ise karaciğer dokusunda bulunduğu gibi başka birçok dokuda da bulunmaktadır (Limdi ve Hyde, 2003). Çalışmamızda 300 mg/kg dozunda kontrol grubuna göre enzim seviyelerinde belirgin bir artış olduğu görülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 300 mg/kg dozunda özellikle ALT seviyelerinde %50'ye yakın bir artış olmuştur. Bu sonuç doz yükseldikçe karaciğer enzimlerinin seviyesinde artış olduğunu göstermektedir. Ancak yapılan istatistiksel analizlerde ALT ve AST seviyelerinde klinik değerlere göre görülen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p \geq 0,05$). Total bilirubin seviyelerinde görülen artışlar safra yollarındaki problemlerin ve karaciğerde oluşan hasarların belirtecidir. Çalışmamızdaki tüm doz gruplarında total bilirubin seviyelerinde artış görülmemiştir. Bilirubin seviyesinin bütün gruplarda 0,1 mg/dl seviyesinde olduğu bulunmuştur. Bilirubin vücuttan böbrekler aracılığıyla da atılabilmektedir. Bu yüzden karaciğerde oluşan hasar ciddi boyutlara ulaşmadıkça total bilirubin seviyelerinin çok yüksek değerlere ulaşması beklenmemektedir (Agrawal ve ark., 2016). Kreatinin böbreğin hasar görmesi durumunda kanda seviyeleri yükselen bir proteindir. Tüm doz gruplarında kreatinin değerlerinde artış görülmemiştir.

Nekropsi işleminde doz gruplarının hepsinde karaciğer ve peritonda yüzeyel beyaz lezyonlar tespit edilmiştir. Uygulanan doz arttıkça tespit edilen yüzeyel

lezyonların düzeyinin arttığı görülmüştür. Histopatolojik analizlerde 300 mg/kg dozunda tespit edilen karaciğer hasarı anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$). Böbrekte oluşan hasarın tespiti için yapılan analizde ise 120 ($p \leq 0,05$) ve 300 mg/kg dozlarında görülen hasarlar anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,01$). Sıçanlarda 300 mg/kg dozunda mortalite oranı %20'dir. Daha düşük dozların uygulandığın sıçanlarda yapılan klinik gözlemlerde ağır bir toksisite belirtisi ve ölüm tespit edilmemiştir. Önemli bir toksisite belirtisi olan şiddetli kilo kaybı ve ağır derecede hipotermi hayvanlarda tespit edilmemiştir. Ancak biyokimyasal analizlerde hafif derecede ALT ve AST enzimlerinde yükseklik olduğu tespit edilmiştir. Histopatolojik analizlerde de kontrol grubuna göre karaciğer ve böbrekte tespit edilen hasarlar anlamlı bulunmuştur. MTD, ölüme sebep olmayan ancak belirgin derecede toksisiteye neden olabilecek en yüksek doz olarak tanımlanmıştır. Bu nedenle analiz sonuçları değerlendirildiğinde hayvanlarda ağır toksisite oluşmadığı ve yüksek oranda ölüm görülmediği için çalışmamızda M47 için MTD 300 mg/kg olarak tespit edilmiştir.

İlaca verilen yanıt ve tespit edilen yan etkilerde türlere bağlı bazı farklılıklar olduğu kabul edilmiştir. Türlere bağlı görülen bu farklar, özellikle ilaçların veya ilaç adayı moleküllerin farmakokinetik özelliklerin farklılığından kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılımda türler arasında değişkenlikler görülmektedir. Metabolizma, türler arasındaki farklılıkların oluşmasına neden olan en önemli etkendir. Köpek, at, maymun, sıçan ve farede gerçekleştirilen kapsamlı bir çalışmada karaciğerde önemli metabolizma faaliyetlerini gerçekleştiren Sitokrom P450 enzimlerinin farklı türlerde karaciğerdeki aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonunda enzimlerin karaciğerdeki aktivitelerinin türler arasında önemli derecede farklılık gösterdiği bulunmuştur. Bir enzimin başka bir türde bulunmaması ya da aktivitesinin düşük olması ve ya diğer bir türde karaciğerde düşük konsantrasyonda bulunması, faz 1 ve faz 2 ilaç metabolizma reaksiyonlarını gerçekleştiren enzimlerde türler arası farklılık görülmesinin nedenlerindendir. Özellikle Sitokrom P450 enzimlerinde görülen genetik polimorfizm ilacın etkisinin türler ve bireyler arasında farklılık göstermesine neden olan önemli bir diğer etkendir. Deney hayvanlarındaki çalışmalarda bu farklılığı ekarte etmek için bu tür çalışmalarda yakın soylar kullanılmaktadır. Türler arasındaki farklılıkların tespit edilmesi preklinik çalışmalarda hayvanlardan elde edilecek verilerin insana uyarlanması açısından da oldukça

önemlidir. Bu nedenle türler arasındaki farklılıkların tespit edilmesi için deneylerde gelişmiş analitik yöntemler kullanılmaktadır (Baillie ve Rettie, 2011).

Jacevic ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada LD_{50} dozunun belirlenmesi türler arasındaki farkların tespitinde kullanılmıştır. Yapılan çalışmada asetilkolinesteraz reaktivatörlerinden beş molekül, dişi ve erkekler ayrı gruplanarak fare ve sıçanlara i.m yoldan tek doz verilmiştir. Sonuçlarda beş molekülde de sıçan ve fare gruplarında farklı LD_{50} değerleri bulunmuştur. Aynı zamanda aynı türdeki dişi ve erkek cinsiyetteki sıçanlarda da farklı LD_{50} değerleri tespit edilmiştir. Bu sonuca göre tür ve cinsiyetteki farklılıkların meydana gelen toksisiteyi etkilediği görülmüştür (Jacevic ve ark., 2019).

Histopatolojik analizlerde makroskopik ve mikroskopik hasarlar görülmesine rağmen biyokimyasal analizlerde elde edilen sonuçlara göre karaciğer ve böbrek fonksiyonlarının bozulmadığı söylenebilir.

KAYNAKLAR

Agrawal, S., Dhiman, R. K., Limdi, J. K. (2016) Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgraduate Medical Journal,* 92(1086), 34-223. https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2015-133715

Akhila, J. S., Shyamjith, D., Alwar, M. C. (2007) Acute toxicity studies and determination of median lethal dose. *Current Science*, 93(7), 917–920.

Akıncı, E., & Orhan, F. Ö. (2016). Sirkadiyen ritim uyku bozuklukları. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*, *8*(2), 178-189. https://doi.org/10.18863/pgy.81775

Aladağ, A. İ. (2005) Antikonvülsan etkili 3-hidrazon-2-indolin derivesi iki yeni molekülün akut toksisite tayini. İstanbul Üniversitesi, İstanbul.

Arome, D., Chinedu, E., (2013) The importance of toxicity testing. Journal of *Pharmaceutical and BioSciences*, 4, 146-148.

Aschoff, J., Pohl, H. (1978) Phase relations between a circadian rhythm and its zeitgeber within the range of entrainment. *Naturwissenschaften,* 65(2), 4-81. https://doi.org/10.1007/BF00440545

Ashton A., Foster, R. G., Jagannath, A. (2022) Photic entrainment of the circadian system. *International Journal of Molecular Sciences,* 23(2), 729. https://doi.org/10.3390/ijms23020729.

Astiz, M., Heyde, I., Oster, H. (2019) Mechanisms of communication in the mammalian circadian timing system. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2), 343. https://doi.org/10.3390/ijms20020343.

Badiu, C. (2007) Genetic clock of biologic rhythms. *Journal of Cellular and Molecular Medicine,* 7(4), 408-16. https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2003.tb00243.x.

Bae, S. A., Fang, M. Z., Rustgi, V., Zarbl, H., Androulakis, I. P. (2019) At the interface of lifestyle, behavior, and circadian rhythms: metabolic implications. *Frontiers in Nutrition,* 6, 132. https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00132

Baillie, T. A., Rettie, A. E. (2011) Role of biotransformation in drug-induced toxicity: influence of intra- and inter-species differences in drug metabolism. *Drug Metabolism Pharmacokinetics,* 26(1), 15-29. https://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-10-RV-089

Baron K. G., Reid K. J. (2014) Circadian misalignment and health. *International Review of Psychiatry*, 26(2), 54-139. https://doi.org/10.3109/09540261.2014.911149

Bartness, T. J., Song, C. K., Demas, G. E. SCN (2001) Efferents to peripheral tissues: implications for biological rhythms. *Journal of Biological Rhythms*, 16(3), 196-204. https://doi.org/10.1177/074873040101600302

Bass, J., Takahashi, J. S. (2010) Circadian integration of metabolism and energetics. *Science*, 330(6009), 54-1349. https://doi.org/10.1172/jci46043

Baugh, E., Ke, H., Levine, J. A., Bonneau, A. R., Chan, S. C. (2018) Why are there hotspot mutations in the *TP53* gene in human cancers? *Cell Death Differ Differentiation*, 25, 154–160. https://doi.org/10.1038/cdd.2017.180

Berlo, V. D., Woutersen M., Muller, A., Pronk, M., Vriend, J., Hakkart, B. (2022) 10% Body weight (gain) change as criterion for the maximum tolerated dose: A critical analysis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 34, 105235. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2022.105235

Bertoli, C., Skotheim, J. M., De Bruin, R. A. (2013) Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(8), 28-518. https://doi.org/10.1038/nrm3629

Blume, C., Garbazza, C., Spitschan, M. (2019) Effects of light on human circadian rhythms, sleep and mood. *Somnologie*, 23(3), 147-156. https://doi.org/10.1007/s11818-019-00215-x

Botham, A. P. (2002) Acute Systemic Toxicity. *Ilar Journal*, 43(1), 27-30. https://doi.org/10.1093/ilar.43.Suppl_1.S27.

Brown, S. A., Pagani, L., Cajochen, C., Eckert, A. (2011) Systemic and cellular reflections on ageing and the circadian oscillator: a mini-review. *Gerontology*, 57(5), 427-34. https://doi.org/10.1159/000320673

Bruce R.D. (1985) An up-and-down procedure for acute toxicity testing. *Fundamental and Applied Toxicology*, 5(1), 7-151. https://doi.org/10.1016/0272-0590(85)90059-4

Buijs, R. M, Fleur S. E., Wortel, J., Van Heyningen, C., Zuiddam, L., Mettenleiter, T. C., Kalsbeek, A., Nagai, K., Niijima, A. (2003) The suprachiasmatic nucleus balances sympathetic and parasympathetic output to peripheral organs through separate preautonomic neurons. *The Journal of Comparative Neurology*, 464(1), 36-48. doi: https://doi.org/10.1002/cne.10765

Carr, C. J., Kolbye, A. C. Jr. (1991) A critique of the use of the maximum tolerated dose in bioassays to assess cancer risks from chemicals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 14(1), 78-87. https://doi.org/10.1016/0273-2300(91)90053-X

Chen, S. T., Choo, K. B., Hou, M. F., Yeh, K. T., Kuo, S. J., Chang, J. G. (2005) Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers. *Carcinogenesis*, 26(7), 6-1241. https://doi.org/10.1093/carcin/bgi075

Chevret, S. (2014) Maximum Tolerable Dose (MTD). *Wiley online Library: Statistics Reference Online*. https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat07089

Chinedu, E., Arome, D., Ameh, F. S. (2013) A new method for determining acute toxicity in animal models. *International Journal of Toxicology*, 20(3), 6-224. https://doi.org/10.4103/0971-6580.121674

Chu, Y., He, H., Liu, Q., Jia, S., Fan, W., Huang, F. (2022) The circadian clocks, oscillations of pain-related mediators, and pain. *Cellular and Molecular Neurobiology*. https://doi.org/10.1007/s10571-022-01205-8

Colerange, J. B. (2013) Preclinical Development of Non-Oncogenic Drugs (small and large molecules). İçinde A. S. Fagi (Ed.), *A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development.* Detroit: Elsevier; 517-542.

Cox, K. H., Takahashi, J. S. (2019) Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. *Journal of Molecular Endocrinology*, 63(4), R93-R102. https://doi.org/10.1530/jme-19-0153

Cunny, H., Hodgson, E. (2004) Toxicity Testing. İçinde Hudgson, E. (Ed.), *A Textbook of Modern Toxicology*. (3 nd ed.). New jersey: John Wiley & Sons; 353-393.

Cupta C. R. (Ed.). (2012) Toxicological Testing. İçinde S. Magda, A. J. Hargreaves, *Veterinary Toxicology* (2nd ed.). Seattle: Elsevier; 62-79.

Dallmann, R., Brown, S. A., Gachon, F. (2014) Chronopharmacology: new insights and therapeutic implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 54, 339-61. https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-135923

Dardente, H., Cermakian, N. (2007) Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. *Chronobiology International*, 24(2), 195-213. https://doi.org/10.1080/07420520701283693

Di Cara, F., King-Jones K. (2016) The circadian clock is a key driver of steroid hormone production in drosophila. *Current Biology*, 26(18), 2469-2477. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.004

Dibner, C., Schibler, U., Albrecht, U. (2010) The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual Review of Physiology*, 72, 49-517. https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135821

Dickmeis, T. (2009) Glucocorticoids and the circadian clock. *Journal of Endocrinology*, 200(1), 3-22. https://doi.org/10.1677/joe-08-0415

Doghramji, K. (2007) Melatonin and its receptors: a new class of sleep-promoting agents. *Journal of Clinical Sleep Medicine*, 15(3), 17-23.

Doruk, Y. U., Yarparvar, D., Akyel, Y. K., Gul, S., Taskin, A. C., Yilmaz, F., Baris, I., Ozturk, N., Türkay, M., Ozturk, N., Okyar, A., Kavakli, I. H. (2020) A CLOCK-binding small molecule disrupts the interaction between CLOCK and BMAL1 and enhances circadian rhythm amplitude. *Journal of Biological Chemistry*, 295(11), 3518-3531. https://doi.org/10.1074/jbc.ra119.011332

Duan, J., Greenberg, E.N, Karri S., S, Andersen B. (2021) The circadian clock and diseases of the skin. *Febs Letters*, 595(19), 2413-2436. https://doi.org/10.1002/1873-3468.14192

Dubocovich, M. L. (2007) Melatonin receptors: role on sleep and circadian rhythm regulation. *Sleep Medicine*, 3, 34-42. https://doi.org/10.1016/j.sleep.2007.10.007

Dunlap, J. C. (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96(2), 90-271. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80566-8

Eaton, D. L., Gallagher, E. P. (2010) General Overview of Toxicology. İçinde *Comprehensive Toxicology*. (2 nd ed.). Seattle: Elsevier; 1-46.

Eide, E. J., Woolf, M. F., Kang, H, Woolf, P., Hurst, W., Camacho, F., Vielhaber, E. L., Giovanni, A., Virshup, D. M. (2005) Control of mammalian circadian rhythm by ckiepsilon-regulated proteasome-mediated PER2 degradation. *Molecular and Cellular Biology*, 25(7), 2795-807. https://doi.org/10.1128/MCB.25.7.2795-2807.2005

Eng, G.W. L., Edison, Virshup, D. M. (2017) Site-specific phosphorylation of casein kinase 1 δ (CK1δ) regulates its activity towards the circadian regulator PER2. *Plos One*, 12(5), e0177834. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177834

Erhirhie, E. O., Ihekwereme, C. P, Ilodigwe, E. E. (2018) Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptance. *Interdisciplinary Toxicology*, 11(1), 5-12. https://doi.org/10.2478/intox-2018-0001

Ersoy, O. (2012) Karaciğer enzim yüksekliğinin değerlendirilmesi. *Ankara Medical Journal*, 12(3), 129-135.

Fagiani, F., Di Marino, D., Romagnoli, A., Travelli, C., Voltan, D., Mannelli L. C., Racchi M, Govoni, S., Lanni, C. (2022) Molecular regulations of circadian rhythm and implications for physiology and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 41. https://doi.org/10.1038/s41392-022-00899-y

Farhud D., Aryan Z. (2018) Circadian rhythm, lifestyle and health: A narrative review. *Iranian Journal Public Health*, 47(8), 1068-1076.

Ferreira, F., Takahashi, J.S. (2019) Genomics of circadian rhythms in health and disease. *Genome Med* 11, 82. https://doi.org/10.1186/s13073-019-0704-0

Fischer I, Milton C, Wallace H. (2020) Toxicity testing is evolving. Toxicological Research, 9(2), 67-80. https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa011

Fisk, A. S., Tam, S. K. E., Brown, L. A., Vyazovskiy, V. V., Bannerman, D. M., Peirson, S. N. (2018) Light and cognition: roles for circadian rhythms, sleep, and arousal. *Frontiers Neurology*, 9, 9-56. https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00056

Fronken, K. L. (2013) Hysiological consequences of circadian disruption by nighttime light exposure. The Ohio State University, Columbus.

Fu, L., Lee, C. C. (2003) The circadian clock: pacemaker and tumour suppressor. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 350-61. https://doi.org/10.1038/nrc1072.

Gad, S. C. (2014) Maximum Tolerated Dose. İçinde Wexler, P. (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology*. (3 nd ed.). Seattle: Elsevier; 164.

Gad, S. C., Spainhour, C. B., Shoemake, C., Pallman, DR, Stricker-Krongrad, A., Downing, P. A., Seals, R. E., Eagle, L. A., Polhamus, K., Daly, J. (2016) Tolerable levels of nonclinical vehicles and formulations used in studies by multiple routes in multiple species with notes on methods to improve utility. *International Journal of Toxicology*, 35(2), 95-178. https://doi.org/10.1177/1091581815622442

Golombek, D. A., Rosenstein R. E. (2010) Physiology of circadian entrainment. *Physiological Reviews*, 90(3), 102-1021063. https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2009

Gordon, C. J. (1991) Toxic-induced hypothermia and hypometabolism: do they increase uncertainty in the extrapolation of toxicological data from experimental animals to humans? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 15(1), 8-95. https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80098-3

Griebel, G., Ravinet-Trillou, C., Beeské, S., Avenet, P., Pichat, P. (2014) Mice deficient in cryptochrome 1 (cry1 (-/-)) exhibit resistance to obesity induced by a high-fat diet. *Frontiers Endocrinology,* 9:5-49. https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00049

Gül, Ş. (2019) *Identification of small molecules regulating the Cryptochrome activity in the mammalian circadian clock*. Koç Üniversitesi, Doktora Tezi. İstanbul.

Gül, Ş., Akyel, Y. K., Gül, M. Z., Işın, Ş., Korkmaz, T., Selvi, S., Danis, İ., İpek, S. Ö., Aygenli, F., Taşkın, A. C., Öztürk, N., Öztürk, N., Ünal, Ö. D., Güzel, M., Turkay, M., Okyar, A., Kavakli, H. İ. (2022) Discovery of a small molecule that selectively destabilizes Cryptochrome 1 and enhances life span in p53 knockout mice. *Nature Communications, 13, 6742.*

Gülsar, M. G., Özdemir, H. N., Çeviker, K., Bağcı, Ö., Tatar, B., Yazkan, R., Erdemoğlu, E. (2016). Tümorogenezde p53 geni ve genetik tedavi yaklaşımları. *Mühendislik Bilimleri ve Tasarım Dergisi*, 4 (2), 133-135. https://doi.org/10.21923/jesd.66232

Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M., Yau, K. W. (2002) Melanopsin-containing retinal ganglion cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science,* 295, 1065–1070. https://doi.org/10.1126/science.1069609.

Herzog, E., D. (2007) Neurons and networks in daily rhythms. *Nature Reviews Neuroscience,* 8(10), 790-802. https://doi.org/10.1038/nrn2215

Hirano, A., Yumimoto, K., Tsunematsu, R., Matsumoto, M., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Nakagawa, T., Lanjakornsiripan, D., Nakayama, K. I, Fukada, Y. (2013) FBXL21 regulates oscillation of the circadian clock through ubiquitination and stabilization of cryptochromes. *Cell,* 152**(**5), 18-1160. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.054

Hsu, C. N., Tain, Y. L. (2020) Light and circadian signaling pathway in pregnancy: programming of adult health and disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2232. https://doi.org/10.3390/ijms21062232

Humason, G. L. (1972) Animal Tissue Techniques, San Fransisco: H.W. Freeman and Company.

Izumo, M., Pejchal, M., Schook, A. C., Lange, R. P., Walisser, J. A., Sato, T. R., Wang, X., Bradfield, C. A., Takahashi, J. S. (2014) Differential effects of light and feeding on circadian organization of peripheral clocks in a forebrain Bmal1 mutant. *Elife*, 19, 3-e04617. https://doi.org/10.7554/eLife.04617

Jaćević, V., Nepovimova, E., Kuča, K. (2019) Interspecies and intergender differences in acute toxicity of K-oximes drug candidates. *Chemico-Biological Interactions*, 308, 312-316. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.035

Jung, C. H., Kim, E. M., Park, J. K., Hwang, S. G., Moon, S. K., Kim, W. J., Um, H.D. (2013) Bmal1 suppresses cancer cell invasion by blocking the phosphoinositide 3-kinase-akt-mmp-2 signaling pathway. *Oncology Reports,* 29(6), 13-2109. https://doi.org/10.3892/or.2013.2381

Kalsbeek, A., Palm, I. F., La Fleur S. E., Scheer, F. A., Perreau-Lenz, S., Ruiter, M., Kreier, F., Cailotto, C., Buijs, R. M. (2006) SCN outputs and the hypothalamic balance of life. *Journal of Biological Rhythms*, 21(6), 69-458. https://doi.org/10.1177/0748730406293854

Kavaklı H. İ., Baris, I., Tardu, M., Gül Ş, Öner, H., Çal, S., Bulut, S., Yarparvar, D., Berkel, Ç., Ustaoğlu, P., Aydın, C. (2017) The photolyase/cryptochrome family of proteins as DNA repair enzymes and transcriptional repressors. *Photochemistry and Photobiology,* 93(1), 93-103. https://doi.org/10.1111/php.12669

Kavaklı, H. İ., Gül Ş., Türkay, M. (2022) Identification of novel small molecules targeting core clock proteins to regulate circadian rhythm. *Current Opinion in Chemical Engineering,* 35, 100730. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2249-0_2

Kennedy, M.C., Lowe, S.W. (2022) Mutant p53: it's not all one and the same. *Cell Death & Differentiation,* 29, 983–987. https://doi.org/10.1038/s41418-022-00989-y

Ko, C. H., Takahashi, J. S. (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*, 15, 2-R271-7. https://doi.org/10.1093/hmg/ddl207

Koch, A. A., Bagnall, J. S., Smyllie, N. J., Begley, N., Adamson, A. D., Fribourgh, J. L., Spiller, D. G., Meng, Q. J., Partch, C. L., Strimmer, K., House, T. A., Hastings, M. H. (2022). Quantification of protein abundance and interaction defines a mechanism for operation of the circadian clock. *Elife*, 14**,** 11-e73976. https://doi.org/10.7554/eLife.73976

Korkmaz, T., Aygenli, F., Emisoglu, H., Ozçelik, G., Canturk, A., Yilmaz, S., Ozturk, N. (2018) Opposite carcinogenic effects of circadian clock gene BMAL1. *Scientific Reports*, 8, 16023. https://doi.org/10.1038/s41598-018-34433-4

Kowalska, E., Brown, S. A. (2007) Peripheral clocks: keeping up with the master clock. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 72, 5-301. https://doi.org/10.1101/sqb.2007.72.014

Kumar, P. M., Suba, V., Ramireddy, B., Babu, P. S. (2014). Acute and sub-acute (28-day) oral toxicity studies of ethanolic extract of *Celtis Timorensis* leaves in rodents. Global *Journal of Medical Research*, 14(B3), 7–13.

Kwok M. C. K., Stankovic, T. (2019) Targeting the Ataxia Telangiectasia and Rad3 Signaling Pathway to Overcome Chemoresistance In Cancer. İçinde D.E. Johnson (ed.), *Targeting Cell Survival Pathways to Enhance Response to Chemotherapy*. Elsevier; 203-230.

Lamia, K. A., Sachdeva, U. M., DiTacchio, L., Williams, E. C., Alvarez, J. G., Egan, D. F., Vasquez, D. S., Juguilon, H., Panda, S., Shaw, R. J., Thompson, C. B., Evans, R. M. (2009) AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science*, 326(5951), 40-437. https://doi.org/10.1126/science.1172156

Langmesser, S., Tallone, T., Bordon, A., Rusconi, S., Albrecht U. (2008) Interaction of circadian clock proteins PER2 and CRY with BMAL1 and CLOCK. *BMC Molecular Biology*, 22, 9-41. https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-41

Lesicka, M., Jablonska, E., & Wieczorek, E., & Kalinowski, L., Skokowski, J., Seroczyńska, B., Wasowicz, W., Reszka, E. (2016). Disturbed expression of core circadian genes in breast cancer, 5th Polish Congress of Genetics, Eylül-2016, Lodz, Poland.

Lévi, F., Okyar, A., Dulong, S., Innominato, P. F., Clairambault, J. (2010) Circadian timing in cancer treatments. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50, 377-421. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094626

Levi, F., Schibler, U. (2007) Circadian rhythms: mechanisms and therapeutic implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47, 593-628. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105208

Limdi, J. K., Hyde, G. M. (2003) Evaluation of abnormal liver function tests. *Postgraduate Medical Journal,* 79(932), 12-307. http://dx.doi.org/10.1136/pmj.79.932.307

Lin, H. H., Farkas, M. E. (2018) Altered circadian rhythms and breast cancer: from the human to the molecular level. *Frontiers Endocrinology*, 9, 219. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00219

Liu, A. C., Lewis, W. G., Kay, S. A. (2007) Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets. *Nature Chemical Biology,* 3(10), 9-630. https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.37

Man, A. W. C., Li, H., Xia. N. (2021) Circadian rhythm: potential therapeutic target for atherosclerosis and thrombosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 676. https://doi.org/10.3390/ijms22020676

Maury, E., Ramsey, K. M., Bass J. (2010) Circadian rhythms and metabolic syndrome: from experimental genetics to human disease. *Circulation Research*, 106(3), 62-447. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.208355

Meyer-Bernstein, E. L., Jetton, A. E., Matsumoto, S. I., Markuns, J. F., Lehman, M. N., Bittman, E. L. (1999) Effects of suprachiasmatic transplants on circadian rhythms of neuroendocrine function in golden hamsters. *Endocrinology,* 140(1), 18-207. https://doi.org/10.1210/endo.140.1.6428

Mistlberger, R. E., Skene, D.J. (2005) Nonphotic entrainment in humans*? Journal of Biological Rhythms*, 20(4), 52-339. https://doi.org/10.1177/0748730405277982

Mohawk, J. A., Green C. B., Takahashi, J. S. (2012) Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annual Review of Neuroscience*, 35, 62-445. https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-060909-153128

Morgan, M. N., Dvuchbabny, S., Martinez, C. A., Kerr, B., Cistulli, P. A., Cook, K. M. (2019) The cancer clock is (not) ticking: links between circadian rhythms and cancer. *Clocks Sleep*, 1(4), 435-458. https://doi.org/10.3390/clockssleep1040034

Morris, A. R., Stanton, D. L, Roman, D., Liu, A. C. (2020) Systems level understanding of circadian integration with cell physiology. *Journal of Molecular Biology,* 432(12), 3547-3564. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.02.002

National Research Council (US). (1993). *Committee on Risk Assessment Methodology. Issues in Risk Assessment.* Washington (DC): National Academies Press (US).

OECD (2001, Aralık). OECD 420 Guideline for the Testing of Chemicals Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. Erişim 20.12.2022, https://doi.org/10.1787/9789264070943-en

OECD (2001, Aralık). OECD 423 Guideline for the Testing of Chemicals Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method. Erişim 20.12.2022, https://doi.org/10.1787/20745788

OECD (2008, Ocak). OECD 425 Guideline for the Testing of Chemicals Acute Oral Toxicity - Up-and-Down Procedure. Erişim 20.12.2022, https://doi.org/10.1787/20745788

OSHA (2017, Mart). Hazard Communication Information Sheet reflecting the US OSHA Implementation of the Globally Harmonized System (GHS) of Classification and Labelling of Chemicals - Specific Target Organ Toxicity – Single Exposure. Erişim 28.12.2022, https://www.schc.org/assets/docs/ghs_info_sheets/specific_target_organ_toxicity-single_exposure.pdf

OSHA (2018, Mart). Hazard Communication Information Sheet reflecting the US OSHA Implementation of the Globally Harmonized System (GHS) of Classification and Labelling of Chemicals - Skin Corrosion / Irritation. Erişim 28.12.2022, https://www.schc.org/assets/docs/ghs_info_sheets/Skin%20Corrosion%20%20Irritation%20(Final%202018-03).pdf

OSHA (2018, Mart). Hazard Communication Information Sheet reflecting the US OSHA Implementation of the Globally Harmonized System (GHS) of Classification and Labelling of Chemicals - Serious Eye Damage / Eye Irritation. Erişim 28.12.2022, https://www.schc.org/assets/docs/ghs_info_sheets/Eye%20Damage%20Irritation%20Final%202018-03.pdf

Ozturk, N., Lee, J. H., Gaddameedhi, S., Sancar, A. (2009) Loss of cryptochrome reduces cancer risk in p53 mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 106(8), 6-2841. https://doi.org/10.1073/pnas.0813028106

Ozturk, N., Ozturk, D., Kavaklı, I. H., Okyar, A. (2017) Molecular aspects of circadian pharmacology and relevance for cancer chronotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10), 2168. https://doi.org/10.3390/ijms18102168

Parasuraman S. (2011) Toxicological screening. *Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 2(2), 9-74. https://doi.org/10.4103/0976-500x.81895

Pévet P. (2014) The internal time-giver role of melatonin. A key for our health. *Revue Neurologique*, 170(11), 52-646. https://doi.org/10.1016/j.neurol.2014.05.008

Pevet, P., Klosen, P., Felder-Schmittbuhl M. P. (2017) The hormone melatonin: animal studies. *Best Practice and Research Clin Endocrinology Metabolism*, 31(6), 547-559. https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.10.010

Pfeffer, M., Von G. C., Wicht, H., Korf, H. W. (2022) The role of the melatoninergic system in circadian and seasonal rhythms-insights from different mouse strains. *Frontiers Physiology*, 13, 883637. https://doi.org/10.3389/fphys.2022.883637

Pijut, S. (2017) Factors regulating features of metabolic syndrome. University of Kentucky, Doktora Tezi. Kentucky.

Pilorz, V., Astiz, M., Heinen, K. O., Rawashdeh, O., Oster, H. (2020) The concept of coupling in the mammalian circadian clock network. *Journal of Molecular Biology*, 432(12), 3618-3638. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.12.037

Plano, S. A., Casiraghi, L. P., Moro G. P., Paladino, N., Golombek, D. A., Chiesa, J. J. (2017) Circadian and metabolic effects of light: implications in weight homeostasis and health. *Frontiers Neurology*, 8, 558. https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00558

Preitner, N., Damiola, F., Lopez-Molina, L., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., Schibler, U. (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB-alpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell*, 110(2), 60-251. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00825-5

Rang, H. P., Hill, R. P. (Ed.). (2013) Assessing Drug Safety. İçinde H. P. Rang, R. P. Hill, *Drug Discovery and Development*. (2nd ed.). Seattle: Elsevier; 211-225

Rao, D., Yu, H., Bai, Y., Zheng, X., Xie, L. (2015) Does night-shift work increase the risk of prostate cancer? a systematic review and meta-analysis. *Oncotargets and Therapy* 8, 26-2817. https://doi.org/10.2147/ott.s89769

Reppert, S. M., Weaver, D. R. (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. Circadian Rhythm. *Annual Review of Physiology*, 63, 76-647. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.647

Richter, H. G., Torres-Farfán, C., Rojas-García, P. P., Campino, C., Torrealba, F., Serón-Ferré, M. (2004) The circadian timing system: making sense of day/night gene expression. *Biological Research*, 37(1), 11-28. http://dx.doi.org/10.4067/S0716-97602004000100003

Rijo-Ferreira, F., Takahashi, J.S. (2019) Genomics of circadian rhythms in health and disease. *Genome Medicine,* 11(82). https://doi.org/10.1186/s13073-019-0704-0

Ritonja, J., Papantoniou, K., Ebenberger, A., Wagner, G., Gartlehner, G., Klerings, I., Morgan, R. L, Herkner, H., Aronson, K. J., Schernhammer, E. S. (2019) Effects of exposure to night shift work on cancer risk in workers. *Cochrane Database and Systematic Review*. (11), 1465-1858. https://doi.org/10.1002/14651858.CD013466

Roenneberg, T, Merrow, M. (2016) The Circadian Clock and Human Health. *Current Biology*, 26(10), 43-432. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.011

Roenneberg, T., Kantermann, T., Juda, M., Vetter, C., Allebrandt, K.V. (2013) Light and the human circadian clock. *Handbook of Experimental Pharmacology,* 217, 31-311. doi: 10.1007/978-3-642-25950-0_13.

Ruan, W., Yuan, X., Eltzschig, H.K. (2021). Circadian rhythm as a therapeutic target. *Nature Reviews Drug* Discovery, 20, 287. https://doi.org/10.1038/s41573-020-00109-w

Rutter, J., Reick, M., McKnight S. L. (2002) Metabolism and the control of circadian rhythms. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 307. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.090501.142857

Sachana, M., Hargreaves, A., (2012) Toxicological Testing: In Vivo and In Vitro Models. İçinde. C. C. Ramesh (Ed.), Veterinary Toxicology (2 nd ed.) Academic Press: USA; 62-79.

Saganuwan, S. A. (2017) Toxicity studies of drugs and chemicals in animals: an overview. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 20(4), 291-318. https://doi.org/10.15547/BJVM.983

Sahar, S., Sassone-Corsi, P. (2012) Regulation of metabolism: the circadian clock dictates the time. *Trends in Endocrinology Metabolism*, 23(1), 1-8. https://doi.org/10.1016/j.tem.2011.10.005

Sancar, A, Van Gelder, R. N. (2021) Clocks, cancer, and chronochemotherapy. *Science*, 371(6524), eabb0738. https://doi.org/10.1126/science.abb0738

Saper, C., Scammell, T., Lu, J. (2005) Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*, 437, 1257–1263. https://doi.org/10.1038/nature04284

Sass, N. (2000) Humane endpoints and acute toxicity testing. *Ilar Journal*, 41(2), 23-114. https://doi.org/10.1093/ilar.41.2.114

Savalli, G., Diao, W., Berger, S., Ronovsky, M., Partonen, T., Pollak, D. D. (2015) Anhedonic behavior in cryptochrome 2-deficient mice is paralleled by altered diurnal patterns of amygdala gene expression. *Amino Acids*, 7(7), 77-1367. https://doi.org/10.1007/s00726-015-1968-3

Saygı, Ş. (2003) Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45(3), 291- 298

Shan, Y., Abel J. H., Li, Y., Izumo, M., Cox K. H., Jeong, B., Yoo S. H., Olson, D. P., Doyle F. J., Takahashi J. S. (2020) Dual-color single-cell imaging of the suprachiasmatic nucleus reveals a circadian role in network synchrony. *Neuron*, 108(1), 164-179. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.07.012

Shostak A. (2017) Circadian clock, cell division, and cancer: from molecules to organism. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4), 873. https://doi.org/10.3390/ijms18040873

Shostak, A. (2012) The role of adipose tissue circadian clocks in metabolic maintenance. Lübeck university, Bitirme Tezi, Göttingen.

Sotocinal, S. G., Sorge, R. E, Zaloum, A., Tuttle, A. H, Martin, L. J., Wieskopf, J. S., Mapplebeck, J.C., Wei, P., Zhan, S., Zhang, S., McDougall, J. J., King, O. D., Mogil, J. S. (2011) The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular Pain*, 7-55. https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-55

Stallard, N, Whitehead, A. (1995) Reducing animal numbers in the fixed-dose procedure. *Human & Experimental Toxicology*, 14(4), 23-315. https://doi.org/10.1177/096032719501400401

Stampfer, H. G., Gabb, G. M., Dimmitt, S. B. (2019) Why maximum tolerated dose? *British Journal of Clinical Pharmacology*, 85(10), 2213-2217. https://doi.org/10.1111/bcp.14032

Stephenson, E. M, Usselmann, L. E. J., Tergaonkar, V., Virshup, D. M., Dallmann, R. (2021) Cancer clocks in tumorigenesis: the p53 pathway and beyond. *Endocrine-Related Cancer*, 28(4), R95-R110. https://doi.org/10.1530/ERC-20-0475

Stoynev, G. A., Ikonomov, O. C., Stoynev A. N. (2021) Suprachiasmatic hypothalamic nuclei (SCN) in regulation of homeostasis: a role beyond circadian control? *Biological Rhythm Research*, 53(8), 1226-1243. https://doi.org/10.1080/09291016.2021.1920125

Strickland, J., Clippinger, A. J., Brown, J., Allen, D., Jacobs, A., Matheson, J., Lowit, A., Reinke, E. N., Johnson, M. S., Quinn, M. J, Mattie, D., Fitzpatrick, S. C., Ahir, S., Kleinstreuer, N., Casey, W. (2018) Status of acute systemic toxicity testing requirements and data uses by U.S. regulatory agencies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 94, 183-196. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.01.022.

Tahara, Y., Aoyama, S., Shibata, S. (2017) The mammalian circadian clock and its entrainment by stress and exercise. *The Journal of Physiological Sciences*, 67, 1–10. https://doi.org/10.1007/s12576-016-0450-7

Takahashi, J. S. (2017) Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature Reviews Genetics*, 18(3), 164-179. https://doi.org/10.1038/nrg.2016.150.

Tartour, K., Padmanabhan, K. (2022) The clock takes shape-24 h dynamics in genome topology. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3, 9-799971. https://doi.org/10.3389/fcell.2021.799971

Thomas, J. M., Kern, P. A., Bush H. M., McQuerry, K. J., Black, W.S., Clasey, J. L., Pendergast, J. S. (2020) Circadian rhythm phase shifts caused by timed exercise vary with chronotype. *JCI Insight*, 5(3), e134270. https://doi.org/10.1172/jci.insight.134270

Turek, F. W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Losee-Olson, S., Easton, A., Jensen, D. R., Eckel, R. H., Takahashi, J. S., Bass, J. (2005) Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science*, 308(5724), 5-1043 https://doi.org/10.1126/science.1108750

Ürkekoğlu, P., Giray, B. K., Başaran, N. (2011) 3R principle and alternative toxicity testing methods. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36(2), 101-117.

Vandivort, T. C., Eaton, D. L. (2014) Principles of Toxicology. *Reference Module in* Biomedical Sciences. (3 nd ed.). Seattle: Elsevier.

Vitaterna, M. H., Takahashi, J. S., Turek, F. W. (2001) Overview of circadian rhythms. *Alcohol Research and Health*, 25(2), 85-93.

Walum E. (1998) Acute oral toxicity. *Environmental Health Perspectives*, 106(2), 497-503. https://doi.org/10.1289/ehp.98106497

Wang, Z. (2021) Regulation of cell cycle progression by growth factor-induced cell signaling. *Cells*, 10(12), 3327. https://doi.org/10.3390/cells10123327

Yalçin, M., Mundorf, A., Thiel, F., Amatriain-Fernández, S., Kalthoff, I. S., Beucke, J. C., Budde, H., Garthus-Niegel, S., Peterburs, J., Relógio, A. (2022) It's about time: the circadian network as time-keeper for cognitive functioning, locomotor activity and mental health. *Frontiers Physiology*, 13, 873237. https://doi.org/10.3389/fphys.2022.873237

Yang, G., Chen, L., Grant, G. R., Paschos G, Song, W. L., Musiek, E. S., Lee, V., McLoughlin, S. C., Grosser, T., Cotsarelis, G., FitzGerald, G. A. (2016) Timing of expression of the core clock gene Bmal1 influences its effects on aging and survival. *Science Translational Medicine*, 8(324), 324ra16. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad3305

Ye, R., Selby, C. P., Chiou, Y. Y., Ozkan-Dagliyan, I., Gaddameedhi, S., Sancar, A. (2014) Dual modes of CLOCK:BMAL1 inhibition mediated by Cryptochrome and Period proteins in the mammalian circadian clock. *Genes & Development.* 28(18):98-1989. https://doi.org/10.1101/gad.249417.114

Yoo, S. H., Mohawk, J. A., Siepka, S. M., Shan, Y., Huh, S. K., Hong, H. K., Kornblum, I., Kumar, V., Koike, N., Xu, M., Nussbaum, J., Liu, X., Chen, Z., Chen, Z. J., Green, C. B., Takahashi, J. S. (2013) Competing E3 ubiquitin ligases govern circadian periodicity by degradation of CRY in nucleus and cytoplasm. *Cell,* 152(5):105-1091. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.055

Yoo, S. H., Yamazaki, S., Lowrey, P. L., Shimomura, K., Ko, C. H., Buhr, E. D., Siepka, S. M., Hong, H. K., Oh, W. J., Yoo, O. J., Menaker, M., Takahashi, J. S. (2004) PERIOD2:LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 101(15), 5339-5346. https://doi.org/10.1073/pnas.0308709101

Yuan, X. S, Wei, H. H, Xu, W., Wang, L., Qu, W. M., Li, R.X., Huang ZL. (2018) Whole-brain monosynaptic afferent projections to the cholecystokinin neurons of the suprachiasmatic nucleus. *Frontiers Neuroscience*, 12, 807. https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00807

Zhang, Q., Zeng, S. X., Lu, H. (2015) Determination of maximum tolerated dose and toxicity of inauhzin in mice. *Toxicology Reports*, 2, 546-554. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.02.011

Zhao, X, Cho, H, Yu, R. T, Atkins, A. R., Downes, M., Evans, R. M. (2014) Nuclear receptors rock around the clock. *EMBO Reports*, 15(5), 518-28. https://doi.org/10.1002/embr.201338271

Zisapel, N. (2018) New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *British Journal of Pharmacology*, 175(16), 3190-3199. https://doi.org/10.1111/bph.14116

Zou, X., Kim, D. W., Gotoh, T., Liu, J., Kim, J. K., Finkielstein, C. V. (2020) A systems biology approach identifies hidden regulatory connections between the circadian and cell-cycle checkpoints. *Frontiers Physiology*, 11, 327. https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00327

ETİK KURUL KARARI

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KRİPTOKROM1 PROTEİN YIKIMINI HIZLANDIRAN M47 MOLEKÜLÜNÜN SIÇANDA MAKSİMUM TOLERE

ORİJİNALLİK RAPORU

%5	%5	%1	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%2
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
4	koreascience.or.kr İnternet Kaynağı	<%1
5	acikerisim.aku.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	docplayer.me İnternet Kaynağı	<%1
7	docs.neu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	www.eurasianbiochem.org İnternet Kaynağı	<%1

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

ÖZGEÇMİŞ