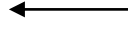


YASEMİN KÜBRA AKYEL

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

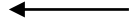
DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2021



Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak  
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya  
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;  
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( DOKTORA TEZİ )**

**KAPESİTABİNİN FAREDEKİ  
KRONOFARMAKOKİNETİĞİNİN İNCELENMESİ**

**YASEMİN KÜBRA AKYEL**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. ALPER OKYAR**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI  
FARMAKOLOJİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2021**

## TEZ ONAYI



## BEYAN

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

## İTHAF

Sevgili Aileme ve Saygıdeğer Hocalarıma ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Doktora sürecim boyunca hem akademik yol göstericiliği hem de manevi desteğiyle her zaman yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, doktora eğitimimin her anını verimli ve üretken geçirmemi sağlayan, sabrını ve ilgisini daima hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Alper Okyar'a,

Tez çalışmalarım konusunda desteğini esirgemeyen ve Koç Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda çalışmama imkan sağlayan, ikinci danışman hocam sayın Prof. Dr. Halil Kavaklı'ya,

Doktora eğitimim süresince bilgi ve donanımlarından yararlandığım, başta Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sönmez Uydeş Doğan olmak üzere Anabilim Dalı'ndaki değerli öğretim üyelerine ve Sayın Prof. Dr. Feyza Arıcıoğlu'na,

Doktora çalışmalarım boyunca her konuda desteklerini hissettiğim değerli çalışma arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Narin Öztürk, Arş. Gör. Dr. Dilek Öztürk Civelek'e ve değerli hocam Doç. Dr. Zeliha Pala Kara'ya,

Moleküler çalışmalar konusunda bana destek olan ve birçok deney tekniğini öğrenmemi sağlayan değerli çalışma arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Şeref Gül'e,

LC-MS analizleri konusundaki yardımları için Doç. Dr. Işıl Gazioğlu'na,

Bursiyeri olduğum 1003 Öncelikli Alanlar Ar-Ge Projesi'yle doktora sürecimde maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a,

Deneylerde kullandığımız kapesitabin etken maddesini her ihtiyaç duyduğumuzda bize sağlayan Koçak Farma'ya,

Doktora sürecimde desteklerini sunan değerli Ecz. Mehmet Cavit Ulcay'a

Yaşamım boyunca olduğu gibi doktora eğitimim süresince de sevgi ve anlayışlarıyla yanımda olan Sevgili Ailem'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-30939

## İÇİNDEKİLER

|                                                      |      |
|------------------------------------------------------|------|
| TEZ ONAYI .....                                      | İİ   |
| BEYAN.....                                           | İİİ  |
| İTHAF.....                                           | İV   |
| TEŞEKKÜR.....                                        | V    |
| İÇİNDEKİLER .....                                    | VI   |
| TABLolar LİSTESİ.....                                | X    |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....                               | Xİİ  |
| SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....                | XVİ  |
| ÖZET .....                                           | XXİ  |
| ABSTRACT.....                                        | XXİİ |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ.....                                | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....                              | 4    |
| 2.1. Sirkadiyan Zamanlama Sistemi .....              | 4    |
| 2.1.1. Merkezi Saat: Suprakiazmatik Çekirdek.....    | 6    |
| 2.1.2. Periferik Saatler.....                        | 10   |
| 2.1.3. Sirkadiyan Saatin Moleküler Mekanizması ..... | 10   |
| 2.2. Kronofarmakoloji.....                           | 13   |
| 2.2.1. Kronofarmakokinetik .....                     | 14   |
| 2.2.1.1. Absorpsiyon .....                           | 15   |
| 2.2.1.2. Dağılım.....                                | 17   |
| 2.2.1.3. Metabolizma.....                            | 18   |
| 2.2.1.4. Eliminasyon.....                            | 20   |
| 2.2.2. Kronofarmakodinamik .....                     | 22   |
| 2.3. Kronoterapi .....                               | 24   |
| 2.4. Kapesitabin .....                               | 31   |
| 2.4.1. Genel Özellikleri .....                       | 31   |
| 2.4.1.1. Etki Mekanizması.....                       | 31   |
| 2.4.1.2. Endikasyonları.....                         | 33   |
| 2.4.1.3. Kontrendikasyonları .....                   | 34   |
| 2.4.1.4. Advers Etkiler .....                        | 34   |

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4.2. Klinik Farmakokinetiği .....                                  | 36 |
| 2.4.2.1. Absorpsiyon .....                                           | 36 |
| 2.4.2.2. Dağılım.....                                                | 36 |
| 2.4.2.3. Metabolizma.....                                            | 37 |
| 2.4.2.4. Eliminasyon.....                                            | 38 |
| 2.4.3. Deney Hayvanlarındaki Farmakokinetiği .....                   | 39 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                              | 41 |
| 3.1. Materyal .....                                                  | 41 |
| 3.1.1. Kimyasallar ve Laboratuvar Malzemeleri.....                   | 41 |
| 3.1.2. Cihazlar ve Aletler .....                                     | 42 |
| 3.1.3. Bilgisayar Yazılımları .....                                  | 43 |
| 3.2. Deney Hayvanları ve Senkronizasyon .....                        | 43 |
| 3.3. Kronofarmakokinetik Çalışma.....                                | 44 |
| 3.3.1. İlaç Uygulama ve Numune Toplama .....                         | 44 |
| 3.3.2. Kapesitabinin Analitik Tayin Metodu.....                      | 45 |
| 3.3.2.1. Mobil Fazın Hazırlanması.....                               | 45 |
| 3.3.2.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması .....                    | 46 |
| 3.3.2.3. Ekstraksiyon.....                                           | 46 |
| 3.3.2.4. Metot Validasyonu .....                                     | 47 |
| 3.3.3. 5'DFCR ve 5'DFUR Metabolitlerinin Analitik Tayin Metodu ..... | 47 |
| 3.3.3.1. Mobil Fazın Hazırlanması.....                               | 48 |
| 3.3.3.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması .....                    | 49 |
| 3.3.3.3. Ekstraksiyon.....                                           | 49 |
| 3.3.3.4. Metot Validasyonu .....                                     | 49 |
| 3.3.4. 5-FU Metabolitinin Analitik Tayin Metodu.....                 | 49 |
| 3.3.4.1. Mobil Fazın Hazırlanması.....                               | 50 |
| 3.3.4.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması .....                    | 50 |
| 3.3.4.3. Ekstraksiyon.....                                           | 51 |
| 3.3.4.4. Metot Validasyonu .....                                     | 51 |
| 3.3.5. Farmakokinetik Parametrelerin Hesaplanması .....              | 51 |
| 3.3.6. İstatistiksel Analiz.....                                     | 52 |
| 3.4. Moleküler Çalışma.....                                          | 52 |
| 3.4.1. mRNA Ekspresyonlarının Belirlenmesi.....                      | 52 |

|                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.1.1. Karaciğer dokusundan RNA izolasyonu.....                                                                                     | 52 |
| 3.4.1.2. cDNA Sentezi.....                                                                                                            | 53 |
| 3.4.1.3. mRNA Ekspresyonlarının belirlenmesi .....                                                                                    | 53 |
| 3.4.2. Protein Düzeylerinin Belirlenmesi.....                                                                                         | 54 |
| 3.4.2.1. Karaciğer Dokusundan Protein İzolasyonu.....                                                                                 | 54 |
| 3.4.2.2. Western Blotlama.....                                                                                                        | 54 |
| 4. BULGULAR.....                                                                                                                      | 57 |
| 4.1. Analitik Metot Validasyonu Bulguları.....                                                                                        | 57 |
| 4.1.1. Kapesitabin Tayininde Kullanılan Analiz Metodunun Validasyon Bulguları ..                                                      | 57 |
| 4.1.2. 5'DFCR ve 5'DFUR Tayininde Kullanılan Analiz Metodunun Validasyon Bulguları.....                                               | 60 |
| 4.1.3. 5-FU Tayininde Kullanılan Analiz Metodunun Validasyon Bulguları.....                                                           | 62 |
| 4.2. Kronofarmakokinetik Çalışma Sonuçları .....                                                                                      | 65 |
| 4.2.1. Kapesitabinin Plazmadaki Kronofarmakokinetiğinin Değerlendirilmesi .....                                                       | 65 |
| 4.2.2. Kapesitabinin Karaciğerdeki Kronofarmakokinetiğinin Değerlendirilmesi .....                                                    | 68 |
| 4.2.3. 5'DFCR ve 5'DFUR Metabolitlerinin Plazmadaki Kronofarmakokinetiğinin Değerlendirilmesi.....                                    | 71 |
| 4.2.4. 5'DFCR ve 5'DFUR Metabolitlerinin Karaciğerdeki Kronofarmakokinetiğinin Değerlendirilmesi.....                                 | 75 |
| 4.2.5. 5-FU'nun Plazmadaki Kronofarmakokinetiğinin Değerlendirilmesi .....                                                            | 80 |
| 4.2.6. 5-FU'nun Karaciğerdeki Kronofarmakokinetiğinin Değerlendirilmesi .....                                                         | 83 |
| 4.3. Moleküler Çalışma Sonuçları .....                                                                                                | 85 |
| 4.3.1. Sirkadiyan Saat Genlerinden <i>Bmal1</i> Ekspresyonlarındaki Zamana Bağlı Değişikliklerin Değerlendirilmesi.....               | 85 |
| 4.3.2. Sirkadiyan Saat Proteinlerinden BMAL1 ve CRY1 Düzeylerindeki Zamana Bağlı Değişikliklerin Değerlendirilmesi .....              | 86 |
| 4.3.3. Kapesitabinin Metabolizmasında Rol Oynayan Enzimlerin Protein Düzeylerinde Zamana Bağlı Değişikliklerin Değerlendirilmesi..... | 86 |
| 4.3.3.1. CES1 ve CES2 Protein Düzeylerinde Zamana Bağlı Değişikliklerin Değerlendirilmesi.....                                        | 86 |
| 4.3.3.2. CDA Protein Düzeylerinde Zamana Bağlı Değişikliklerin Değerlendirilmesi .....                                                | 87 |
| 4.3.3.3. UPP2 Protein Düzeylerinde Zamana Bağlı Değişikliklerin Değerlendirilmesi .....                                               | 88 |

|                                                                                        |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3.3.4. DPD Protein Düzeylerinde Zamana Bağlı Değişikliklerin Değerlendirilmesi ..... | 89  |
| 5. TARTIŞMA .....                                                                      | 91  |
| KAYNAKLAR .....                                                                        | 101 |
| ETİK KURUL KARARI .....                                                                | 128 |
| İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....                                                        | 129 |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                         | 130 |



## TABLOLAR LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 2-1: Deney hayvanlarında sirkadiyan saate bağlı olarak tolere edilebilirlik, farmakokinetik ya da efikasitesinde değişiklik olduğu belirlenen antikanser ilaçlar ve ilgili referanslar..... | 26 |
| Tablo 2-2: Son yıllarda antikanser ilaçlarla gerçekleştirilen bazı klinik kronoterapi çalışma örnekleri.....                                                                                      | 28 |
| Tablo 3-1: Deney grupları ve kullanılan fare sayıları.....                                                                                                                                        | 44 |
| Tablo 3-2: Kapesitabin miktar tayininde kullanılan HPLC metoduna ait kromatografik koşullar.....                                                                                                  | 45 |
| Tablo 3-3: 5'DFCR ve 5'DFUR miktar tayininde kullanılan HPLC metoduna ait kromatografik koşullar.....                                                                                             | 48 |
| Tablo 3-4: 5-FU miktar tayininde kullanılan LC-MS metoduna ait kromatografik koşullar.....                                                                                                        | 50 |
| Tablo 3-5: Kullanılan primer dizileri.....                                                                                                                                                        | 53 |
| Tablo 3-6: SDS-PAGE jelin hazırlanışı.....                                                                                                                                                        | 55 |
| Tablo 3-7: Elektroforez ve transfer aşamalarında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.....                                                                                                         | 55 |
| Tablo 3-8: Bloklama ve yıkama aşamalarında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.....                                                                                                               | 56 |
| Tablo 4-1: Plazmada kapesitabin tayininde kullanılan analitik metoda ilişkin validasyon bulguları.....                                                                                            | 58 |
| Tablo 4-2: Plazmada 5'DFCR ve 5'DFUR tayininde kullanılan analitik metoda ilişkin validasyon bulguları.....                                                                                       | 61 |
| Tablo 4-3: 5-FU tayininde kullanılan analitik metoda ilişkin plazmada ve karaciğerde validasyon bulguları.....                                                                                    | 64 |
| Tablo 4-4: Kapesitabinin plazma farmakokinetiğine ilişkin bulgular.....                                                                                                                           | 67 |
| Tablo 4-5: Kapesitabinin karaciğerdeki farmakokinetiğine ilişkin bulgular.....                                                                                                                    | 70 |
| Tablo 4-6: 5'DFCR'nin plazma farmakokinetiğine ilişkin bulgular.....                                                                                                                              | 73 |
| Tablo 4-7: 5'DFUR'un plazma farmakokinetiğine ilişkin bulgular.....                                                                                                                               | 75 |
| Tablo 4-8: 5'DFCR'nin karaciğerdeki farmakokinetiğine ilişkin bulgular.....                                                                                                                       | 78 |
| Tablo 4-9: 5'DFUR'un karaciğerdeki farmakokinetiğine ilişkin bulgular.....                                                                                                                        | 80 |
| Tablo 4-10: 5-FU'nun plazmadaki farmakokinetiğine ilişkin bulgular.....                                                                                                                           | 82 |
| Tablo 4-11: 5-FU'nun karaciğerdeki farmakokinetiğine ilişkin bulgular.....                                                                                                                        | 85 |

|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 4-12: C57BL/6J soyu erkek farelerde BMAL1, CRY1, CES1, CES2, CDA, UPP2 ve DPD proteinlerinin ekspresyonlarındaki sirkadiyan değışiklikler. .... | 90 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|



## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2-1: Sirkadiyan zamanlama sisteminin şematik gösterimi .....                                                                                                                                        | 9  |
| Şekil 2-2: Memelilerde moleküler saatin şematik gösterimi .....                                                                                                                                           | 12 |
| Şekil 2-3: İlaç farmakokinetiğinin sirkadiyan saat tarafından düzenlenmesi .....                                                                                                                          | 15 |
| Şekil 2-4: Kapesitabinin açık kimyasal formülü.....                                                                                                                                                       | 31 |
| Şekil 2-5: Kapesitabinin sitotoksik etkinliğinde ya da eliminasyonunda rol alan metabolik yollar .....                                                                                                    | 32 |
| Şekil 2-6: 5-FU'nun bir aktif metaboliti olan FdUMP aracılığıyla gerçekleşen timidilat sentaz inhibisyonunun mekanizması .....                                                                            | 33 |
| Şekil 4-1: Kapesitabin plazma standartlarına ait kalibrasyon eğrisi.....                                                                                                                                  | 57 |
| Şekil 4-2: Kapesitabin tayininde kullanılan ters faz kromatografi metoduyla boş fare plazmasından elde edilen kromatogram. ....                                                                           | 58 |
| Şekil 4-3: Kapesitabin tayininde kullanılan ters faz kromatografi metoduyla 1 µg/ml kapesitabin çözeltisi spike edilen fare plazmasından elde edilen kromatogram. ....                                    | 59 |
| Şekil 4-4: Kapesitabin tayininde kullanılan ters faz kromatografi metoduyla boş fare karaciğerinden elde edilen kromatogram.....                                                                          | 59 |
| Şekil 4-5: Kapesitabin tayininde kullanılan ters faz kromatografi metoduyla 2 µg/ml kapesitabin çözeltisi spike edilen fare karaciğerinden elde edilen kromatogram.....                                   | 59 |
| Şekil 4-6: 5'DFCR plazma standartlarına ait kalibrasyon eğrisi. ....                                                                                                                                      | 60 |
| Şekil 4-7: 5'DFUR plazma standartlarına ait kalibrasyon eğrisi.....                                                                                                                                       | 60 |
| Şekil 4-8: 5'DFCR ve 5'DFUR metabolitlerinin tayininde kullanılan ters faz kromatografi metoduyla boş fare plazmasından elde edilen kromatogram.....                                                      | 62 |
| Şekil 4-9: 5'DFCR ve 5'DFUR metabolitlerinin tayininde kullanılan ters faz kromatografi metoduyla 5 µg/ml 5'DFCR ve 1 µg/ml 5'DFUR çözeltisi spike edilen fare plazmasından elde edilen kromatogram. .... | 62 |
| Şekil 4-10: 5-FU plazma standartlarına ait kalibrasyon eğrisi. ....                                                                                                                                       | 63 |
| Şekil 4-11: 5-FU karaciğer standartlarına ait kalibrasyon eğrisi. ....                                                                                                                                    | 63 |
| Şekil 4-12: 5-FU'nun tayininde kullanılan LC-MS metoduyla 5-FU çözeltisi spike edilen fare plazmasından elde edilen kromatogram (üstte) ve 5-FU'nun kütle spektrumu (altta).....                          | 64 |

|                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4-13: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen kapesitabin plazma konsantrasyon-zaman grafiği. ....                               | 65 |
| Şekil 4-14: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen kapesitabine ait plazma $C_{maks}$ (A) ve $AUC_{0-6sa}$ (B) değerleri. ....        | 66 |
| Şekil 4-15: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen kapesitabine ait plazma $t_{1/2}$ (A), CL/F (B) ve Vd/F (C) değerleri. ....        | 67 |
| Şekil 4-16: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen kapesitabine ait karaciğer konsantrasyon-zaman grafiği. ....                       | 68 |
| Şekil 4-17: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen kapesitabine ait karaciğer $C_{maks}$ (A) ve $AUC_{0-6sa}$ (B) değerleri. ....     | 69 |
| Şekil 4-18: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen karaciğer kapesitabin $t_{1/2}$ (A), CL/F (B) ve Vd/F (C) değerleri. ....          | 70 |
| Şekil 4-19: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFCR metabolitine ait plazma konsantrasyon-zaman grafiği. ....                   | 71 |
| Şekil 4-20: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFCR metabolitine ait plazma $C_{maks}$ (A) ve $AUC_{0-6sa}$ (B) değerleri. .... | 72 |
| Şekil 4-21: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFCR'ye ait plazma kapesitabin $t_{1/2}$ değerleri. ....                         | 72 |
| Şekil 4-22: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFUR metabolitine ait plazma konsantrasyon-zaman grafiği. ....                   | 74 |
| Şekil 4-23: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFUR metabolitine ait plazma $C_{maks}$ (A) ve $AUC_{0-6sa}$ (B) değerleri. .... | 74 |

|                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4-24: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFUR'a ait plazma kapesitabin $t_{1/2}$ değerleri. ....                             | 75 |
| Şekil 4-25: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFCR metabolitine ait karaciğer konsantrasyon-zaman grafiği. ....                   | 76 |
| Şekil 4-26: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFCR metabolitine ait karaciğer $C_{maks}$ (A) ve $AUC_{0-6sa}$ (B) değerleri. .... | 77 |
| Şekil 4-27: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFCR'ye ait karaciğer $t_{1/2}$ değerleri. ....                                     | 77 |
| Şekil 4-28: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFUR metabolitine ait karaciğer konsantrasyon-zaman grafiği. ....                   | 79 |
| Şekil 4-29: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFUR metabolitine ait karaciğer $C_{maks}$ (A) ve $AUC_{0-6sa}$ (B) değerleri. .... | 79 |
| Şekil 4-30: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFUR metabolitine ait karaciğer $t_{1/2}$ değerleri. ....                           | 80 |
| Şekil 4-31: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5-FU metabolitine ait plazma konsantrasyon-zaman grafiği. ....                        | 81 |
| Şekil 4-32: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5-FU metabolitine ait plazma $C_{maks}$ (A) ve $AUC_{0-6sa}$ (B) değerleri. ....      | 82 |
| Şekil 4-33: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5-FU metabolitine ait karaciğer konsantrasyon-zaman grafiği. ....                     | 83 |
| Şekil 4-34: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5-FU metabolitine ait karaciğer $C_{maks}$ (A) ve $AUC_{0-6sa}$ (B) değerleri. ....   | 84 |

|                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4-35: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5-FU metabolitine ait karaciğer $t_{1/2}$ değerleri..... | 84 |
| Şekil 4-36: C57BL/6J soyu erkek farelerde ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularında <i>Bmal1</i> mRNA düzeyleri. ....                                                        | 85 |
| Şekil 4-37: C57BL/6J soyu erkek farelerde ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularında BMAL1 ve CRY1 protein düzeyleri. ....                                                    | 86 |
| Şekil 4-38: C57BL/6J soyu erkek farelerde ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularında CES1 ve CES2 protein düzeyleri. ....                                                     | 87 |
| Şekil 4-39: C57BL/6J soyu erkek farelerde ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularında CDA protein düzeyleri. ....                                                              | 88 |
| Şekil 4-40: C57BL/6J soyu erkek farelerde ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularında UPP2 protein düzeyleri. ....                                                             | 89 |
| Şekil 4-41: C57BL/6J soyu erkek farelerde ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularında DPD protein düzeyleri.....                                                               | 90 |

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

**%CV:** % Varyasyon katsayısı

**5'-DFCR:** 5-deoksi-5-fluorositidin

**5'-DFUR:** 5-deoksi-5-fluorouridin

**5-FU:** 5-Fluorourasil

**5-FU-LV:** 5-Fluorourasil, lökovorin

**5-HT:** Serotonin

**ABC:** ATP-binding cassette (ATP-bağlayıcı kaset) süper ailesi

**Ahr:** Aril hidrokarbon reseptörü

**ALAS1:** Aminolevulinik asit sentaz

**ALDH:** Aldehid dehidrojenaz

**AMPK:** AMP-aktive edilmiş protein kinaz

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

**AUC:** Plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altında kalan alan (Area under the curve)

**AVP:** Arginin-vazopressin

**BAX:** BCL2-associated X protein

**BCL-2:** B-cell lymphoma 2 (B-hücreli lenfoma 2)

**Bcrp:** Breast cancer resistance protein (Meme kanseri rezistans proteini)

**Bmal1 (Arntl):** Brain-muscle-arnt-like 117 protein 1

**$\beta$ -TrCP:**  $\beta$ -Transducin repeat-containing protein

**BUP:**  $\beta$ -üreido-propiyonaz

**cAMP:** Siklik adenosin monofosfat

**CAR:** Konstitütif androstan reseptörü (Constitutive androstane receptor)

**CBP:** CREB bağlayıcı protein

**CBS:** Sistatyonin  $\beta$  sentaz

**CDA:** Sitidin deaminaz

**CES:** Karboksiesteraz

**CES1:** Karboksiesteraz 1

**CES2:** Karboksiesteraz 2

**CH<sub>2</sub>THF:** 5,10-metilen tetrahidrofolat

**CK1  $\delta$ :** Kazein kinaz 1  $\delta$

**CK1  $\epsilon$ :** Kazein Kinaz 1  $\epsilon$

**Clock:** Circadian locomotor output cycles kaput

**C<sub>maks</sub>:** Maksimum konsantrasyon

**Cry:** Kriptokrom (Cryptochrome)

**CT:** Cycle of threshold

**CYP450:** Sitokrom P450 enzimleri

**DBP:** Albümin D bölgesi bağlayıcı protein (Albumin D-site-binding protein)

**DD:** Daimi karanlık (12 h dark: 12 h dark)

**DEPC:** Dietil Pirokarbonat

**DHP:** Dihidropirimidinaz

**DNA:** Deoksiribo nükleik asit

**dNTP:** Deoksinükleotid

**DPD:** Dihidropirimidin dehidrojenaz

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

**dThdPase:** Timidin fosforilaz

**dTMP:** Deoksitimidin monofosfat

**dUMP:** Deoksiuridin monofosfat

**E4BP4:** E4 promotör bağlayıcı protein 4 (E4 promoter binding protein-4)

**E-box:** Enhancer box

**EGF:** Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor)

**ERG:** Elektroretinogram

**FBAL:**  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanin'e

**FDA:** Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (U.S. Food and Drug Administration)

**FdUDP:** Fluorodeoksiuridin difosfat

**FdUMP:** Fluorodeoksiuridin monofosfat

**FdUTP:** Fluorodeoksiuridin trifosfat

**FOLFOX:** 5-FU, folinik asit, oxaliplatin kombinasyonu

**FUDP:** Fluorouridin difosfat

- FUDR:** Fluorodeoksiuridin
- FUH<sub>2</sub>:** Dihidroksifluorourasil
- FUMP:** Fluorouridin monofosfat
- FUPA:** 5-Fluoro-üreido-propiyonik asid
- FUR:** Fluorouridin
- FUTP:** Fluorouridin trifosfat
- GABA:** Gama aminobutirik asit
- GAPDH:** Gliseraldehit-3 fosfat dehidrojenaz
- GHY:** Genikulohipotalamik yolak
- GR:** Glukokortikoid reseptörleri
- GREs:** Glukokortikoid yanıt elementleri
- GRP:** Gastrin saliverici peptid
- GSH:** Glutation-S-transferaz
- GST:** Glutasyon
- HDAC:** NAD<sup>+</sup> bağımlı histon deasetilaz
- HLF:** Hepatik lösemi faktörü (Hepatic leukemia factor)
- HPLC:** Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High pressure liquid chromatography)
- JARID1a:** Jumonji AT-rich interactive domain 1a
- k<sub>el</sub>:** Eliminasyon hız sabiti
- LOD:** Deteksiyon limiti
- LOQ:** Kantifikasyon limiti
- LSD1:** Lysine-specific histone demethylase 1A
- Mdr1:** Multidrug resistance protein 1 (Farede abcb1a ve abcb1b veya mdr1a ve mdr1b, P-gp)
- MDR1:** Multidrug resistance protein 1 (İnsanda ABCB1, MDR1, P-glikoprotein, P-gp)
- MLL1:** Mixed lineage leukemia 1
- MTD:** Maksimum tolere edilen doz
- mRNA:** Mesajcı ribonükleik asit
- Mrp2:** Multidrug resistance-associated protein (Çoklu ilaç direnci ilişkili protein)
- MTP:** Mikrozomal transport proteini
- NAT:** N-asetil transferaz

**Npas2:** Neuronal PAS domain protein 2

**OCT2:** Organik katyon taşıyıcı-2 (Organic cation transporter-2)

**Octn-1:** Organik katyon taşıyıcı yeni tip-1 (Organic cation transporter, novel type 1)

**OPRT:** Orotat fosforibozil transferaz

**PACAP:** Hipofizer adenilat siklaz aktive edici polipeptid (Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)

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

**PCR:** Polimeraz zincir reaksiyonu

**PepT1:** Peptid taşıyıcı-1

**Per:** Period

**P-gp:** P-glikoprotein

**PK-2:** Prokinetisin-2

**POR:** P450 oksidoredüktaz

**PPAR $\alpha$ :** Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör alfa (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha)

**PyNPase:** Pirimidin fosforilaz

**PVDF:** Polviniliden florür

**REV-ERB $\alpha$ :** Nükleer reseptör Rev-Erb alfa (Nuclear receptor Rev-Erb alpha)

**RHY:** Retinohipotalamik yolak

**RIPA:** Radyo-immün presipitasyon analizi tamponu (Radio-immunoprecipitation assay buffer)

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

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

**RT-PCR:** Real-time PCR, Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

**SEM:** Standart hata (Standard error of the mean)

**SIRT1:** Sirtuin 1

**SKÇ:** Suprakiazmatik çekirdek (SCN; Suprachiasmatic nucleus)

**SLC:** Solüt taşıyıcılar

**SLC9A3:** Sodyum-proton değiştirici-3/ NHE3

**SP:** P maddesi (Substance P)

**SPE:** Katı-faz ekstraksiyonu (Solid phase extraction)

**SR:** Sustained release

**SULT:** Sülfotransferaz

**t<sub>1/2</sub>:** Eliminasyon yarılanma ömrü

**TBST:** Tween 20 içeren tris tamponlu salin çözeltisi

**TEF:** Tirotrop embriyonik faktör (Thyrotroph embryonic factor)

**TGF- $\alpha$ :** Transforme edici büyüme faktörü- $\alpha$

**TK:** Timidin kinaz

**t<sub>maks</sub>:** Maksimum konsantrasyona ulaşma zamanı

**Top1:** Topoizomeraz 1

**TS:** Timidilat sentaz

**UGT:** UDP-glukuronozil transferaz

**UK:** Uridin kinaz

**UPP1/2:** Uridin fosforilaz 1/2

**UrdPase:** Uridin fosforilaz

**VIP:** Vazoaktif intestinal polipeptid

**ZT:** Zeitgeber Time (Zaman/Ritim Verici)

## ÖZET

Akyel, Y.K. (2021). Kapesitabinin faredeki kronofarmakokinetiğinin incelenmesi İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Sirkadiyan zamanlama sistemi, yaklaşık 24 saatlik bir periyod ile, ilaç farmakokinetiğine ilişkin absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon süreçlerinde değişiklikler oluşturmaktadır. Kronofarmakokinetiğe bağlı olarak hedef dokuların ilacın aktif formuna maruziyeti ve sitotoksosite değişkenlik göstermektedir. Terapötik aralıkları dar olan ve doz kısıtlayıcı yan etkiler gösteren antikanser ilaçlar için farmakokinetikteki uygulama zamanına bağlı değişikliklerin bilinmesi, özellikle önem taşımaktadır. Çalışmamızda kapesitabinin ve metabolitlerinin farmakokinetiğine ilişkin sirkadiyan değişiklikleri ortaya koymak amaçlanmıştır. Bu amaçla ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında, C57BL/6J soyu erkek farelere oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmış ve bunu takiben kapesitabin ile 5'DFCR, 5'DFUR, 5-FU metabolitlerinin plazma ve karaciğerdeki farmakokinetiği değerlendirilmiştir. Ayrıca kapesitabinin metabolizmasında rol oynayan enzim ekspresyonlarındaki zamana bağlı değişiklikler incelenmiştir. Çalışmamızda kapesitabin uygulanan farelerde, kapesitabin, 5'DFUR ve 5-FU'nun plazma  $C_{maks}$  ve  $AUC_{0-6sa}$  değerleri farelerin dinlenme periyodunda (ZT1 ve ZT7) aktivite periyoduna (ZT13 ve ZT19) göre daha yüksek olmuştur ( $p<0,05$ ). Karaciğer dokusunda da benzer şekilde 5'DFUR ve 5-FU'nun plazma  $C_{maks}$  ve  $AUC_{0-6sa}$  değerleri dinlenme periyodunda aktivite periyoduna göre daha yüksek iken ( $p<0,05$ ), kapesitabin ve 5'DFCR karaciğer konsantrasyonlarında gruplar arasında anlamlı bir farklılık oluşmamıştır. Ayrıca, CES1, CES2, CDA, UPP2 ve DPD protein düzeylerinde sirkadiyan ritimler gösterilmiştir ( $p<0,05$ ). Bulgularımız, kapesitabin ile metabolitlerinin farmakokinetiğinde ve kapesitabini metabolize eden enzimlerin düzeylerinde, uygulama zamanına bağlı olarak anlamlı farklılıklar olduğunu göstermektedir. Kapesitabinin farmakokinetiğindeki gün içi farklılıkları mekanizmalarıyla beraber ortaya koyan çalışmamız, antikanser ilaçların kronofarmakokinetiğine ilişkin bilgi birikimine katkı sunmakta ve kronoterapinin gerekliliğini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Kapesitabin, kronofarmakokinetik, kronoterapi, kanser, sirkadiyan ritimler

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2018-30939

## ABSTRACT

Akyel, Y.K. (2021). Investigation of chronopharmacokinetics of capecitabine in mice. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmacology. PhD Thesis. Istanbul.

Circadian timing system modifies absorption, distribution, metabolism and elimination processes of drug pharmacokinetics over a period of approximately 24-hours. Depending on chronopharmacokinetics, exposure of target tissues to the active form of the drug and cytotoxicity display variations. For anticancer drugs with narrow therapeutic ranges and dose-limiting side effects, it is particularly important to know time dependent changes in pharmacokinetics. In our study, we aimed to evaluate circadian variations in pharmacokinetics of capecitabine and its metabolites. For this purpose, 500 mg/kg capecitabine was administered orally to C57BL/6J male mice at ZT1, ZT7, ZT13 or ZT19, and pharmacokinetics of capecitabine and 5'DFCR, 5'DFUR, 5-FU in plasma and liver were evaluated. In addition, time-dependent changes in capecitabine metabolising enzyme expressions were investigated. In our study, plasma  $C_{max}$  and  $AUC_{0-6h}$  values of capecitabine, 5'DFUR and 5-FU were higher during the rest span (ZT1 and ZT7) than the activity span (ZT13 and ZT19) ( $p<0.05$ ). Similarly,  $C_{max}$  and  $AUC_{0-6h}$  values of 5'DFUR and 5-FU in liver were higher during the rest span than activity span ( $p<0.05$ ), while there was no significant difference in liver concentrations of capecitabine and 5'DFCR. In addition, circadian rhythms were shown in CES1, CES2, CDA, UPP2 and DPD levels ( $p<0.05$ ). Our findings show significant time-dependent changes in pharmacokinetics of capecitabine and its metabolites, and in capecitabine metabolizing enzyme levels. Our study, which reveals the circadian rhythms in the capecitabine pharmacokinetics with its mechanisms, contributes to the knowledge on the chronopharmacokinetics of anticancer drugs and supports the vital role of chronotherapy.

**Key Words:** Capecitabine, chronopharmacokinetics, chronotherapy, cancer, circadian rhythms

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: TDK-2018-30939

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Memelilerde birçok fizyolojik fonksiyon sirkadiyan ritim göstermektedir. Sirkadiyan ritimler, yaklaşık 24 saatlik periyoda sahip olan tekrarlayıcı değişiklikler olarak tanımlanır (Lévi & Okyar, 2011). Beyinde bulunan ve merkezi saat olarak adlandırılan suprakiazmatik çekirdek (SKÇ), periferik dokularda bulunan saatleri senkronize etmekte ve sirkadiyan fizyolojiyi düzenlemektedir (Brown & Azzi, 2013; Musiek & Fitzgerald, 2013).

Sirkadiyan ritimlere bağlı olarak ilaç metabolizmasında ve hücresel ya da moleküler düzeydeki ilaç hedeflerinde gün içi değişiklikler oluşmaktadır (Lévi & Okyar, 2011). Karaciğer, böbrek ve ince barsakta metabolizma ve detoksifikasyon, gastrointestinal kanal motilitesi, mide asiditesi, plazma proteinleri, taşıyıcı proteinler ve iyon kanalları, karaciğer ve böbrek kan akımı, glomerüler filtrasyon hızı gibi ilaç farmakokinetiğine ilişkin çok sayıda süreç sirkadiyan ritim göstermektedir. Sirkadiyan ritimler açısından çok sayıda çalışma bulunan karaciğerde ritmik olarak eksprese edilen birçok gen metabolizma ve detoksifikasyonda rol oynayan enzimleri kodlamaktadır (DeBruyne ve ark., 2014; Dibner ve ark., 2010). İlaç uygulama zamanına bağlı olarak metabolizma ve detoksifikasyonda görülen değişiklikler, antikanser ilaçlar için doz kısıtlayıcı olabilen sitotoksistelerde anlamlı değişiklikler oluşturabilmektedir (Kettner ve ark., 2014; Levi & Schibler, 2007).

Antikanser ilaçların sağlıklı dokulara olan toksisitesinin ve tümör dokusundaki efikasitesinin ilaç uygulama zamanında değişiklik yapılarak düzenlenebileceği hem deney hayvanlarında yapılan prelinik çalışmalarla hem de klinik çalışmalar ile gösterilmiştir (N. Ozturk ve ark., 2017). Antikanser ilaçların ciddi advers etkilere sebep olabilmesi nedeniyle, bu ilaçları en uygun zamanda uygulamak özel bir önem taşımaktadır. Kronofarmakokinetik, kronofarmakodinamik çalışmalardan ve kronotoksistite çalışmalarında elde edilen verilerle gerçekleştirilen kronoterapi uygulamaları aracılığıyla, ilaçların en uygun zamanda verilmesi ve böylelikle en yüksek etkinliği ve en düşük toksisiteyi elde etmeyi amaçlanmaktadır (Dallmann ve ark., 2014).

Kapesitabin oral yol ile kullanılan fluoropirimidin türevi bir antikanser ilaçtır. Bir ön ilaç olan kapesitabin; karboksilesteraz (CES), sitidin deaminaz (CDA), pirimidin fosforilaz (PyNPase) enzimleri aracılığıyla üç basamaklı bir enzimatik dönüşümle aktif

metaboliti olan 5-fluorourasil'e (5-FU) dönüşmektedir (Reigner ve ark., 2001). Bir antimetabolit olan 5-FU, hem DNA sentezini inhibe etmekte, hem de DNA ve RNA'nın normal fonksiyonlarını bozmaktadır (Longley ve ark., 2003). Kapesitabin tedavisine bağlı olarak en yaygın görülen yan etkiler; diyare, bulantı-kusma, el-ayak sendromu, stomatit ve çeşitli hematolojik yan etkilerdir (Mckendrick & Coutsouvelis, 2005).

Son yıllarda yapılan çeşitli kronoterapi çalışmalarında, kapesitabinin uygulama zamanındaki değişikliklerin kapesitabinin plazma düzeylerinde, etkililiğinde ve toksisitesinde değişikliğe sebep olabileceği görülmüştür (Akgun ve ark., 2014; Pılandı ve ark., 2016). Bahsedilen çalışmalarda ilaç uygulamalarının sınırlı zamanlarda yapılmış olması nedeniyle kapesitabinin plazma düzeylerindeki sirkadiyan değişiklikler tam olarak aydınlatılamamıştır. Ayrıca kapesitabinin metabolizmasında görev alan enzimlerin sirkadiyan ritimleriyle kapesitabinin farmakokinetiğinin ilişkilendirilmesi konusunda da yeterli veri bulunmamaktadır.

Çalışmamız farmakokinetik çalışmaları ve moleküler analizleri içeren iki bölümden oluşmaktadır. İlk kısımda dört farklı sirkadiyan zamanda (ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19) oral yol ile 500 mg/kg dozda maksimum tolere edilen dozda (MTD) kapesitabin uygulanan farelerde, kapesitabinin ve 5'DFCR, 5'DFUR, 5-FU metabolitlerinin plazma ve karaciğerdeki farmakokinetiğinde zamana bağlı olarak gerçekleşebilecek değişiklikleri ortaya koymak amaçlanmıştır. İkinci kısımda ise, moleküler analizler ile kapesitabinin 5-FU'ya metabolize olmasında görev alan CES, CDA, PyNPase enzimlerinin ve 5-FU'nun metabolizmasında rol oynayan dihidropirimidin dehidrojenaz (DPD) enziminin protein düzeylerindeki zamana bağlı değişiklikleri belirlemek hedeflenmiştir. Son aşamada ise farmakokinetik veriler ve moleküler analizlerin sonuçları bütüncül olarak değerlendirilerek kapesitabinin farmakokinetiğindeki ve farmakodinamiğindeki sirkadiyan değişiklikleri ortaya koymak amaçlanmaktadır.

Kapesitabinin metabolizması açısından insan ile en çok benzerlik gösteren kemirgen faredir (Shindoh ve ark., 2006). Farelerde uygulama zamanına bağlı olarak kapesitabinin farmakokinetiğindeki farklılıkları ortaya koyan ve bununla beraber kapesitabin metabolizmasında rol alan enzimlerin sirkadiyan ritmini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bu çalışmada, klinik kronoterapi uygulamalarına ve

preklinik kronoefikasite çalıřmalarına temel oluřturabilecek veriler elde edilebileceęi dūřünölmektedir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Sirkadiyan Zamanlama Sistemi

İnsan hayatı, bir dizi tekrarlayan döngüye dayanmaktadır. Bu döngülerin bazıları, güneşin doğuşu-batışı, mevsimlerin değişimi gibi fiziksel çevremizdeki değişiklikleri yansıtırken, bazıları ise hafta içi-hafta sonu döngüsü, vardiyalı çalışma döngüsü gibi sosyal değişiklikleri yansıtmaktadır. İçsel bir vücut saati olan “biyolojik saat” tarafından metabolizma, fizyoloji ve davranışlarda oluşturulan ritmik değişiklikler sayesinde, canlılar bu çevresel döngülere senkronize olup uyum sağlayabilmektedir (Hastings, 1997). Siyanobakterilerden insanlara kadar tüm ışığa duyarlı organizmalarda biyolojik saat, döngüsel fizyolojiyi çevresel zamana adapte etmektedir. Günlük ritimlerin programlı olduğu ve doğal ışık veya sıcaklık döngülerine pasif bir tepkiden ibaret olmadığı, ilk olarak Jean-Jacques D’Ortous de Mairan (1678–1771) tarafından 1729 yılında mimoza yapraklarının açılıp kapanma ritminin ışık yokluğunda da devam ettiğini gözlemlenmesiyle ortaya konmuştur (Roenneberg & Merrow, 2005; Schibler & Naef, 2005). Bunu izleyen yıllarda çok sayıda farklı türde canlıda ve hücre tipinde intrinsik sirkadiyan ritimlerin varlığı gösterilmiştir.

Biyolojik saat tarafından oluşturulan ritmik değişiklikler, meydana gelme sıklıklarına göre ultradiyan, sirkadiyan ve infradiyan ritimler olarak gruplandırılırlar. Ultradiyan ritimler, periyodu ( $\tau$ : bir döngünün tamamlanma süresi) 20 saatten kısa olan, infradiyan ritimler ise periyodu 30 saatten uzun olan ritimlerdir. Kalp atışı (insanda  $\tau \approx 1$  saniye), uyku evreleri (sıçanda  $\tau \approx 10$ , insanda  $\tau \approx 90$  dakika) ultradiyan ritimlere; dişilerdeki östrus döngüsü (farede  $\tau \approx 4-5$  gün, insanda  $\tau \approx 28$  gün), yıllık çiftleşme ritimleri ( $\tau \approx 1$  yıl), ağustos böceğinin ortaya çıkma zamanları ( $\tau \approx 13-17$  yıl) infradiyan ritimlere örnektir (Schibler & Naef, 2005). Yaklaşık 24 saat periyodundaki ritimler, sirkadiyan ritimler olarak adlandırılmaktadır. Sirkadiyan terimi “yaklaşık” anlamına gelen “circa” ve “gün” anlamına gelen “dies” sözcüklerinden türemiştir (Musiek & Fitzgerald, 2013). İnsanlarda ve çok sayıda memelide vücut sıcaklığı, kan basıncı, hormon düzeyleri, metabolizma, retinal elektroretinogram yanıtları (ERG) ve diğer birçok fizyolojik parametre sirkadiyan ritimler göstermektedir (Aschoff, 1983; Cameron ve ark., 2008; Eckel-Mahan & Storm, 2009; Green ve ark., 2008).

Tüm sirkadiyan ritimlerin sahip olduğu temel özelliklerden biri, herhangi bir çevresel ipucu bulunmaması durumunda dahi sürdürülebilir olmalarıdır. Zamansal izolasyon durumunda (sabit sıcaklık ve daimi ışık (LL) veya daimi karanlık (DD)) görülen 'free running' ritimlerin periyodu genellikle 24 saatten farklıdır; tam uzunluğu koşullara (örneğin DD veya LL), türe ve hatta bireye bağlıdır. Sirkadiyan ritimler, normal koşullar altında, sürükleme (entrainment) veya senkronizasyon olarak bilinen proseslerle çevresel döngülere uyum sağlama özelliği gösterirler. Sirkadiyan ritimlerin bir diğer temel özelliği; sıcaklık kompensasyonudur. Yani; fizyolojik sınırlar içindeki sıcaklık değişimlerinde sirkadiyan ritimlerin periyodu neredeyse değişmemektedir (Aguilar-Roblero ve ark., 2015; Ethan & Takahashi, 2013; Roenneberg & Mellow, 2005).

İnsanlarda, çok sayıda hastalık sirkadiyan sistemle ilişki göstermektedir ve sirkadiyan sisteme ilişkin bozukluklar birçok hastalığa sebep olabilmektedir. İnsomnia ya da hipersomnia'ya neden olabilen gecikmiş uyku fazı bozukluğu (DSPS: Delayed sleep phase disorder), erken uyku fazı bozukluğu (ASPS: Advanced sleep phase disorder), jet lag, vardiyalı çalışmaya bağlı uyku bozukluğu gibi uyku bozuklukları bireyin içsel saati ve çevresel ritimler ya da sosyal saat arasındaki uyumsuzluktan kaynaklanır (Reid & Zee, 2009). Örneğin; ailesel ASPS (FASPS) görülen bireylerde, sirkadiyan saat genlerinden *PER2* ve *PER2*-fosforile edici kinazda (*CK1 δ*) mutasyon görülmektedir (Toh ve ark., 2001; Xu ve ark., 2005). Ayrıca, saat genlerinden *CRY1*'deki bazı mutasyonların insanlarda DSPS ve dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu (DEHB) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Onat ve ark., 2020; Patke ve ark., 2017). Sirkadiyan saat, beslenme ve hücrel metabolizma ile doğrudan ilişkilidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, *CRY1*'in hepatik aşırı ekspresyonunun glukagonla indüklenen karaciğer glukoneojenezini inhibe ederek, insüline dirençli db/db farelerdeki kan glukoz düzeylerini düşürdüğü ve insülin duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir (E. E. Zhang ve ark., 2010). *Cry1* nakavt farelerde yapılan başka bir çalışmada, azalmış sistatinyonin β sentaz (CBS) aktivitesinin eksojen CRY1 eklenmesi sonucunda arttığı ve bu sayede translasyon sonrası bazı aminoasit yollarının düzenlendiği görülmüştür (Cal-Kayitmazbatir ve ark., 2020). Sirkadiyan saat ve metabolik yollar arasındaki iletişim bozukluğu birçok metabolik bozukluğa neden olabilmektedir (Green ve ark., 2008). Sirkadiyan saatin metabolitlerin %50'sini kontrol ettiği göz önünde bulundurulduğunda sirkadiyan saatin bozulmasının çok sayıda metabolik hastalığa yol

açması kaçınılmazdır (Krishnaiah ve ark., 2018). Pankreatik beta hücrelerinde sirkadiyan saat genlerinden *Bmal1*'deki fonksiyon kaybı, hipoinsülinemi ve diyabete sebep olabilmektedir (Marcheva ve ark., 2010). Ayrıca miyokard infarktüsü, astım atakları gibi birçok patolojik durum sirkadiyan ritim göstermektedir, gece ya da sabah erken saatlerde atak sıklığı artmaktadır (Musiek & Fitzgerald, 2013). Farelerde, sirkadiyan saate bağlı olarak UV ışınlarla indüklenen cilt kanseri ya da kemoterapötiklere olan duyarlılığın değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir (Gaddameedhi ve ark., 2011; Gorbacheva ve ark., 2005). Sirkadiyan saatin bozulması kanser süreçlerine katkı sağlamakta, kanserli insan ve kemirgenlerde sağkalımı azaltmaktadır (Lévi ve ark., 2010).

### 2.1.1. Merkezi Saat: Suprakiazmatik Çekirdek

Memelilerde, beyinde ventral hipotalamusta yer alan SKÇ, sirkadiyan saatte merkezi senkronize edici (merkezi saat) olarak görev yapmaktadır. SKÇ, ikili bir yapı biçimindedir ve her bir yarısı farede yaklaşık 10.000 nöron, insanda ise 50.000 nöron içermektedir. SKÇ, dorsomedial (kabuk) ve ventrolateral (çekirdek) olmak üzere iki ana bölümden oluşur (Musiek & Fitzgerald, 2013).

Ventrolateral bölge, gözden retinohipotalamik yolak (RHY) ile direkt girdileri alırken ikincil olarak intergenikulat bölgeden genikulohipotalamik yolak (GHY) ile indirekt olarak ışık bilgisini ve medyan rafe çekirdeğinden diğer girdileri alır. Ventrolateral bölge, yaygın olarak vazoaktif intestinal polipeptid (VIP) ve gastrin salıverici peptid (GRP) içeren nöronları; dorsomedial bölge ise arginin-vazopressin (AVP) içeren nöronları bulundurmaktadır. Dorsomedial bölge; limbik sistem, hipotalamus, paraventriküler talamik çekirdek ve medyan rafe çekirdeğinden girdileri almaktadır. RHY'de bulunan nöromediyatörler; glutamat, P maddesi (SP: Substance P), hipofizer adenilat siklaz aktive edici polipeptid (PACAP: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide), GHY'de bulunan nöromediyatörler; gama aminobutirik asit (GABA), nöropeptid Y'dir. Orta beyindeki rafe bağlantılarında ise serotonin (5-HT) nörotransmiteri bulunmaktadır. SKÇ'de hem venterolateral bölgeden hem de dorsomedial bölgeden çıkan eferent nöronlar, ön beyindeki birçok çekirdeğe ulaşır. (Hannibal & Fahrenkrug, 2006).

SKÇ'nin önemli bir özelliği, sirkadiyan olarak spontan aksiyon potansiyeli oluşturma yeteneğidir. Nöronal ateşleme fazı aydınlık-karanlık döngüsü tarafından

ayarlanmaktadır fakat daimi karanlık durumunda ya da SKÇ'den alınan kesitlerde ex vivo olarak da sürdürülmektedir. İn vitro şartlarda SKÇ hücreleri haftalar boyunca ritmik olarak aksiyon potansiyeli oluşturmaya devam etmekle beraber hücrelerin fazları birbiriyle uyum göstermez (Musiek & Fitzgerald, 2013). Organizmada SKÇ izole edildiğinde, periferik birçok dokuda ve hücre tipinde de sirkadiyan gen ekspresyonları görülmeye devam etmektedir fakat periferik moleküler saatlerin uyum içinde çalışması için SKÇ tarafından senkronize edilmeleri gerekmektedir. Bu nedenle SKÇ, tempo oluşturunucudan (pacemaker) ziyade bir orkestra şefine benzetilmektedir (Musiek & Fitzgerald, 2013).

Gece-gündüz döngüsü, sosyal hayata ilişkin alışkanlıklar ve yemek zamanları gibi çevresel senkronize ediciler, biyolojik saatin periyodunu 24 saate kalibre etmekte ve ayarlamaktadır. Sirkadiyan sistemde, ışık, esas “zeitgeber” (ritim verici) olarak tanımlanmakla beraber; beslenme, sıcaklık, sosyal etkileşimler, davranışsal aktivite, uyku bozukluğu gibi fotik olmayan ipuçları sirkadiyan ritim üzerinde ışığın etkisini faza bağlı bir şekilde etkileyebilir ve hatta antagonize edebilir (Hannibal & Fahrenkrug, 2006; Lévi ve ark., 2010). Sürekli karanlık fazda (DD) tutulan free-running hamsterların kafes değişiminden sonra veya hayvan çiftlerinin normal dinlenme fazında sosyal etkileşimde bulunması durumunda görülen faz kaymaları, sirkadiyan ritimlerde fotik olmayan ipuçlarıyla oluşan faz kaymasına örnektir. Bu girişimsel olmayan prosedürler, hayvanları uyandırmakta, aktiviteyi ya da uyarılmayı stimule etmektedir (Mrosovsky, 1988). Programlı egzersiz iskelet kası ve akciğerde bulunan saatlerde faz kaymasına neden olabilmektedir (Astiz ve ark., 2019). Yemek yeme zamanı, SKÇ'yi etkilemeden karaciğer, böbrek, kalp ve pankreasta bulunan saatler üzerinde güçlü bir etki oluşturmaktadır (Damiola ve ark., 2000). Memelilerde, çevresel ışık bilgisi (fotik sinyaller) retinada yer alan fotoreseptörler aracılığıyla algılamakta ve melanopsin içeren retinal gangliyon hücrelerinden retinohipotalamik yolak ile SKÇ'ye ulaşmaktadır. SKÇ, fotik olmayan girdileri ise intergenukolat yolak ve genikulohipotalamik yolak aracılığıyla almaktadır. SKÇ, fotik ve fotik olmayan girdilerden elde ettiği faz bilgisini nöral, hormonal ve sistemik sinyaller ile beynin diğer bölgelerine ve vücuda iletmektedir (Astiz ve ark., 2019; Lévi ve ark., 2010; Musiek & Fitzgerald, 2013; Wolff & Esser, 2012).

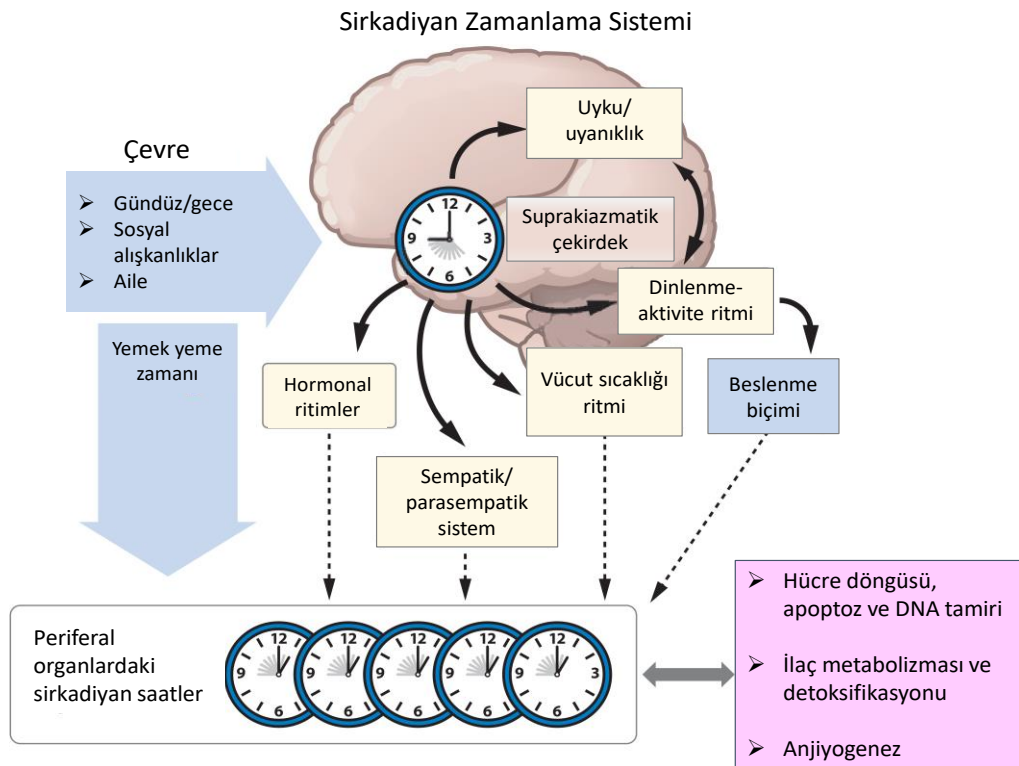
SKÇ, transforme edici büyüme faktörü- $\alpha$  (TGF $\alpha$ ; transforming growth factor  $\alpha$ ), epidermal büyüme faktörü (EGF; epidermal growth factor), prokinetisin-2 (PK-2), kardiyotropin benzeri sitokin ve hormon sekresyonu, nöroanatomik sempatik ve parasempatik yollar gibi yayılabilir sinyaller aracılığıyla sirkadiyan fizyolojiyi oluşturur (Lévi ve ark., 2010). SKÇ'nin hormon sekresyonu üzerine etkisi ve bu hormonların periferik dokulardaki etkisi, sistemik senkronizasyon için temel mekanizmalardan biridir. Ayrıca SKÇ, otonom sinir sistemini modüle ederek periferik dokuların bu hormonlara duyarlılığını sağlamaktadır (Buijs ve ark., 2006).

Önemli bir senkronize edici sinyal olan sirkadiyan glukokortikoid sekresyonu; SKÇ, otonom sinir sistemi ve periferik adrenal saatlerin etkileşimi sonucu gerçekleşmektedir (Oster ve ark., 2006). Glukokortikoid sinyalleri ve moleküler saat sistemi karşılıklı olarak birçok yolla etkileşime girmektedir. Hormona bağlı glukokortikoid reseptörleri (GR), çok sayıda genin promotör bölgesinde yer alan glukokortikoid yanıt elementlerine (GREs) bağlanmaktadır. Ayrıca birçok saat proteini GR'nin intraselüler lokalizasyonunu ve aktivitesini düzenlemektedir. Karaciğerde glukoneojenezin gerçekleşmesi ve kan glukoz düzeylerinin artması, adipoz dokuda lipolizin stimule edilmesi ve yağ asidi salıverilmesi gibi fizyolojik prosesleri kontrol eden glukokortikoidlerin günlük pik zamanı, enerji ihtiyacı duyulması beklenen zamanda yani aktivite periyodunun başlangıcındadır (Astiz ve ark., 2019; Oster ve ark., 2017; Takabe ve ark., 2008).

Bir diğer temel senkronize edici sinyal melatonin sekresyonudur. Güçlü sirkadiyan ritim gösteren melatonin sekresyonu, gece daha yüksek düzeylerde ve nokturnal (gece aktif) canlılarda glukokortikoid ritimleriyle eş fazlı, diurnal (gündüz aktif) canlılarda ise zıt fazlıdır. Memelilerin çoğunda, melatoninin ritmik olarak salgılanması, SKÇ ve pineal bez arasındaki sempatik nöronal bağlantılarla düzenlenmektedir. Melatonin sinyalinin beyine ve adrenal bezler, akciğer, kalp ve karaciğer gibi periferik organlara iletiminde G-protein kenetli reseptörler görev almaktadır (Astiz ve ark., 2019; Zawilska ve ark., 2009). Salgılanması gece uzunluğuna göre ayarlanan melatoninin birincil fizyolojik işlevi, günlük aydınlık-karanlık döngüsü ile ilgili vücut yapılarına bilgi vermektir. Bu bilgi, mevsimsel ritimler gibi fotoperiyottaki (gün uzunluğu) değişikliklere cevap veren fonksiyonların organizasyonu için kullanılır. Melatonin, insanların da dahil olduğu diurnal canlılarda önemli bir

fizyolojik uyku düzenleyicisidir. Geceleri uyku eğilimindeki keskin artış genellikle insanlarda endojen melatonin üretiminin başlamasından 2 saat sonra ortaya çıkar ve gece melatonin salgılanma süresi, gece uzunluğuna ilişkin bilgiyi SKÇ de dahil olmak üzere beyne ve çeşitli organlara iletir (Zisapel, 2007, 2018). Melatonin, fareler gibi nokturnal canlılarda uyku eğilimi oluşturmaz, uyku değil uyanıklık periyoduyla ilişkilidir. Bağışıklık yanıtı, antioksidan savunma, homeostaz, uyku-uyanıklık dönemlerindeki kan basıncı, metabolizma ve glikoz regülasyonu gibi diğer fizyolojik fonksiyonların sirkadiyan organizasyonu da melatonin sinyaliyle düzenlenmektedir (Claustrat & Leston, 2015; Zisapel, 2007, 2018).

Sirkadiyan fizyoloji ve SKÇ'den direkt ya da indirekt olarak çıkan diğer sinyaller, her bir hücredeki moleküler saatleri düzenler. Moleküler saatler ise ilaç metabolizması ve detoksifikasyonu, hücre proliferasyonu, DNA hasarının algılanması ve tamiri, apoptoz, anjiyogenez gibi kanser tedavisi ile alakalı hücresel işlevleri ve diğer birçok hücresel fonksiyonu ritmik olarak düzenlemektedir (Lévi ve ark., 2010; Levi & Schibler, 2007).



**Şekil 2-1: Sirkadiyan zamanlama sisteminin şematik gösterimi -Lévi ve ark. (2010)'dan değiştirilerek.**

### 2.1.2. Periferik Saatler

Sirkadiyan ritimler, SKÇ’de bulunan merkezi saate bağlı olmakla beraber neredeyse tüm doku ve hücrelerde periferik saatler bulunmaktadır. SKÇ merkezi saat olarak bir yandan indirekt yol ile periferik dokulardaki saatleri (slave clocks) senkronize ederek diğer yandan direkt olarak sirkadiyan fizyolojiyi düzenlemektedir. Benzer şekilde periferik saatler, bazen SKÇ’den gelen sinyalleri kabul ederken bazen direkt olarak çevresel sinyalleri alırlar. Periferik saatlerde direkt ve indirekt sinyallerin bir arada oluşturduğu senkronizasyon, dokudan dokuya değişiklik gösterebilmektedir (Brown & Azzi, 2013). Yapılan çeşitli çalışmalarda, karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, kalp, mide, tiroid bezi, adrenal bez, iskelet kası, kahverengi ve beyaz yağ dokusu, aorta ve korneadan izole edilen dokular ile kültüre edilen hücrelerin gen ekspresyonlarında güçlü sirkadiyan osilasyonlar görülmüştür. Karaciğer, sirkadiyan transkripsiyon açısından en fazla çalışılan organdır ve çalışmalarda çok sayıda sirkadiyan transkript gösterilmiştir (Panda ve ark., 2002; Yamamoto ve ark., 2004; Yamazaki ve ark., 2000, 2009; S. H. Yoo ve ark., 2004; R. Zhang ve ark., 2014). Ritmik olarak eksprese edilen birçok karaciğer geni, metabolizmada, detoksifikasyonda ve enerji homeostazında görev alan enzimleri kodlamaktadır. Sonuç olarak; karaciğer, böbrek ve ince barsakta ksenobiyotik metabolizması/endobiyotiklerin detoksifikasyonu, karaciğer, kas ve adipoz dokuda karbonhidrat ve lipid metabolizması, renal kan akımı, idrar oluşumu, kan basıncı ve kalp atış hızı gibi periferik organlarda gerçekleşen birçok fizyolojik fonksiyon sirkadiyan ritim göstermektedir (Dibner ve ark., 2010).

### 2.1.3. Sirkadiyan Saatin Moleküler Mekanizması

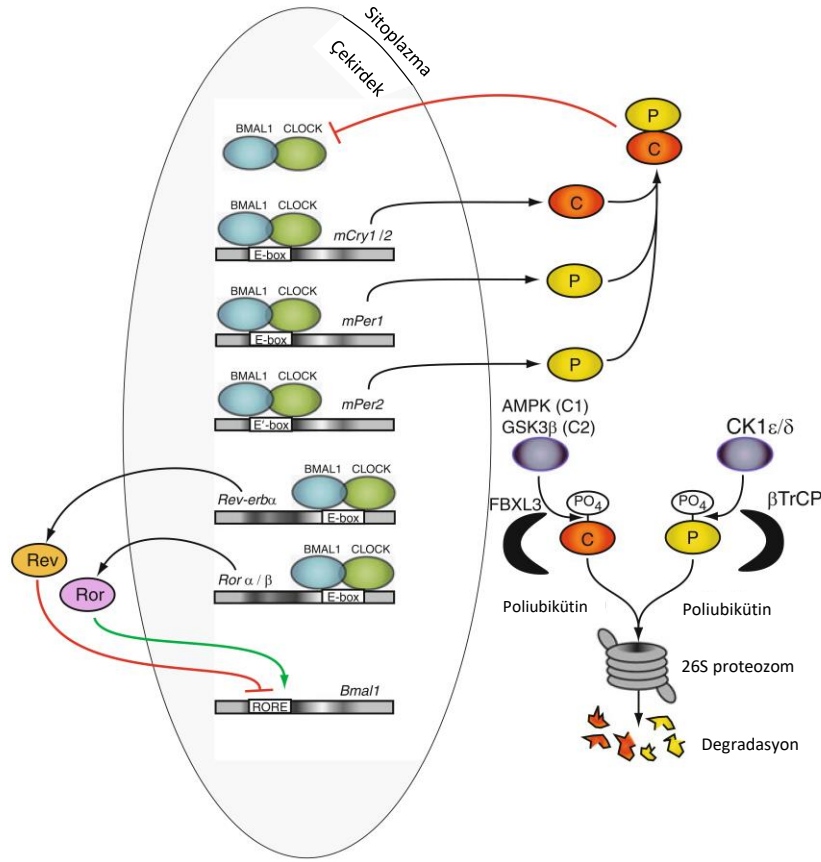
Memelilerde, moleküler saatin temelini oluşturan bir düzine saat geni, transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel aktivasyonu ve inhibisyonu düzenleyici döngülerde yer alarak her bir memeli hücresinde sirkadiyan osilasyonun oluşturulmasından sorumludur. Aktive edici ve baskılayıcılardan oluşan içiçe geçmiş geri bildirim döngüleri, pozitif ve negatif geri bildirim gen ağı motifini oluşturmaktadır (Kavakli ve ark., 2017; Levi & Schibler, 2007; Liu ve ark., 2007; Novak & Tyson, 2008).

Memelilerde ana saat genleri; *Clock* (ve paraloğu olan *Npas2*), *Bmal1* (veya *Arntl*) geri bildirim döngüsünün pozitif kolunu oluştururken; *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2* genleri negatif kolunu oluşturmaktadır. CLOCK ve BMAL1, basic helix-loop-helix

(bHLH) – PER-ARNT-SIM (PAS) transkripsiyon faktörlerindendir (Gekakis ve ark., 1998; King ve ark., 1997; Lowrey & Takahashi, 2011). CLOCK:BMAL1 ve NPAS2:BMAL1 protein dimerleri, *Per* ve *Cry* genlerinin transkripsiyonunun aktivasyonunu sağlamaları nedeniyle moleküler saatte önemli göreve sahiptir (Levi & Schibler, 2007; Liu ve ark., 2007). CLOCK:BMAL1 kompleksi, PER (*Per1*, *Per2*, *Per3*) ve CRY (*Cry1*, *Cry2*) proteinlerini kodlayan genlerin E-box içeren düzenleyici elemanlarına bağlanır (Gekakis ve ark., 1998; Kume ve ark., 1999; Shearman ve ark., 2000). Farelerde, CLOCK:BMAL1 aktivasyonu gündüz gerçekleşirken *Per* ve *Cry* genlerinin transkripsiyonu öğleden sonra gerçekleşir. PER, CRY proteinlerinin birikimi ise öğleden sonra geç saatlerde ya da akşam olur. PER ve CRY proteinleri birbirleriyle ve serin treonin kinazlar (kazein kinaz 1δ (CK1δ), CKε) ile etkileşime girerler (Gallego & Virshup, 2007; C. Lee ve ark., 2001; Lowrey & Takahashi, 2011). Gece nükleusa geçen PER ve CRY, CLOCK:BMAL1 kompleksiyle etkileşime girerek kendi transkripsiyonlarını baskılar ve sonuçta *Per* ve *Cry* genlerinin transkripsiyonu azalır. Spesifik E3 ligaz kompleksleriyle ubiquitinleme ve proteozom ile degradasyon prosesleri sonucunda PER ve CRY proteinlerinin düzeyleri azalır. PER ve CRY'dan oluşan baskılayıcı kompleks yıkıldıktan sonra CLOCK:BMAL1 transkripsiyonuyla, ertesi sabah yeni bir transkripsiyon döngüsü başlatılır. PER ve CRY proteinlerinin stabilitesi/degradasyon hızı, saatin periyodunun ayarlanmasını sağlamaktadır (Gallego & Virshup, 2007; Preußner & Heyd, 2016; Takahashi, 2017). Genetik ve biyokimyasal çalışmalar ile hesaplama çalışmaları, saat modülasyon faktörlerinden ve ek saat bileşenlerinden oluşan zengin bir ağın var olduğuna işaret etmektedir (Anafi ve ark., 2014; Robles ve ark., 2010) Nitekim, yapılan bir çalışmada *Gm129* geninin de ana saat proteinlerinden birini kodladığı ve BMAL1'in ömrünü düzenlediği gösterilmiştir (Annayev ve ark., 2014).

CLOCK:BMAL1 kompleksi *Cry* ve *Per* dışında, nükleer reseptörler olan ve sırasıyla *Nr1d1* ve *Nr1d2* tarafından kodlanan, nükleer reseptör *Rev-Erb alfa* ve *beta*'yı (REV-ERBα ve REV-ERBβ) da aktive etmektedir. REV-ERBα ve β, REV-ERB/Retinoik asit ilişkili yetim reseptör yanıt elemanlarına (retinoik asit related orphan receptor (ROR) response elements: ROREs) bağlanmak için RORα, RORβ ve RORγ ile yarışmaktadır. REV-ERBα ve β'nın ritmik ekspresyonu, *Bmal* ve *Clock*'un baskılanmasına neden olur ve buna bağlı olarak bu genlerde *Per* genine zıt fazlı

ekspresyon ritimleri oluşur (Preitner ve ark., 2002; Sato ve ark., 2004; Takahashi, 2017; Y. Zhang ve ark., 2015).



**Şekil 2-2: Memelilerde moleküler saatin şematik gösterimi -Ethan & Takahashi (2013)’dan değiştirilerek.**

CLOCK-BMAL1 transaktivasyon kompleksi, Proline-acidic amino acid-rich basic leucine zipper (PAR bZip) transkripsiyon faktörlerinin mRNA ekspresyonlarını ritmik bir biçimde kontrol etmektedir (Gachon ve ark., 2006). Albümin D bölgesi bağlayıcı protein (DBP), tirotrop embriyonik faktör (TEF) ve hepatik lösemi faktörü (HLF)’yi içeren PAR bZip transkripsiyon faktörleri, ksenobiyotik metabolizması ve detoksifikasyonunda görev alan C-androstan reseptörü (CAR), P450 oksido-redüktazları (POR), 5-amino-δ-levulinik asit sentetaz (ALAS1) gibi proteinlerin ekspresyonunu düzenlemektedir (Gachon ve ark., 2006; Levi & Schibler, 2007).

Moleküler saatteki sirkadiyan ritimler, fosforilasyon ve ubiquitinasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlarla kontrol edilmektedir. Posttranslasyonel modifikasyonlar, ana saat proteinlerinin stabilitesini ve nükleer translokasyonunu etkileyerek sirkadiyan saatin hassasiyetine önemli ölçüde katkıda bulunur. CK1δ ve

CK $\epsilon$ , ana sirkadiyan saat proteinlerinin döngüsünde önemli rol oynamaktadır (Ko & Takahashi, 2006). PER proteinleri, CK1 $\delta$  ve CK $\epsilon$  tarafından fosforilasyona tabi tutulmaktadır ve bu E3 ubikütin ligaz  $\beta$ -TrCP tarafından ubikütinlenmeye ve proteozomal degradasyona yatkınlığı kontrol etmektedir. (Eide ve ark., 2005; Meng ve ark., 2008; Ohsaki ve ark., 2008; Shirogane ve ark., 2005). AMP-aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) tarafından gerçekleştirilen CRY fosforilasyonu, CRY1 ve CRY2'yi E3 ubikütin ligazlar olan FBXL3 ve FBXL21 için hedef haline getirmektedir (Busino ve ark., 2007; Hirano ve ark., 2013; S.-H. Yoo ve ark., 2013).

Siklik transkripsiyonel aktivite için gerekli olan kromatin yeniden modellemesi, saate özgü ve yaygın olarak bulunan histon modifiye edici proteinler ile elde edilir ve birçok saat hedef geninde histonlarda (H3 ve H4) ritmik asetilasyon/deasetilasyon gözlemlenebilir (Etchegaray ve ark., 2003; Ripperger & Schibler, 2006; Sahar & Sassone-Corsi, 2013). CLOCK proteini, intrinsik histon asetil transferaz (HAT) aktivitesine sahiptir ve H3K9, H3K14 histonlarını asetillemektedir (Doi ve ark., 2006; Hirayama ve ark., 2007). Transkripsiyon döngüsünün başında CLOCK ve BMAL1 sırasıyla histon asetil transferazlar olan p300 ve CREB bağlayıcı protein (CBP) ile etkileşime girer ve böylece histonlar asetillenir, kromatinler transkripsiyon için uygun hale gelir (Curtis ve ark., 2004; Etchegaray ve ark., 2003; Hosoda ve ark., 2009; J. Lee ve ark., 2008). NAD<sup>+</sup> bağımlı histon deasetilaz (HDAC) sirtuin 1 (SIRT1); CLOCK, BMAL1 ve PER2 ile etkileşime girmekte ve CLOCK:BMAL1 kompleksinde inhibisyona neden olmaktadır. NAD<sup>+</sup> düzeylerine ilişkin sirkadiyan ritim, CLOCK:BMAL1 hedef geni olan *Nampt* ekspresyonu tarafından düzenlenmektedir ve SIRT1 aktivitesinde bir ritim oluşturmaktadır (Asher ve ark., 2008; Nakahata ve ark., 2008, 2009; Ramsey ve ark., 2009). CLOCK:BMAL1 kompleksinin metiltransferaz MLL1 (mixed lineage leukemia 1) ile etkileşime girmesi sonucu Histon H3K4 ritmik olarak metillenirken, histon lizin demetilazlar olan jumonji AT-rich interactive domain 1a (JARID1a) ve lizin-spesifik histon demetilaz 1A (LSD1) ile etkileşimi sonucu transkripsiyonal aktivasyon kolaylaştırılır (DiTacchio ve ark., 2011; Katada & Sassone-Corsi, 2010; Nam ve ark., 2014).

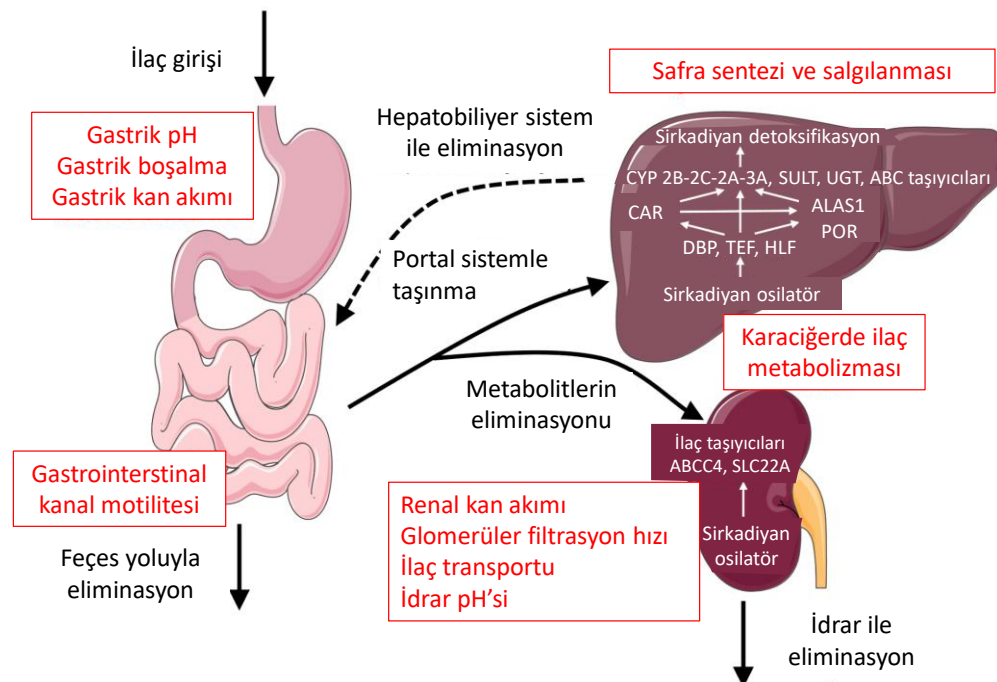
## 2.2. Kronofarmakoloji

Transkripsiyon ve translasyondan hücre içi sinyalizasyona hücresel fizyolojinin büyük kısmında görülen sirkadiyan ritimlere bağlı olarak birçok organ ve sistemde

günlük fizyolojik varyasyonlar ortaya çıkmaktadır. Organizma fizyolojisinde görülen sirkadiyan ritimlerin, ilaç farmakokinetiği, farmakodinamiği ve toksisitesinde oluşturduğu ritmik değişiklikleri inceleyen farmakoloji disiplini kronofarmakoloji olarak tanımlanır. Kronofarmakolojik çalışmalarda elde edilen bilgilerle yapılan kronoterapi uygulamaları, ilaç uygulama zamanlarını optimize ederek maksimum etkinliği sağlamayı ve toksisiteyi en aza indirmeyi hedeflemektedir (Dallmann ve ark., 2014; Gaspar ve ark., 2019).

### 2.2.1. Kronofarmakokinetik

Kronofarmakokinetik, ilacın farmakokinetiğini oluşturan absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon proseslerinde sirkadiyan ritimlerin sebep olduğu 24 saatlik değişiklikleri ifade etmektedir. Absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon süreçlerinde ve/veya ilaç toksisitesinde meydana gelen 24 saatlik değişiklikler, gastrik pH, mide ve barsak motilitesi, plazma proteinleri ve protein alt tipleri, membran mikroviskozitesi, reseptör yoğunluğu ya da bağlayıcı enzim aktivitesi, taşıyıcı proteinler ve iyon kanalları, karaciğer ve böbrek kan akımı, karaciğer metabolizması, safra hacmi ve tuz atılımı, böbrek glomerüler filtrasyon hızı, tübüler reabsorpsiyon hızı, üriner çıkış ve pH olarak sıralanan birçok fizyolojik faktöre bağlı olarak oluşmaktadır (Ballesta ve ark., 2017; Dallmann ve ark., 2016; Levi & Schibler, 2007). İlaç farmakokinetiğinin sirkadiyan saat tarafından düzenlenmesi Şekil 2-3'te gösterilmiştir.



**Şekil 2-3: İlaç farmakokinetiğinin sirkadiyan saat tarafından düzenlenmesi -DeBruyne ve ark. (2014)'ten değiştirilerek.**

Kırmızı tablolar içinde yer alan tüm parametreler, ilaç metabolizmasını ve taşınmasını ritmik bir biçimde etkilemektedir. Sirkadiyan saatin ilaç farmakokinetiğine ilişkin karakteristik fonksiyonları görev alan organlar üzerinde belirtilmiştir.

### 2.2.1.1. Absorpsiyon

Absorpsiyon, bir ilacın uygulandığı farmasötik formundan sistemik dolaşıma geçme hız ve miktarını belirleyen bir dizi prosesten oluşmaktadır. Absorpsiyonun değerlendirilmesinde maksimum konsantrasyon ( $C_{maks}$ ), maksimum konsantrasyona ulaşma zamanı ( $t_{maks}$ ), plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi altında kalan alan (Area under the curve: AUC) ve absorpsiyon hız sabiti ( $\lambda_a/k_a$ ) parametreleri kullanılmaktadır. Damar dışı yolla uygulanan bir ilacın absorpsiyonunda ilaç ve dozaj formuna ilişkin faktörler ve biyolojik fonksiyona ait faktörler değişikliğe sebep olabilmektedir (Bélanger ve ark., 1997).

İlaç absorpsiyonunda değişikliğe sebep olan biyolojik fonksiyona ilişkin faktörler; mide kan akımı, mide boşalma hızı, mide pH'sı, gastrointestinal kanal motilitesi, enzimler, safra sekresyonu, yüzey alanı, membran geçirgenliği, taşıyıcı proteinler ve açlık/tokluk durumu olarak sıralanabilir (Bélanger ve ark., 1997).

İnsanda mide pH'sındaki sirkadiyan değişimler, ilk olarak Moore ve Englert (1970) tarafından yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Mide pH'sındaki değişiklikler ilacın iyonizasyonunu ve çözünürlüğünü etkilemektedir. Sirkadiyan osilasyon gösteren mide kan akımı ve motilitesi, gündüz artarken gece azalmaktadır. Sonuç olarak, çoğu ilacın absorpsiyonu mide kan akımı, gastrointestinal kanal motilitesi ve mide pH'sındaki artışa paralel olarak sabah daha fazladır (Musiek & Fitzgerald, 2013). Midede oksintik hücreler tarafından üretilen ve üretimi sirkadiyan saat genleri tarafından düzenlenen ghrelin hormonu, beslenmeden önce aktivitedeki (gıda beklenti aktivitesi) sirkadiyan değişiklikleri düzenlemektedir (Lesauter ve ark., 2009). Oksintik hücreler, gastrointestinal kanalın sirkadiyan osilasyonunu ışıktan ziyade yemek yeme zamanlarına göre düzenlemektedir (Musiek & Fitzgerald, 2013).

Gastrointestinal kanalda görev yapan dışa atım (efluks) proteinleri, ksenobiyotikleri sitoplazmadan barsak lümenine pompalayarak birçok ilacın absorpsiyonunu ve biyoyarlanımını azaltmaktadır (Bardal ve ark., 2011; Levi & Schibler, 2007). Dışa atım proteinleri olan ATP bağlayıcı kaset (ABC) ailesinden çok

sayıda proteinin ekspresyonu sirkadiyan varyasyon göstermektedir. P-glikoprotein (P-gp, *Mdr1a*, *Abcb1a*), meme kanseri rezistans proteini (Bcrp, *Abcg2*), çoklu ilaç direnci ilişkili protein'in (*Mrp2*, *Abcc2*) ince bağırsaktaki ritmik ekspresyonları PAR bZIP ailesine ait transkripsiyon faktörleri başta olmak üzere sirkadiyan transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenmektedir. Farelerde ritmik intestinal *Mdr1a* mRNA ekspresyonunun, HLF ve E4 promotör bağlayıcı protein-4 (E4BP4) tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (Ando ve ark., 2005; Murakami ve ark., 2008). Okyar ve ark. (2019) tarafından fare ileum dokusunda yapılan bir çalışmada, P-gp'ye ait mRNA ve protein düzeylerinde cinsiyete bağlı olarak farklılık gösteren sirkadiyan değişiklikler rapor edilmiştir. Ando ve ark. (2005) tarafından C57BL/6j soyu farelerde yapılan çalışmada, *Abcb1a* mRNA ekspresyonuna ilişkin pik değeri karaciğer dokusunda ZT16'da, barsak dokusunda ise ZT12'de görülmüştür. İntestinal dokuda protein ekspresyonuna ait çukur değeri ZT0'da, pik değeri ZT8'de görülmüştür. P-gp substratı olan digoksinin intestinal birikimi değerlendirildiğinde, ZT12'de ZT0'a kıyasla anlamlı olarak düşük bulunmuştur ve bu P-gp aktivitesinin de sirkadiyan varyasyon gösterdiğine işaret etmektedir (Ando ve ark., 2005). Murakami ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada da benzer şekilde *Abcb1a* mRNA düzeylerinin ZT10'da pik yaptığı gösterilmiştir. Ayrıca *Clock*<sup>-/-</sup> farelerin ileum dokusunda, yabanıl tip farelere kıyasla P-gp aktivitesi azaldığı ve *Clock*<sup>-/-</sup> farelerde P-gp ekspresyonu sirkadiyan ritim göstermediği görülmüştür (Murakami ve ark., 2008). Farelerin ileum dokusunda yapılan bir çalışmada, *Abcc2*'ye ait ortalama mRNA ve protein ekspresyonlarında zamana bağlı olarak 2-6 kat arası farklılık görülmüştür (Okyar ve ark., 2011). Sirkadiyan ritim gösteren *Abcc2* (*Mrp2*) ekspresyonu karaciğer ve böbrekte ZT12'de, intestinal dokuda ise ZT8'de pik yapmaktadır (Ando ve ark., 2005).

İntestinal ilaç absorpsiyonunda görev yapan ve solüt taşıyıcılar ailesinde (SLC) yer alan peptid taşıyıcı-1 (PepT1, *Slc15a1*), organik katyon taşıyıcı yeni tip-1 (Octn-1, *Slc22a4*) gibi proteinleri kodlayan genler de sirkadiyan ritim göstermektedir (Okamura ve ark., 2014; Wada ve ark., 2015). Yemekten sonra intestinal lümene salgılanan safra asitleri, hem yağların sindiriminde görev almakta hem de epitel hücrelerindeki gen ekspresyonunu düzenlemektedir (Sinal ve ark., 2001). Okamura ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada, safra asitlerinin farelerin intestinal hücrelerinde zamana bağlı olarak biriktiği ve bu zamana bağlı birikimin peroksizom proliferatör aktive edici reseptör- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) aracılı transaktivasyonun periyodik olarak baskılanması

mekanizması ile intestinal peptid absorpsiyon taşıyıcısı olan PepT1 ekspresyonunda sirkadiyan değişikliklere sebep olduğu gösterilmiştir. Ekspresyonunun PPAR $\alpha$  aracılığıyla düzenlendiği gösterilen bir diğer gen *Slc22a4* ve kodladığı protein olan Octn-1 de belirgin sirkadiyan osilasyon göstermektedir. Farelerde yapılan çalışmalarda, Octn-1 ekspresyonunda görülen sirkadiyan osilasyonların antiepileptik bir ajan olan gabapentinin barsaktan emiliminde uygulama zamanına bağlı değişikliklere neden olduğu ortaya koyulmuştur (Wada ve ark., 2015).

İlaç absorpsiyonunda değişikliğe sebep olan ilaç ve dozaj formuna ilişkin faktörlerden biri suda ve yağdaki çözünürlüktür (Bélanger ve ark., 1997). Absorpsiyonda görülen sirkadiyan değişiklikler, yağda çözünen (lipofilik) ilaçlar için daha belirgin olmaktadır. Ayrıca, mikrozomal transport proteini (MTP) gibi lipid transportunda rol oynayan bazı proteinler sirkadiyan saatin kontrolü altındadır. İnsanda birçok lipofilik ilaç için, gastrointestinal kanal kan akımı ve mide pH'sındaki artışa paralel olarak genellikle sabah (aktivite döneminde), akşam saatlerine göre absorpsiyon hızı ve miktarı daha fazladır,  $C_{maks}$  değerleri daha yüksektir ve  $t_{maks}$  daha kısadır (Baraldo, 2008; Musiek & Fitzgerald, 2013; Pan ve ark., 2010; Selfridge ve ark., 2016). Shiga ve ark. (1993) tarafından hipertansiyon hastalarında yapılan çalışmada, yağda çok çözünen bir beta bloker olan propranololün emilimi sabah geceye göre anlamlı olarak daha fazlayken, suda çözünebilen beta bloker atenolol için emilim açısından günlük sirkadiyan varyasyon görülmemiştir. Farelerde yapılan bir çalışmada yabanıl tip farelerde lipid absorpsiyonunda sirkadiyan değişiklikler görülürken (en fazla absorpsiyon aktivite döneminde), *Clock* geni mutant olan farelerde zamana bağlı herhangi bir değişiklik görülmemektedir. Ayrıca *Clock* mutant farelerde, barsaktaki sirkadiyan aktivitenin bozulmasına bağlı olarak karbonhidrat, yağ ve proteinlerin absorpsiyonunun düzenlenmesinde bozukluk görülmektedir (Pan & Hussain, 2009).

#### 2.2.1.2. Dağılım

İlaçların dağılımına etki eden faktörler; vücut hacmi ve kompozisyonu, kan akımı, plazma proteinlerine bağlanma, ilaçların yağda çözünürlüğü ve membran permeabilitesidir (Bélanger ve ark., 1997). İlacın, doku kompartmanına difüze olarak etkisini oluşturabilmesi için plazmada serbest halde bulunması gerekmektedir. Serbest ilaç düzeyindeki değişiklikler, etkinlik ve yan etki profili açısından önem taşımaktadır. Plazma proteinlerinden albumin, globulin ve  $\alpha$ -1-glikoproteininin sirkadiyan ritim

gösterdiğine dair çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Glukokortikoid bağlayıcı protein transkriptinin plazma düzeyleri de sirkadiyan varyasyon göstermektedir. İnsanda ve kemirgenlerde yapılan çeşitli çalışmalarda, valproik asit, karbamazepin, diazepam, dizopiramid, lidokain, prednizolon, sisplatin ve propranololün proteinlere bağlanma miktarında sirkadiyan değişiklikler gösterilmiştir (Bélanger ve ark., 1997; Kanabrocki ve ark., 1988; Musiek & Fitzgerald, 2013; Scheving & Pauly, 1968). Suda çözünürlüğü yüksek olan ilaçlar, doku kompartmanına geçebilmek için membran proteinlerine (taşıyıcılar/ kanallar) ihtiyaç duymaktadır ve bu proteinlerin sirkadiyan regülasyonu ilaç dağılımında değişikliklere sebep olmaktadır (Musiek & Fitzgerald, 2013). Kan akımı ve kardiyak output, otonom sinir sistemi aracılığıyla oluşan sirkadiyan değişiklikler nedeniyle insanda sabah saatlerinde akşama göre daha fazla olmaktadır. Buna bağlı olarak ilaçların doku dağılımında değişiklikler olmaktadır (Baraldo, 2008).

### 2.2.1.3. Metabolizma

İlaçların hepatik metabolizması genellikle faz I ve faz II olmak üzere iki basamakta gerçekleşmektedir. Faz I reaksiyonları, çoğunlukla sitokrom P450 enzimleri tarafından gerçekleştirilen oksidasyon, redüksiyon, hidroliz ya da siklizasyon reaksiyonlarından oluşurken, faz II reaksiyonları glutatyon-S-transferaz (GSH), UDP glukuroniltransferaz (UGT), metil transferaz, N-asetil transferaz (NAT) ve sülfotransferaz (SULT) enzimleri tarafından gerçekleştirilen konjugasyon reaksiyonlarından oluşmaktadır. Ksenobiyotiklerin hücre dışına atılmasından sorumlu olan ABC taşıyıcı proteinleri ve hücre içine taşımada görev yapan Slc ailesi faz III başlığı altında bulunmaktadır. Faz I, faz II metabolize edici enzimlerine ve faz III taşıyıcılarına ilişkin aktivitelerin, protein ve/veya mRNA düzeylerinin sirkadiyan ritimlerle düzenlendiği bilinmektedir (Ballesta ve ark., 2017; Musiek & Fitzgerald, 2013; N. Ozturk ve ark., 2017). Faz I, II ve III metabolizma ve transport yollarının sirkadiyan koordinasyonu, ksenobiyotiklerin suda çözünürlüğünü ve eliminasyonunu zamana bağlı olarak en etkin şekilde sağlamaya yöneliktir ve organizmanın günlük muhtemel ksenobiyotik maruziyeti döngülerine adaptasyonu gibi düşünülebilir (Dallmann ve ark., 2016; Lévi ve ark., 2010).

Sirkadiyan transkripsiyonun düzenlenmesinde rol oynayan genler, ilaç metabolizmasındaki birçok yolağı doğrudan kontrol etmektedir. PAR bZIP transkripsiyon faktörleri olan DBP, TEF ve HLF; POR, ALAS, CAR, PPAR- $\alpha$  ve aril

hidrokarbon reseptörü (AHR) proteinlerini koplayan genlerin D-box içeren promotörlerine ritmik bir biçimde bağlanmakta ve böylelikle ksenobiyotik metabolizmasını düzenlemektedir (Ballesta ve ark., 2017). Gachon ve ark. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada, PAR bZip proteinlerinin üçlü knock-out olduğu farelerde faz I enzimlerinden *Cyp2b*, *Cyp2c*, *Cyp3a*, *Cyp4a*'ya ilişkin genlerin ve CYP oksidoredüktazları, aldehid dehidrojenaz (ALDH), GSH, SULT, UGT proteinlerine ait gen ekspresyonlarının azaldığı belirlenmiştir. PAR bZip knock-out farelerde hepatik metabolizmada ciddi bozulma görülmüş ve ksenobiyotiklere karşı duyarlılık artmıştır. Kang ve ark. (2007) tarafından fare karaciğer dokusunda yapılan analizlerde, ROR- $\alpha$  ve  $\gamma$  genleri knock out olan farelerde birçok faz I ve faz II enziminin düzeylerinde belirgin azalma görülmüştür (Musiek & Fitzgerald, 2013).

Fare ve sıçanlarda yapılan çalışmalar, birçok sitokrom P450 (CYP) geninin sirkadiyan ekspresyon profili izlediğini göstermiştir (Desai ve ark., 2004; Hirao ve ark., 2006; Y. K. J. Zhang ve ark., 2009). Farelerde *Cyp2a4* ve *Cyp2a5* ekspresyonları direkt olarak DBP proteini tarafından kontrol edilmekte ve güçlü sirkadiyan osilasyon göstermektedir. Sıçan ve farelerde, çoğu mikrozomal oksidaz enziminin aktivitesi karanlık dönemde yani aktivite periyodunda en yüksek düzeyindeyken, aydınlık dönemde yani dinlenme periyodunda en düşük seviyededir. Yapılan çalışmalarda, sirkadiyan ritimlere bağlı olarak karaciğer ve bağırsaktaki sitokrom P-450 oksidoredüktazlarının (POR) mRNA ekspresyonlarında 2-8 kat değişiklik görülmüştür ve maksimum POR mRNA ekspresyonu ZT12'dedir. Karaciğer ve bağırsaktaki maksimum mRNA ekspresyonu *Cyp2b10* enzimi için ZT16'da, *Cyp2c50* enzimi için ZT20'dedir (Gachon ve ark., 2006; Lévi ve ark., 2010).

Faz I metabolik reaksiyonlarında önemli rol oynayan CES'lerin ritmik transkripsiyonunun PAR bZip proteinleriyle kontrol edildiği in vivo ve in vitro çalışmalarla gösterilmiştir (Ballesta ve ark., 2011; Gachon ve ark., 2006). CES enzimi, antikanser ilaçlar olan kapesitabin ve irinotekanın biyoaktivasyonunda rol oynamaktadır. Sirkadiyan ritim gösteren faz I DPD enziminin aktivitesine bağlı olarak, 5-fluorourasil ve kapesitabinin sırasıyla dehidrojenasyon ve deaminasyonu zamana bağlı değişiklikler göstermektedir (Lévi ve ark., 2010). B6D2F<sub>1</sub> soyu erkek farelerde yapılan bir çalışmada, karaciğerde DPD ekspresyonunun ZT15'te, aktivitesinin ise ZT3'te yani dinlenme döneminde pik yaptığı görülmüştür. Kosinor analizine göre, DPD

ekspresyonu ve aktivitesinin akrofazı arasındaki gecikme süresi 16 saattir (Porsin ve ark., 2003). 5-FU metabolizmasında görev alan ve sitotoksik metabolitleri oluşturan orotat fosforiboziltransferaz, uridin fosforilaz ve deoksitimidin kinaz enzimlerinin aktiviteleri, fare ve sıçanlarda aktivite periyodunda en yüksektir ve buna bağlı olarak 5-FU'nun sağlıklı dokulara olan toksisitesi en fazladır (Levi & Schibler, 2007).

Faz II ilaç metabolizmasında rol oynayan GST enzimi aktivitesinde ve glutatyon içeriğindeki sirkadiyan değişiklikler, paresatemol, platin/kadmiyum bileşikler gibi ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda büyük öneme sahiptir (Matsunaga ve ark., 2004; N. Miura ve ark., 2013). Farelerde, karaciğer ve jejunumdaki GSH düzeylerinin sirkadiyan ritim gösterdiği ve gün ortasına kıyasla gecenin ikinci yarısında yaklaşık 3 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur. GSH biyosentezi inhibe edilen farelerde sisplatin uygulaması sonucu görülen toksisite artmış, ayrıca sisplatine bağlı toksisite ve sağkalım ilaç uygulama zamanına göre değişiklik göstermiştir (X. M. Li ve ark., 1997). UGT aktivitesi, sıçanlarda aktivite döneminde pik yapmakla beraber *Ugt1a1*'in sirkadiyan ekspresyonu tür, soy ve cinsiyete göre değişiklik göstermektedir. UGT1A, selisiklib, irinotekan ve irinotekanın aktif metaboliti olan SN-38'in detoksifikasyonunda görev alır (Y. Guo ve ark., 2007; Lévi ve ark., 2010; X. M. Li ve ark., 2013).

Hepatobiliyer taşıyıcılar, karaciğer hücreleri tarafından ksenobiyotiklerin hücre içine taşınmasında ve atılımında görev almakta ve ilk geçiş etkisine katkı sağlamaktadır. Karaciğer SLC proteinleri, ksenobiyotiklerin sinuzoidal membrandan hücre içine alınmasını sağlarken; ABC proteinleri, ksenobiyotiklerin ve metabolitlerin hepatositlerin dışına safraya ya da böbreklerle elimine edilmek üzere kana atılmasını sağlamaktadır. SLC ailesindeki organik anyon taşıyıcılardan *Oatp1a1*, *Oatp1a4*, *Oatp1b2* ve *Oat2* ile organik katyon taşıyıcılardan *Oct1*'in fare karaciğerindeki mRNA ekspresyonlarının diurnal ritimler izlediği gösterilmiştir. Absorpsiyon başlığı altında detaylı olarak bahsedilen ve metabolizmada da rolü olan ABC proteinlerine ilişkin olarak fare karaciğer dokusunda yapılan çalışmalarda, *Abcb1a*, *Abcb1b*, *Abcc2*, *Abcg2*, *Abcb4* mRNA ekspresyonlarının sirkadiyan ritim gösterdiği belirlenmiştir (Y. K. J. Zhang ve ark., 2009).

#### 2.2.1.4. Eliminasyon

Suda çözünen çoğu ilaç ya da metabolit renal yol ile yani idrarla elimine edilmektedir. Böbrekten (renal) eliminasyona ilişkin faktörler olan, glomerüler

filtrasyon hızı, tübüler reabsorpsiyon, tübüler sekresyon, böbrek kan akımı, idrar hacmi ve pH'sı ve bunlara bağlı olarak çeşitli ilaçların idrarla atılımı sirkadiyan ritim göstermektedir (Bélanger ve ark., 1997; Dallmann ve ark., 2014; Musiek & Fitzgerald, 2013). Böbrek kan akımı ve glomeruler filtrasyon hızına ilişkin sirkadiyan ritimler, aktif dönemde pik yapmaktadır (Koopman ve ark., 1989). Sirkadiyan saatin renal eliminasyonun düzenlenmesindeki rolü, *Cry 1/Cry2* ikili knock out (DKO) farelerde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. *Cry1/2* DKO farelerde, renal kan akımında anormallik görülmektedir ve bu duruma renin-anjiyotensin-aldosteron sistemindeki bozulmanın ya da arteriyal kan bazıncı ve kardiyak output'taki değişikliklerin neden olduğu düşünülmektedir (Doi ve ark., 2010). Suda çözünen ilaçların ve küçük organik iyonların böbrekten reabsorpsiyonu ve sekresyonu, proksimal tübül ve böbrekteki ABC ve SLC taşıyıcı proteinlerinin diurnal ekspresyonuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Selfridge ve ark., 2016). PAR bZip üçlü knock out farelerde yapılan bir çalışmada, knockout farelerin böbreklerinde *Abcc4* ve *Slc22a7* ekspresyonunun heterozigot farelere kıyasla anlamlı biçimde azalmış olduğu görülmüştür. Bu sonuç, tübüler reabsorpsiyon ya da sekresyonun sirkadiyan saat tarafından kontrol edildiğine işaret etmektedir (Dallmann ve ark., 2014; Gachon ve ark., 2006). Oda ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada, fare böbrek dokusuna organik katyon taşıyıcı-2'nin (OCT2-*Slc22a2*) protein ve mRNA ekspresyonlarına ilişkin sirkadiyan ritim gösterilmiştir. *Clock/Clock* mutant farelerde, yabanıl tipe kıyasla OCT2-*Slc22a2* ve MATE1-*Slc47a1* protein-mRNA ekspresyonlarının azaldığı ve bu taşıyıcıların sirkadiyan ritim göstermediği belirlenmiştir. Ayrıca, renal proksimal tübülde sisplatin eliminasyonunda görev yapan OCT2'nin, böbrek dokusunda zamana bağlı olarak değişen protein düzeyi ile sisplatin nefrotoksitesinin sirkadiyan ritmi arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (Oda ve ark., 2014). İdrardaki pH değişiklikleri, ilacın iyonizasyonu ile çözünürlüğünü ve nefrondan reabsorpsiyonunu etkilemektedir. İdrar pH'sı genellikle sabah saatlerinde daha düşük olmaktadır. Sodyum-proton değiştirici-3 (NHE3 ya da SLC9A3), proksimal tübülde eksprese edilmekte ve idrar pH'sında sirkadiyan değişiklere sebep olmaktadır (Dallmann ve ark., 2014). Fare ve sıçanlarda yapılan çalışmalarda böbrek dokusundaki NHE3 mRNA ve/veya protein ekspresyonlarının sirkadiyan ritim gösterdiği ve mRNA ekspresyonunun aktivite periyodunun ortasında pik yaptığı görülmüştür. Yabanıl tipteki farelerin aksine

*Cry1/Cry2* DKO farelerin böbrek dokusunda NHE3 ekspresyonun sirkadiyan varyasyon göstermediği belirlenmiştir (Rohman ve ark., 2005).

İlaç eliminasyonundaki ikinci yol hepatobiliyer eliminasyondur. Bazı ilaçlar hepatobiliyer (safra-karaciğer üzerinden) sistemle gastrointestinal kanala atıldıktan sonra tekrar emilip karaciğerde metabolizmaya uğramakta ya da feçes ile elimine edilmektedir. Hepatobiliyer taşınmada, ilaç ya da metabolitlerinin yapısına göre ABC proteinleri ailesinden safra tuzu dışarı atım pompası (BSEP/ABCB11), MRP2, MDR2 (ABCB4), MDR1, ABCG5/8, BCRP taşıyıcı proteinleri görev almaktadır (Dallmann ve ark., 2014). Ksenobiyotiklerin, safra asitlerinin ve lipidlerinin safra yoluyla atılımının sirkadiyan ritim gösterdiği, kemirgenlerde yapılan çalışmalarda ortaya koyulmuştur (Nakano ve ark., 1990). Safra sekresyonunda görev yapan taşıyıcı proteinleri kodlayan genlerin birçoğu, karaciğerde sirkadiyan ritmik olarak eksprese edilmektedir. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda ampisilinin ve flomoksefin safra ile atılımında ilaç uygulama zamanına bağlı olarak değişiklikler görülmüştür (Hishikawa ve ark., 2003; Mesnard-Ricci & White, 1998). İnsanda 09:00 veya 21:00'de flomoksef uygulandıktan sonra 6 saat boyunca perkütan transhepatik biliyer drenaj ile izole edilen safrada bulunan ilaç miktarı uygulama zamanına bağlı olarak değişiklik göstermiştir (Hishikawa ve ark., 2001).

### 2.2.2. Kronofarmakodinamik

Kronofarmakodinamik, ilacın farmakodinamiğinde sirkadiyan ritimlere bağlı olarak oluşan yaklaşık 24 saatlik değişiklikleri ifade etmektedir. Sirkadiyan ritimler ilaç aktivitesini hem ilaca ilişkin direkt intraselüler hedefler ve bununla ilişkili yollar üzerine etki ederek hem de kardiyovasküler sistem, immun sistem, sinir sistemi, enerji düzenlenmesi gibi fizyolojik fonksiyonları kapsayan ekstraselüler çevreye etki ederek modüle ederler (Ballesta ve ark., 2017).

Reseptör-ligand (ilaç, hormon ve nörotransmitter gibi) etkileşimi ve sinyalizasyona ilişkin parametrelerdeki sirkadiyan varyasyonlar, farmakodinamik olarak karakterize edilen ilk biyolojik süreçlerdendir. Elde edilen bulgular, potens, efikasite, reseptör duyarlılığı ve reseptör-ligand etkileşimi sonucu uyarılan sinyalizasyon yollarında diurnal varyasyonların olduğunu göstermiştir. Yakın zamanlarda, spesifik sirkadiyan saat genlerinin silindiği/işlevsiz hala getirildiği fare genetik modellerinde yapılan çok sayıda çalışmada hedef fonksiyonda ve ilaç etkinliğinde moleküler saatin

önemi gösterilmiştir. Yıllar içinde edinilmiş olan, kardiyovasküler sistem ilaçları, kemoterapötikler, analjezikler, antidepresanlar, anksiyolitikler, antipsikotikler gibi birçok ilaç grubunun kronofarmakodinamiğine ilişkin bilgiler, bu ilaçlarla yapılan tedavilere çok sayıda katkı sağlamaktadır. (Musiek & Fitzgerald, 2013; Reinberg, 1992; Selfridge ve ark., 2016).

Kronofarmakodinamik değişikliklerin görüldüğü ilaç gruplarına ilişkin örneklerden biri olan kardiyovasküler sistem ilaçları hakkında çokça çalışma yapılmıştır. Hemodinamik parametreler, ventriküler atım hacmi, kalp atış hızı, noradrenalin, renin, anjiyotensin, aldosteron gibi hormonların ve siklik adenozin monofosfatın (cAMP) plazma konsantrasyonları, trombosit agregasyonuna eğilim ve fibrinolitik aktivitede görülen sirkadiyan varyasyonlar ilaç farmakodinamiğinde değişikliğe neden olabilmektedir. Glukokortikoidler, anjiyotensin II ve katekolaminlerin salıverilmesi ve endotelial NO sentaz aktivitesinde görülen diurnal varyasyonlar, vazoaftif yanıtı ve kan basıncını etkilemektedir. Miyokard enfarktüsü ya da iskemiye ilişkin semptomlar, gündüz 06:00-12:00 saatleri arasında pik yapmaktadır. Anjina ataklarının en sık olarak 02:00-04:00 saatleri arasında görüldüğü bilinmektedir. Kardiyovasküler sistem hastalıklarında yaygın olarak kullanılan ajanlar olan propranolol gibi  $\beta$ -blokerlerin, sabah erken saatlerde alınması önerilmektedir. Sabah erken saatlerde alınan propranolol, aktivite periyodunun başında  $\beta$ -adrenoreseptörleri bloke ederek hemodinamik koşullarda ve kalp atış hızında değişikliğe neden olmaktadır. Nitrat türevi ilaçlar, uygulama zamanına bağılı olarak önemsenmeyecek farmakokinetik değişiklikler göstermesine karşın, bu ilaçların terapötik etkinliği sabah erken saatlerde (yaklaşık sabah 02:00) uygulandığında daha belirgin olmaktadır (Lemmer ve ark., 1991; Paschos & FitzGerald, 2010; Selfridge ve ark., 2016).

Önemli kronofarmakodinamik değişikliklerin görüldüğü ve çokça çalışılan ilaç gruplarından olan antikanser ilaçların birçoğu belirli hücre döngüsü safhalarını hedeflemektedir. Memelilerde, birçok fizyolojik fonksiyon gibi hücre döngüsü, DNA tamiri ve apoptoz da sirkadiyan zamanlama sistemi tarafından düzenlenmektedir. Kanser kemoterapisine bağılı olarak, özellikle sağlıklı kemik iliğı, gastrointestinal kanal ve deri hücrelerinde toksisite görölme sıklığı daha fazladır (Lévi ve ark., 2007). Farelerin total kemik iliğı dokularında yapılan çalışmalarda, S ve G2/M fazındaki hücrelerin oranı karanlık fazın ikinci yarısında %50 oranında artarken, G0-G1 fazındaki

hücrelerin aydınlık fazda daha fazla olduğu görülmüştür. Farelerde, kemik iliğinde antiapoptik B-hücreli lenfoma 2 (BCL2) proteininin ekspresyonu gün içinde 3 kat değişiklik göstererek, aydınlık fazın başında pik yapmaktadır. Proapoptik BCL2-ilişkili X (BAX) proteini ise gün içinde 5 kat değişiklik göstermekte ve zıt şekilde ZT15'te pik yapmaktadır (Granda ve ark., 2004; Tampellini ve ark., 1998). Farelerde aydınlık fazda (dinlenme fazı), hücrelerin ağırlıklı olarak G0-G1 fazında bulunmasının, BCL2'nin yüksek ve BAX'in düşük olmasının 5-FU, gempitabin, irinotekan ve dosetaksel gibi antikanser ilaçların tolere edilebilirliğine katkı sağladığı düşünülmektedir (Filipski ve ark., 2004; Granda ve ark., 2001; Lévi, 2003; X. M. Li ve ark., 2005; Tampellini ve ark., 1998). Antikanser ilaçlardan 5-FU'nun hedefi olan timidilat sentaz enziminin aktivitesi, yaklaşık olarak karanlık fazın ortasında pik yapmaktadır. Farelerde yapılan çalışmalarda timidilat sentaz (TS) pik zamanının, 5-FU'nun hematolojik toksisitesinin en yüksek olduğu zamanla aynı olduğu görülmüştür (Wood ve ark., 2006). Faz I ve faz II metabolik enzimlerindeki sirkadiyan ritimler, kısmen irinotekan farmakolojisini belirlemekle beraber, irinotekanın hedeflediği protein olan ve genellikle geç S fazında daha aktif olan topoizomera 1 (Top 1) aktivitesindeki ritmik değişikliklerin, farelerde irinotekanın dinlenme döneminde hematolojik toksisite açısından daha iyi tolere edilmesine katkı sağladığı gösterilmiştir (Kuramoto ve ark., 2006; Ohdo ve ark., 1997).

### 2.3. Kronoterapi

Kronoterapi, toksisite ile advers etkileri en aza indirmek ve tedavinin etkinliğini artırmak amacıyla tedavinin biyolojik ritimlere göre en uygun zamanda gerçekleştirilmesidir. Kronoterapi kapsamında cerrahi, fiziksel ajanlar, psikoterapi, profilaksi gibi birçok farmakolojik ve non-farmakolojik yaklaşımlar bulunmaktadır (Ballesta ve ark., 2017; Sancar ve ark., 2015; Selfridge ve ark., 2016).

1960-70'li yıllarda yapılan prelinik çalışmalarda sirkadiyan zamana bağlı olarak metopirapon, morfin, lidokain, oubain, metadon, arabinozilsitozin, siklofosfamid ve lityuma ilişkin ilaç toksisitesinde 7 kata kadar değişiklik oluşabildiği gösterilmiştir. Bu çalışmalar metodolojik problemler nedeniyle çeşitli tartışmalara sebep olmuş olsa da, sonraki yıllarda yaklaşık 50 tanesi antikanser ilaçlar olmak üzere 400'den fazla ilacın fare ve sıçanda sirkadiyan zamana bağlı farmakolojisinin gösterilmesine öncülük etmiştir (Dallmann ve ark., 2016; Lévi ve ark., 2010; Levi & Schibler, 2007). Laboratuvar hayvanlarında yapılan deneysel çalışmalarda sirkadiyan saate bağlı olarak

tolere edilebilirlik, farmakokinetik ya da efikasitesinde değişiklik olduğu belirlenen antikanser ilaçlar ve ilgili referanslar Tablo 2-1’de listelenmiştir. Antikanser ilaçların deney hayvanlarındaki potansiyel letal dozları uygulama zamanına bağlı olarak 2-10 kat değişebilmektedir (Lévi ve ark., 2010).

Kronoterapiyi konvansiyonel tedaviyle kıyaslayan çeşitli Faz-III klinik çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, kronoterapi konvansiyonel tedaviden beş kata kadar daha iyi tolere edilirken, kronoterapi ile elde edilen efikasite konvansiyonel tedavinin neredeyse iki katı olmaktadır (Dallmann ve ark., 2016). Kanser tedavisinin en uygun zamanda gerçekleştirilmesi, antikanser ilaçların genellikle maksimum tolere edilen doza yakın dozlarda kullanılması ve ciddi advers etkilere neden olabilmesi nedeniyle özel bir öneme sahiptir (Ballesta ve ark., 2017). Antikanser ilaçların hedefleri olan hücre döngüsü, apoptoz, DNA tamiri moleküler düzeyde sirkadiyan saatin kontrolü altındadır. Tümör dokusunda, genellikle sirkadiyan organizasyon bozulmuştur ve sağlıklı doku ile tümör dokusunun sirkadiyan ritimler açısından farklılığı, antikanser ilaçlarla tedavi zamanlamasında kanser hücreleri hedeflenirken sağlıklı hücreleri korumak amacıyla fayda sağlayabilmektedir. Ayrıca metabolizma ve detoksifikasyondaki zamana bağlı değişiklikler doz kısıtlayıcı olabilen sitotoksik etkide önemli değişikliklere sebep olabilmektedir (Kettner ve ark., 2014; Levi & Schibler, 2007). Son yıllarda antikanser ilaçlarla gerçekleştirilen bazı kronoterapi çalışmaları örnekleri ve elde edilen temel bulgular Tablo 2-2’de özetlenmiştir.

**Tablo 2-1: Deney hayvanlarında sirkadiyan saate bağlı olarak tolere edilebilirlik, farmakokinetik ya da efikasitesinde değişiklik olduğu belirlenen antikanser ilaçlar ve ilgili referanslar -Lévi ve ark. (2010)’dan değiştirilerek.**

| Farmakolojik Grup                   | İlaç ismi           | Gerçekleştirilen çalışmalar ve ilgili referanslar                                         |                                                                              |                                                                                           |
|-------------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                     |                     | Tolerans                                                                                  | Farmakokinetik                                                               | Efikasite                                                                                 |
| <b>Antimetabolitler</b>             | D-aktinomisin       | Concannon ve ark., 1973                                                                   | -                                                                            | -                                                                                         |
|                                     | Metotreksat         | English ve ark., 1982; Ohdo ve ark., 1997                                                 | Efimov ve ark., 1992; Ohdo ve ark., 1997                                     | Efimov ve ark. 1992                                                                       |
|                                     | 5-Fluorourasil      | Burns & Beland, 1984; Popovic ve ark., 1982; Wood ve ark., 2006                           | Codacci-Pisanelli ve ark., 1995; Harris ve ark., 1989; Kobuchi ve ark., 2020 | Peters ve ark., 1987; Wood ve ark., 2006                                                  |
|                                     | Kapesitabin         |                                                                                           | Kobuchi ve ark., 2018                                                        |                                                                                           |
|                                     | Floksuridin         | Roemeling & Hrushesky, 1990; Zhang ve ark, 1993                                           | -                                                                            | Kemeny ve ark., 1994; Roemeling & Hrushesky, 1990                                         |
|                                     | Sitarabin           | Haus ve ark., 1972                                                                        | -                                                                            | Haus ve ark., 1972, Rose ve ark., 1978                                                    |
|                                     | Gemsitabin          | Li ve ark., 2005                                                                          | -                                                                            | Li ve ark., 2005                                                                          |
|                                     | L-alanozin          | Li ve ark., 2006                                                                          | -                                                                            | Li ve ark., 2006                                                                          |
| <b>Topoizomeraz-1 inhibitörleri</b> | İrinotekan          | Ahowesso ve ark., 2009; Filipski ve ark, 2004; Filipski ve ark., 2014; Ohdo ve ark., 1997 | Ahowesso ve ark., 2009; Ohdo ve ark., 1997                                   | Filipski ve ark., 2014; Granda ve ark., 2002                                              |
|                                     | Topotekan           | Mullins ve ark., 2005                                                                     | -                                                                            | -                                                                                         |
|                                     | 9-amino kamptotesin | Kirichenko ve ark., 1999                                                                  | -                                                                            | Kirichenko ve ark., 1999                                                                  |
| <b>Topoizomeraz-2 inhibitörleri</b> | Mitoksantron        | Levi ve ark., 1994                                                                        | Levi ve ark., 1994                                                           | -                                                                                         |
|                                     | Etopozid            | Levi ve ark., 1985                                                                        | -                                                                            | -                                                                                         |
| <b>Antrasiklinler</b>               | Daunorubisin        | Davies ve ark., 1974                                                                      | -                                                                            | -                                                                                         |
|                                     | Doksorubisin        | Granda ve ark., 2001; Levi ve ark., 1980; Sothorn ve ark., 1988; To ve ark., 2003         | To ve ark., 2003                                                             | Granda ve ark., 2001; Halberg ve ark., 1980; Scheving ve ark, 1980; Sothorn ve ark., 1989 |
|                                     | Epirubisin          | Mormont ve ark., 1988                                                                     | -                                                                            | -                                                                                         |

|                            |                              |                                                  |                                                   |                                                                                               |
|----------------------------|------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Mitoz inhibitörleri</b> | Vinkristin                   | Halberg ve ark., 1977                            | -                                                 | -                                                                                             |
|                            | Vinblastin                   | Mormont ve ark., 1986                            | -                                                 | -                                                                                             |
|                            | Vinorelbin                   | Filipski ve ark., 1999; Tampellini ve ark.,1995  | -                                                 | Filipski ve ark., 1999                                                                        |
|                            | Dosetaksel                   | Granda ve ark., 2001; Tampellini ve ark.,1998    | -                                                 | Granda ve ark., 2001; Tampellini ve ark.,1998                                                 |
| <b>Alkilleyiciler</b>      | Siklofosfamid                | Gorbacheva ve ark., 2005; Haus ve ark.,1974      | Gorbacheva ve ark., 2005                          | Badran ve ark., 1965; Cardoso ve ark., 1978; Rose ve ark., 1978; Scheving ve ark., 1977; 1980 |
|                            | İfosfamid                    | Snyder ve ark.,1981                              | -                                                 | -                                                                                             |
|                            | Melfalan                     | Halberg ve ark., 1980; Sothorn ve ark.,1977      | -                                                 | Halberg ve ark., 1980                                                                         |
|                            | Mitomisin-C                  | Klein ve ark., 1988                              | -                                                 | -                                                                                             |
|                            | Sisplatin                    | Boughattas ve ark.,1990; Hrushesky ve ark., 1982 | Boughattas ve ark.,1990; Levi ve ark., 1982a      | Levi ve ark., 1982b; Li ve ark., 2005; Sothorn ve ark., 1989                                  |
|                            | Karboplatin                  | Boughattas ve ark.,1988; 1990; Ron ve ark., 1998 | Boughattas ve ark.,1990                           | -                                                                                             |
|                            | Oksaliplatin                 | Boughattas ve ark., 1989                         | Boughattas ve ark.,1989; 1994; Levi ve ark., 2000 | Granda ve ark., 2002                                                                          |
|                            | Nedaplatin                   | Cui ve ark., 2004                                | Cui ve ark., 2004                                 | -                                                                                             |
| <b>Nitrozoüreler</b>       | Sistemustin                  | Martineau-Pivoteau ve ark.,1996                  | -                                                 | -                                                                                             |
| <b>Sitokinler</b>          | rHu-interferon $\alpha$      | Koren ve ark., 1993                              | -                                                 | Koren ve ark., 1993                                                                           |
|                            | rMu-interferon $\gamma$      | Koren ve ark., 1993                              | -                                                 | Koren ve ark., 1993                                                                           |
|                            | İnterferon $\beta$           | Takene ve ark., 2000                             | Takene ve ark., 2000                              | Takene ve ark., 2000                                                                          |
|                            | Tümör nekroz faktör $\alpha$ | Hrushesky ve ark., 1994                          | -                                                 | Hrushesky ve ark.,1987                                                                        |
|                            | İnterlökin-2                 | Levi ve ark.,1991                                | -                                                 | Kemeny ve ark., 1992                                                                          |
| <b>CDK1</b>                | Selisiklib                   | Iurisci ve ark., 2009                            | Iurisci ve ark., 2009                             | Iurisci ve ark., 2006                                                                         |
| <b>COX-2 İnhibitörleri</b> | Selekoksib                   | Blumenthal ve ark., 2001                         | -                                                 | Blumenthal ve ark., 2001                                                                      |

**Tablo 2-2: Son yıllarda antikanser ilaçlarla gerçekleştirilen bazı klinik kronoterapi çalışma örnekleri -Dallmann ve ark. (2016)'dan değiştirilerek.**

| İlaç                                                                                                                                                      | Hastalık ve hasta sayısı                                                  | Çalışma dizaynı                                           | Uygulama zamanları                                                    | Temel Bulgular                                                                                                                                                                                                                              | Referans                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| 5-FU-LV ve oksaliptatin (5-FU: 3000-3600 mg/m <sup>2</sup> , LV 1200 mg/m <sup>2</sup> , oksaliptatin 100 mg/m <sup>2</sup> , 2 haftada bir)              | Metastatik kolorektal kanser, 225 kadın ve 331 erkek hasta                | Uluslararası randomize Faz III çalışma                    | Kronomodüle uygulama (ChronoFLO4)/ konvansiyonel uygulama (FOLFOX2)   | Nötropeni (tüm evreler): ChronoFLO4 ile %33, FOLFOX2 ile %61<br>Evre 3-4 nötropeni: ChronoFLO4 ile %7, FOLFOX2 ile %25                                                                                                                      | (Innominato ve ark., 2011) |
| 5-FU-LV ve Oksaliptatin (5-FU: 3000-3600 mg/m <sup>2</sup> , LV 1200-1500 mg/m <sup>2</sup> , L-Oksaliptatin 100-125 mg/m <sup>2</sup> , 2-3 haftada bir) | Metastatik kolorektal kanser, 345 kadın ve 497 erkek                      | Üç uluslararası randomize Faz III çalışmanın meta analizi | ChronoFLO4/ konvansiyonel tedavi (FOLFOX2 ya da sabit hızda infüzyon) | Cinsiyete bağlı olarak kronoterapini etkinliğinde farklılık var<br>Medyan sağkalım kadınlarda ChronoFLO4 ile 16,6 ay, konvansiyonel tedaviyle 18,4 ay<br>Medyan sağkalım erkeklerde ChronoFLO4 ile 20,8 ay, konvansiyonel tedaviyle 17,5 ay | (Giacchetti ve ark., 2012) |
| Sisplatin (20mg/m <sup>2</sup> x 4 gün, dosetaksel ya da gemsitabinle kombine olarak)                                                                     | Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (ileri), 13 kadın ve 28 erkek hasta | Randomize Faz II çalışma                                  | 06:00/18:00                                                           | Evre 3-4 nötropeni: 18:00'da %12, 6:00'da %33<br>Evre 1-2 bulantı: 18:00 < 6:00<br>Total ve serbest sisplatin klirensi: 18:00 > 6:00                                                                                                        | (J. Li ve ark., 2015)      |
| Tamoksifen (20/40 mg)                                                                                                                                     | Meme kanseri, 27 kadın hasta                                              | Çapraz farmakokinetik çalışma                             | 08:00/13:00/20:00 (her bir dozaj zamanında 4 hafta)                   | Tamoksifen ve aktif metaboliti endoksifen için ortalama C <sub>maks</sub> ve AUC <sub>0-8sa</sub> 8:00 >> 20:00 (yaklaşık %20)<br>Ortalama t <sub>maks</sub> 8:00 < 20:00                                                                   | (Binkhorst ve ark., 2015)  |

|                                                                                                                           |                                                           |                                                                      |                                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                        |                            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|
| Kapesitabin (1650 mg/m <sup>2</sup> ), radyoterapiyle beraber 5 hafta boyunca haftada 5 gün                               | Lokal ileri rektal kanser (evre II ve III), 85 hasta      | Prospektif, tek merkezli, tek kollu, Faz II çalışma                  | Dozun %60'ı 8:00'da, %40'ı 12:00'da                                            | Konvansiyonel tedavini aksine hiçbir hastada evre IV toksiste görülmedi<br>Konvansiyonel tedavide kapesitabini en yaygın yan etkilerinden olan el-ayak sendromu kronomodüle tedavide %3,3 oranında                                                                     | (Akgun ve ark., 2014)      |
| Kapesitabin (2000 mg/m <sup>2</sup> , her 21 günde 1-14.günler arası, Oksaliptatin (130 mg/m <sup>2</sup> ) 3 haftada bir | Metastatik kolorektal kanser, 30 hasta                    | Prospektif, tek merkezli, tek kollu, Faz II çalışma                  | Dozun %50'si 8:00'da, %50'si 12:00'da                                          | Medyan progresyonsuz sağkalım 10 ay<br>Hiçbir hastada evre IV toksiste görülmedi<br>El-ayak sendromu %10 oranında                                                                                                                                                      | (Pilancı ve ark., 2016)    |
| Kapesitabin (21 gün aralıksız, 1000/1275/1600/2000/2550 mg/m <sup>2</sup> )                                               | Lokal ileri/metastatik kanser, 25 hasta                   | Faz I, açık etiket, doz arttırma çalışması                           | Dozun %37,5'u 09:00'da, %62,5'u 24:00'da                                       | Aralıksız kronomodüle kapesitabin tedavisi için MTD 750+1250 mg/m <sup>2</sup> /gün olarak belirlendi<br>21 gün aralıksız kronomodüle uygulama, konvansiyonel tedaviden (14 gün ilaç-1 hafta ara, 1250 mg/m <sup>2</sup> x2) %20 daha yüksek total dozda tolere edildi | (Roosendaal ve ark., 2020) |
| İrinotekan (180 mg/m <sup>2</sup> , sabit zamanlı ChronoFLO4 ile beraber)                                                 | Metastatik kolorektal kanser, 63 kadın ve 130 erkek hasta | Uluslararası, randomize, kontrollü, çok kollu, zaman bulma çalışması | 6-saatlik kronomodüle infüzyon, pik zamanları 1:00/5:00/9:00/13:00/17:00/21:00 | Kadınlarda 13:00/17:00'de pik yapan infüzyon daha iyi tolere edilirken,<br>Erkeklerde 09:00'da pik yapan infüzyon daha iyi tolere edildi                                                                                                                               | (Innominato ve ark., 2020) |

5-FU-LV: 5-fluorourasil, lökovorin, MTD: Maksimum tolere edilen doz, FOLFOX: 5-FU, folinik asit, oksaliptatin kombinasyonu, ChronoFLO4: 5-fluorourasil, lökovorin, ve oksaliptatin ile kronomodüle kemoterapi

Yapılan çalışmalarla antikanser ilaçlar dışında birçok farklı ilaç grubu için de optimal uygulama zamanları belirlenmiştir. Günlük tıp pratiğinde, glukokortikoidler için sabah saatlerinde uygulama önerilmektedir. Böylelikle adrenal supresyonun neden olabileceği yan etkilerin aza indirilebilmektedir (Ballesta ve ark., 2017).

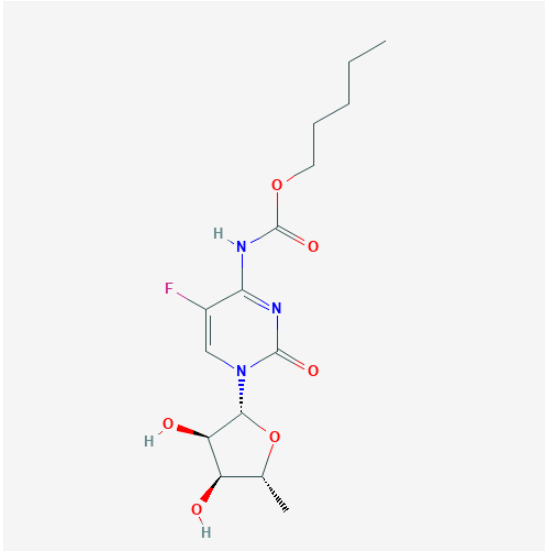
Bronşiyal astımda ve allerjik rinitte semptomlar genellikle gece boyunca kötüleşmekte ve sabah uyanıldığında yoğun semptom görülmektedir. Astım hastalarında, birçok teofilin müstahzarı için bronkodilatör etkiyi artırmak ve yan etkileri azaltmak amacıyla akşam saatlerinde uygulama önerilirken sürekli salım yapan (SR) teofilin müstahzarları sabah saatlerinde uygulandığında etkinlik ve güvenlik açısından daha iyi sonuçlar alınmaktadır. Antihistaminikler (H1 ve H2 reseptör antagonistleri) genelde akşam saatlerinde alındığında daha iyi tolere edilmekte ve daha etkili olmaktadır. Alerjik rinit hastalarında yapılan randomize çift kör bir çalışmanın sonuçlarına göre, antihistaminik bir ilaç olan mekizazin, 10 mg dozda oral yolla akşam saatlerinde alındığında sabah saatlerinde alınmasına göre semptomların ortadan kaldırılmasında daha etkili bulunmuştur (Levi & Schibler, 2007; Smolensky ve ark., 2007).

Non-steroidal antienflamatuvar ilaçlardan olan indometazin ve ketoprofen ile sağlıklı ya da hasta bireylerde yapılan çalışmaların sonuçlarına göre bahsedilen ilaçlar sabah alındıklarında absorpsiyon hızı,  $C_{maks}$  değeri ve eliminasyon hızı akşam alınmalarına göre daha yüksektir. Levi ve ark. (1985) tarafından osteoartrit hastalarında yapılan bir klinik çalışmada indometazin (75 mg/gün, SR) bir hafta saat 08:00'da, bir hafta 12:00'da ve bir hafta 20:00'da uygulanmıştır. 08:00'da ilaç alan grupta yan etkiler %33 oranında görülürken, 20:00'da uygulama yapılan grupta %7 oranında olmuştur. Boissier ve ark. (1990) tarafından ketoprofen (200 mg/gün, SR) ile yapılan randomize bir çalışmada 118 osteoartrit hastasına 08:00'de ya da 20:00'da ilaç verilmiştir. Yan etki görülme sıklığı 08:00'de ilaç verilen grupta %47 olurken 20:00'da ilaç verilen grupta %23 olmuştur. Ayrıca her iki çalışmada da akşam uygulama yapılan gruplarda daha iyi ağrı kontrolü sağlandığı tespit edilmiştir (Levi & Schibler, 2007).

## 2.4. Kapesitabin

### 2.4.1. Genel Özellikleri

Kapesitabin, oral yolla kullanılan fluoropirimidin türevi bir antikanser ilaçtır. Bir ön ilaç olan kapesitabin, üç basamaklı metabolik dönüşüm ile aktif metaboliti olan 5-fluorourasile dönüşür. Kapesitabinin kimyasal ismi 5'-deoksi-5-fluoro-N-[(pentiloksi) karbonil]-sitidin'dir ve molekül ağırlığı 359,35 g/mol'dür. Kapesitabinin açık kimyasal formülü Şekil-2.1'de gösterilmiştir. Kapesitabin, beyaz ya da beyazımsı kristal toz biçimindedir ve 20 °C'de sudaki çözünürlüğü 26 mg/mL'dir (FDA, 2015; Reigner ve ark., 2001).



Şekil 2-4: Kapesitabinin açık kimyasal formülü (Kim ve ark., 2018).

#### 2.4.1.1. Etki Mekanizması

Bir ön ilaç olan kapesitabin, karaciğerde karboksilesteraz enzimiyle 5-deoksi-5-fluorositidin (5'DFCR) metabolitine dönüşür. 5'DFCR sitidin deaminaz enzimi tarafından 5-deoksi-5-fluorouridin'e (5'DFUR) dönüştürülür. Son basamakta ise 5'DFUR, timidin fosforilaz (dThdPase) enzimi aracılığıyla aktif ilaç olan 5-FU'ya dönüşmektedir (Reigner ve ark., 2001; Walko & Lindley, 2005). Kapesitabinin metabolik dönüşümde rol oynayan dThdPase enzimi, sağlıklı dokulara oranla tümör dokusunda 3-10 kat daha fazla bulunmaktadır. Bu durum kapesitabinin aktif metaboliti olan 5-FU'ya tümör spesifik olarak dönüşmesini ve sistemik maruziyetin azalmasını sağlamaktadır (Dooley & Goa, 1999; Walko & Lindley, 2005).





Kolon kanseri ve kolorektal kanser: Erken evrede operasyon geçirmiş olan evre III ve lenf nodu metastazı bulunan kolon kanserli hastaların adjuvant tedavisinde oksaliplatinle kombinasyon şeklinde kullanılır. Metastatik kolorektal kanserde de endikedir.

Mide kanseri: Metastatik veya opere edilemeyen mide adenokanserinde sisplatinle kombine olarak endikedir (Üstünes, 2020).

#### **2.4.1.3. Kontrendikasyonları**

Kapesitabin tedavisi aşağıda belirtilen durumlarda kontrendikedir:

- Fluoropirimidin tedavisine karşı şiddetli beklenmeyen reaksiyon öyküsü olan hastalarda,
- Kapesitabine veya formülasyonda bulunan yardımcı maddelerden herhangi birine veya 5-FU'ya karşı aşırı duyarlılık gösteren hastalarda,
- DPD enzimi aktivitesinin olmadığı bilinen hastalarda,
- Hamilelik ve emzirme döneminde,
- Ciddi lökopeni, nötropeni ya da trombositopenisi olan hastalarda,
- Şiddetli karaciğer yetmezliği olan hastalarda,
- Şiddetli böbrek yetmezliği olan hastalarda (kreatinin klerensinin 30 ml/dk'nın altında olması durumunda),
- Brivudin ile yakın zamanlı veya eş zamanlı tedavinin söz konusu olması durumunda (ilaç-ilaç etkileşimi nedeniyle),
- Kombinasyon rejimindeki tıbbi ürünlerden herhangi birine ilişkin kontrendikasyon varsa, bu tıbbi ürün kullanılmamalıdır (EMA, 2019).

#### **2.4.1.4. Advers Etkiler**

Kapesitabin, genel olarak iyi tolere edilen bir antikanser ilaçtır. Advers etkilerin birçoğu öngörülebilir ve geçicidir. Meme kanseri ve kolorektal kanser tedavisinde kapesitabinin monoterapi olarak uygulandığı hastalarda advers etkilerin görülme sıklığı benzerdir. Sürekli kullanım durumunda, daha yüksek dozda aralıklı kullanıma oranla daha fazla advers etki görülmüştür. Faz II ve Faz III çalışmaların sonuçlarına göre en

sık karşılaşılan yan etkiler; diyare, bulantı, kusma, stomatit ve el-ayak sendromudur (Mckendrick & Coutsouvelis, 2005; Mikhail ve ark., 2010).

Kapesitabine bağlı gastrointestinal yan etkilerden olan diyare, genellikle tedavinin ilk ayında ortaya çıkmaktadır ve görülme sıklığı %55-57'dir. Bulantı %43-53 oranında görülürken, kusmanın görülme sıklığı %27-37'dir. Çalışmalarda, stomatit %24-25, abdominal ağrı %20-35, kabızlık %14-15, anoreksi %11 oranında görülmüştür (Mckendrick & Coutsouvelis, 2005).

El-ayak sendromu, yani palmar plantar eritrodisestezi, kutanöz (deriyle ilgili) bir reaksiyondur. Klinik çalışmalarda kapesitabin monoterapisine bağlı el-ayak sendromu görülme sıklığı %53-60 olurken, dosetaksel ile kombine kullanımda bu yan etki %63 oranında rapor edilmiştir. Görülen diğer dermatolojik yan etkiler; dermatit (%10), cilt kuruluğu (%7), alopesi (%5), pigmentasyon ve tırnak bozukluklarıdır (%6) (Mckendrick & Coutsouvelis, 2005; Üstünes, 2020; Walko & Lindley, 2005).

Kapesitabin tedavisine bağlı olarak çeşitli hematolojik yan etkiler görülebilmektedir. Bunlar; nötropeni (%20), trombositopeni (%20), anemi (%41) ve lenfopenidir (%58) (Mckendrick & Coutsouvelis, 2005).

Kapesitabin tedavisi alan hastalarda görülen nörolojik yan etkiler; yorgunluk (%24), baş ağrısı (%5), parestezi (%5), baş dönmesi (%5), tat alma bozuklukları (%4), uykusuzluk (%4) olarak rapor edilmiştir (Mckendrick & Coutsouvelis, 2005).

Kapesitabin tedavisine bağlı yaygın olarak görülen diğer advers etkiler, hiperbilirubinemi, karaciğer fonksiyon testlerinde bozukluklar, dehidratasyon, dispne, konjonktivit, artralji, miyalji, trombofilebit, depresyon ve enfeksiyona yatkınlık olarak sıralanabilir. Hastalarda, yaygın olmamakla beraber kardiyotoksisite de görülebilmektedir (EMA, 2019; Mckendrick & Coutsouvelis, 2005).

Kapesitabin kullanımının (günde 2 defa 1250 mg/m<sup>2</sup> dozda, 2 hafta ilaç uygulama-1 hafta ara) 5-FU/lökovorin (20 mg/m<sup>2</sup> lökovorin uygulamasını takiben 425 mg/m<sup>2</sup> i.v. bolus 5-FU, her 28 günde 1.-5.günlerde) kullanımıyla kıyaslandığı metastatik kolorektal kanser hastalarında yapılan faz-III randomize iki klinik çalışmanın sonuçlarına göre diyare, stomatit, nötropeni, bulantı ve alopesi 5-FU/lökovorin uygulanan grupta daha sık görülürken el-ayak sendromu ve hiperbilirubinemi

kapesitabin uygulanan grupta daha sık görülmüştür ( $p<0,05$ ) (Cutsem ve ark., 2001; Hoff ve ark., 2001; Mikhail ve ark., 2010).

## 2.4.2. Klinik Farmakokinetiği

### 2.4.2.1. Absorpsiyon

Kapesitabin oral yolla uygulandıktan sonra hızlı bir şekilde ve büyük ölçüde absorbe edilir ve metabolitlerine dönüşür (Reigner ve ark., 2001).

İnsanda, 14 gün boyunca tok karna  $1250 \text{ mg/m}^2$  dozda kapesitabin uygulanması sonucunda 14. günde elde edilen  $C_{\text{maks}}$  değerleri kapesitabin için  $4,67 \text{ } \mu\text{g/ml}$ , 5'DFCR için  $3,05 \text{ } \mu\text{g/ml}$ , 5'DFUR için  $12,1 \text{ } \mu\text{g/ml}$ , 5-FU için  $0,95 \text{ } \mu\text{g/ml}$  ve  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanin (FBAL) için  $5,46 \text{ } \mu\text{g/ml}$  olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada kapesitabin, 5'DFCR, 5'DFUR, 5-FU ve FBAL için  $\text{AUC}_{0-\infty}$  değerleri sırasıyla 7,75, 7,24, 24,6, 2,03, 36,3  $\mu\text{g.sa/ml}$  ve  $t_{\text{maks}}$  değerleri 1,5, 2, 2, 2, 3,34 saat olarak belirlenmiştir. Tek doz  $1250\text{-}1255 \text{ mg/m}^2$  kapesitabin uygulanması sonucunda, plazma  $\text{AUC}_{0-\infty}$  değerleri kapesitabin için, 5,5-7,3  $\mu\text{g.sa/ml}$ , 5-FU için ise 0,46-0,69  $\mu\text{g.sa/ml}$  olarak bulunmuştur. Terapotik dozlarda i.v. olarak uygulanan 5-FU ile kıyaslandığında oral kapesitabin uygulaması sonucu elde edilen plazma 5-FU konsantrasyonları daha düşüktür ve bu durumun kapesitabin kullanımında görülen düşük sistemik toksisiteyle ilişkili olduğu düşünülmektedir (EMA, 2019; Reigner ve ark., 2001).

Gıdalarla beraber kullanımda kapesitabinin absorpsiyon hızı azalmakla beraber bu durumun 5'DFCR ve 5-FU'ya ait AUC değerleri üzerine yalnızca minör bir etkisi vardır (EMA, 2019).

### 2.4.2.2. Dağılım

İnsan plazmasıyla yapılan in vitro çalışmaların sonucuna göre, kapesitabin %54 oranında, 5'DFCR %10, 5'DFUR %62 ve 5-FU %10 oranında başlıca albumin olmak üzere plazma proteinlerine bağlanmaktadır (EMA, 2019; Reigner ve ark., 2001).

Kapesitabinin metabolik aktivasyonundan sorumlu enzimlerin doku düzeylerindeki farklılık nedeniyle 5-FU'nun doku dağılımları farklılık göstermektedir. Kolorektal tümörü ve/veya karaciğer metastazı olan hastalarda yapılan bir çalışmada, hastalar cerrahi öncesi 5-7 gün boyunca günde 2 defa  $1255 \text{ mg/m}^2$  dozunda kapesitabin almıştır. Son kapesitabin dozunundan sonra 2-12 saat içinde çalışmadaki her hastadan tümör dokusu, tümör dokusunun yakınındaki sağlıklı doku ve kan örnekleri alınmıştır.

Kanda ve dokularda yapılan analizler sonucunda, kolorektal tümörde ortalama 5-FU konsantrasyonu yakınındaki sağlıklı kolorektal dokuya kıyasla 3,2 kat daha yüksek bulunmuştur. 5-FU konsantrasyonu, plazma ile kıyaslandığında kolorektal tümörde ortalama 21,4 kat daha yüksek, sağlıklı kolorektal dokuda ise ortalama 8,8 kat daha yüksek bulunmuştur. Karaciğer metastazında ve sağlıklı karaciğer dokusunda 5-FU konsantrasyonu plazmaya oranla 8-10 kat daha yüksektir. Karaciğer metastazı ve sağlıklı karaciğer dokusundaki 5-FU konsantrasyonları karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Reigner ve ark., 2001; Schüller ve ark., 2000).

#### **2.4.2.3. Metabolizma**

Kapesitabinin 5-FU'ya metabolize edilmesi üç basamakta gerçekleşmektedir. Kapesitabin öncelikle, başlıca karaciğerde olmak üzere karboksilesteraz enzimleriyle 5-DFCR'ye dönüşmektedir. Daha sonra 5'DFCR, karaciğer ve tümör dokusunda yaygın olarak bulunan sitidin deaminaz enzimiyle 5'DFUR'a dönüşür ve son basamakta birçok tümör dokusunda sağlıklı dokulara kıyasla daha yüksek miktarda eksprese edilen dThdPase enzimi aracılığıyla 5'DFUR'dan 5-FU oluşur. Bu üç basamaklı metabolik dönüşümün ağırlıklı olarak karaciğer ve tümör dokularında gerçekleşmesi, 5-FU'nun plazma ve sağlıklı dokularda birikmesini minimize etmektedir (Blesch ve ark., 2003; Miwa ve ark., 1998; Rustum ve ark., 1997). Yapılan çeşitli çalışmalarda, tümör dokularında sağlıklı dokuya kıyasla daha yüksek dThdPase ekspresyonu bulunan dokular; meme, mesane, mide, kolon-rektum, akciğer, yemek borusu ve rahim ağzıdır. Fakat karaciğer, ana safra kanalı ve tiroid kanserlerinde bu fark gösterilmemiştir (Bronckaers ve ark., 2009).

5-FU'nun metabolizmasında anabolik ve katabolik yolak olarak sınıflandırılan iki temel yolak vardır. 5-FU'nun %80-85'lik kısmı inaktif metabolitlere katabolize edilir. Katabolik yolak üç basamaklıdır ve detoksifikasyon ile eliminasyondan sorumludur. 5-FU'nun yalnızca %1-3'lük kısmı anabolik yolak ile sitotoksik aktivite gösteren metabolitlere dönüşmektedir (Miura ve ark., 2010; Saif ve ark., 2009; Walko & Lindley, 2005).

5-FU hücreye girdikten sonra anabolizması sonucunda birkaç aktif metabolite dönüşür. Bunlar; FUTP, FdUTP, FdUMP'dir ve kapesitabinin etkinliğinden sorumludur. Fosforibozil pirofosfatın kofaktör olduğu reaksiyonda 5-FU'dan orotat fosforibozil transferaz (OPRT) enzimiyle fluorouridin monofosfat (FUMP)

oluşmaktadır. İndirekt olarak ise 5-FU'dan riboz-1-fosfatın kofaktör olduğu reaksiyonda uridin fosforilaz (UrdPase) enzimiyle fluorouridin (FUR) oluşur ve daha sonra FUR uridin kinaz (UK) enzimiyle FUMP'yi oluşturur. FUMP'nin fosforile olması sonucu fluorouridin difosfat (FUDP), FUDP'nin fosforile olması sonucunda ise aktif metabolit olan FUTP oluşur. Diğer yolla ise FUDP, ribonükleotid redüktaz enzimiyle fluorodeoksiuridin difosfat'a (FdUDP) dönüşür. FdUDP fosforile veya defosforile olarak sırasıyla aktif metabolitler olan FdUTP ve FdUMP'yi oluşturur. 5-FU'nun aktivasyonundan sorumlu diğer yolla, 5-FU deoksiriboz-1-fosfatın kofaktör olduğu reaksiyonda dThdPase enzimiyle fluorodeoksiuridin'e (FUDR) dönüşür, daha sonra FUDR, TK enzimiyle fosforile olur ve aktif metabolit olan FdUMP oluşur (Longley ve ark., 2003; Miura ve ark., 2010).

Katabolik yolla, öncelikle 5-FU DPD enzimiyle dihidroksifluorourasil'e (FUH<sub>2</sub>) dönüşür. Daha sonra FUH<sub>2</sub> dihidropirimidinaz (DHP) enzimiyle 5-fluoro-üreido-propiyonik asid'e (FUPA) dönüştürülür. Son basamakta ise FUPA  $\beta$ -üreido-propiyonaz (BUP) enzimiyle FBAL'e dönüşür. FUH<sub>2</sub>, FUPA ve FBAL antiproliferatif aktiviteye sahip değildir. 5-FU'nun katabolizmasında DPD hız sınırlayıcı enzim olarak kabul edilmektedir ve insanda DPD eksikliği 5-FU toksisitesiyle yakından ilişkilidir. DPD, birçok tümör dokusunda ve sağlıklı dokuda bulunmakla beraber karaciğerde yüksek aktiviteye sahiptir. (Blesch ve ark., 2003; Dobritzsch ve ark., 2001; Reigner ve ark., 2001). Kapesitabinin metabolik yolları Şekil 2-2'de gösterilmiştir.

5'DFUR'nin 5-FU'ya dönüşmesini sağlayan dThdPase enzimi ve 5-FU'nun inaktive edilmesini sağlayan DPD enziminin tümördeki oranı kapesitabinin etkinliğiyle yakından ilişkilidir. Tümörde dThdPase enzimi aktivitesinin düşük olmasına bağlı olarak 5'DFUR'un 5-FU'ya dönüşümünün yetersiz olması, kapesitabinin etkinliğinin azalmasına sebep olabilecek bir direnç mekanizması olarak karşımıza çıkmaktadır. Diğer yandan, DPD enziminin aktivitesinin yüksek olması etkinliğin azalmasına sebep olabilmektedir (Ishikawa ve ark., 1998; Miura ve ark., 2010).

#### 2.4.2.4. Eliminasyon

İnsan plazmasında yapılan çalışmaların sonucuna göre, kapesitabinin eliminasyon yarı ömrü ( $t_{1/2}$ ) 0,85 saattir. 5'DFCR için  $t_{1/2}$  değeri 1,11 saat, 5'DFUR için 0,66 saat, 5-FU için 0,76 saat ve FBAL için 3,23 saattir (EMA, 2019).

Kapesitabin 1250-1255 mg/m<sup>2</sup> ve tek doz olarak uygulandıktan sonra, kapesitabin ve metabolitleri için idrardan ortalama total geri kazanım %71-87 aralığındadır. Dozun % 51-62'si FBAL, %7-11'i 5'DFUR, %6-7'si 5'DFCR, %1'den az bir kısmı ise 5-FU ve FUH<sub>2</sub> olarak geri kazanılmıştır. Judson ve ark. (1999) tarafından yapılan bir çalışmada ise <sup>14</sup>C ile işaretlenmiş kapesitabin verilen hastalara ait idrar ve feçes numunelerinde radyoaktivite değerlendirilerek kapesitabin ve metabolitlerine ilişkin total geri kazanım hesaplanmıştır. Kapesitabin ve metabolitlerine ilişkin total geri kazanım idrarda %95,5, feçeste ise %2,64 olarak bulunmuştur. Bu veriler kapesitabinin tama yakın oral absorpsiyonunu kanıtlar niteliktedir (Reigner ve ark., 1999, 2001; Twelves ve ark., 1999).

#### 2.4.3. Deney Hayvanlarındaki Farmakokinetiği

Onodera ve ark. (2000) tarafından yapılan bir çalışmada fare ve maymunda oral uygulanan kapesitabinin farmakokinetiği değerlendirilmiştir.

Kapesitabin erkek BALB/c nu/nu tümör taşıyan farelere 539 mg/kg (maksimum tolere edilen dozda) tek doz olarak uygulandıktan sonra 24. saate kadar kan örnekleri toplanmıştır. Farelerde, kapesitabin hızlı bir şekilde absorbe olup 5'DFCR, 5'DFUR ve 5-FU metabolitlerine dönüşmüştür. İlaç uygulandıktan sonra 30 dakika içinde kapesitabin ve metabolitleri t<sub>maks</sub> değerlerine ulaşmıştır. Kapesitabin ve 5-FU'nun t<sub>1/2</sub> değerleri yaklaşık olarak 1 saattir ve eliminasyonları hızlı gerçekleşmektedir. 5'DFCR ve 5'DFUR metabolitleri için ise t<sub>1/2</sub> değerleri sırasıyla 2,9 saat ve 4,5 saattir. AUC<sub>0-∞</sub> değerleri kapesitabin için 99,7 µg.sa/ml, 5'DFCR için 110 µg.sa/ml, 5'DFUR için 28,1 µg.sa/ml ve 5-FU için 0,313 µg.sa/ml olarak bulunmuştur (Onodera ve ark., 2000).

Çalışmada her iki cinsiyette BDF1 farelere 198, 395 ve 791 mg/kg dozlarında kapesitabin uygulanmış ve 1. ve 36. günlerde ilaç uygulamasından sonra 6.saate kadar kan örnekleri toplanmıştır. Uygulanan dozlarda, 5'DFCR ve 5'DFUR'a ait AUC değerleri dozla orantılı bulunurken, kapesitabinin AUC değerindeki artış en yüksek dozda orantısız değerden daha yüksek olmuştur. 395 mg/kg dozundaki uygulama sonucunda 1.günde elde edilen AUC<sub>0-6sa</sub> değeri erkek ve dişi farelerde sırasıyla kapesitabin için 12,6-19,7 µg/ml , 5'DFCR için 84,6-102 µg/ml ve 5'DFUR için 21,4-30 µg/ml olarak bulunmuştur. Tekrarlı uygulamadan sonra 36.günde elde edilen AUC<sub>0-6sa</sub> değeri erkek ve dişi farelerde sırasıyla kapesitabin için 8,49-8,96 µg/ml, 5'DFCR için

62,3-68,8  $\mu\text{g/ml}$  ve 5'DFUR için 16,6-20,4  $\mu\text{g/ml}$  olarak bulunmuştur (Onodera ve ark., 2000).

Yine aynı çalışmada dişi ve erkek sinomolgus maymunlarında tek doz 27, 54 ve 108 mg/kg dozlarında kapesitabin uygulandıktan sonra 48.saaate kadar kan örnekleri toplanmıştır. Kapesitabin, 5'DFCR, 5'DFUR ve 5-FU plazma konsantrasyonları ilaç uygulandıktan sonra 2 saat içinde  $C_{\text{maks}}$  değerlerine ulaşmış ve daha sonra hızlıca azalmıştır. Kapesitabin ve metabolitleri için,  $t_{1/2}$  değerleri 1 saatten daha kısadır. Maymunlarda, genel olarak tüm cinsiyet ve doz grupları değerlendirildiğinde kapesitabin ve 5'DFUR'a ait  $\text{AUC}_{0-48\text{sa}}$  değerleri birbirine yakın ve 5'DFCR'nin  $\text{AUC}_{0-48\text{sa}}$  değerinden 4-8 kat yüksek bulunmuştur. 5-FU'nun  $\text{AUC}_{0-48\text{sa}}$  değeri ise 5'DFUR'dan yaklaşık 10 kat düşük bulunmuştur (Onodera ve ark., 2000).

Sakai ve ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, Wistar soyu erkek sıçanlara 14 gün boyunca günde bir kez 180 mg/kg dozda kapesitabin uygulanmış ve 1., 7. ve 14. günlerde kapesitabin, 5'DFCR, 5'DFUR ve 5-FU konsantrasyonları tayin edilmiştir. Tek doz uygulamadan sonra elde edilen ortalama  $t_{\text{maks}}$  değerleri kapesitabin için 0,5 saat, 5'DFCR için 0,9 saat, 5'DFUR için 1,5 saat ve 5-FU için 0,6 saat olmuştur. Tek dozdan sonra ortalama  $\text{AUC}_{0-\infty}$  değerleri kapesitabin için 19,3  $\mu\text{mol.sa/L}$ , 5'DFCR için 1180,1  $\mu\text{mol.sa/L}$ , 5'DFUR için 33,9  $\mu\text{mol.sa/L}$ , 5-FU için 664,7  $\mu\text{mol.sa/L}$  olarak bulunmuştur. 14 gün tekrarlı kapesitabin uygulanmasından sonra ise ortalama  $\text{AUC}_{0-\infty}$  değerleri, kapesitabin için 4,4  $\mu\text{mol.sa/L}$ , 5'DFCR için 692,2  $\mu\text{mol.sa/L}$ , 5'DFUR için 33,2  $\mu\text{mol.sa/L}$ , 5-FU için 453,2  $\mu\text{mol.sa/L}$  olarak bulunmuştur (Sakai ve ark., 2020).

Kapesitabin farmakokinetiğinde insana benzer özellik göstermeleri nedeniyle maymunlar ve fareler çalışılmaya uygun türler olarak değerlendirilmektedir. Sıçanlarda, sitidin deaminaz düzeylerinin düşük olmasına bağlı olarak plazma 5'DFUR seviyeleri çok düşüktür. Köpeklerde ise plazmada 5'DFUR bulunmamaktadır. (Shindoh ve ark., 2006).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kimyasallar ve Laboratuvar Malzemeleri

Kapesitabin (Koçak Farma, Türkiye tarafından projemizde kullanılmak üzere hediye edilmiştir.)

5'-DFCR (TCI Chemicals, Japonya)

5'-DFUR (TCI Chemicals, Japonya)

5-FU (BioChemPartner, Çin)

Yüksek basınçlı likit kromatografi cihazı (HPLC) grade metanol (Merck, Almanya)

Disodyum hidrojen fosfat (Merck, Almanya)

Orto-fosforik asit (Merck, Almanya)

Çinko sülfat heptahidrat (Merck, Almanya)

HPLC grade distile su, rezistans: 18,2 MΩ.cm (Elga Purelab OptionQ, ABD)

İzotonik sodyum klorür (%0,9 NaCl) çözeltisi (Eczacıbaşı Baxter, Türkiye)

Propilen glikol (Tekkim, Türkiye)

Sevofluran (Sevorane likid %100 inhalasyon çözeltisi, 250 ml şişe, Abbvie, Türkiye)

EDTA'lı kan tüpleri (BD Microtainer, Türkiye)

Kapaklı polipropilen mikrotüpler ve santrifüj tüpleri, pipet uçları, insülin enjektörleri (İsolab, Türkiye).

RevertAid first strand cDNA sentez kiti (Thermo Scientific, ABD)

RNeasy RNA izolasyon kiti (Qiagen, ABD)

Proteaz inhibitör kokteyli (Thermo Scientific, ABD)

Immobilon-P PVDF transfer membranı (Millipore, ABD)

Yağsız süt tozu (PanReac AppliChem, Almanya)

Anti-CDA antikor (Sigma Aldrich, Almanya)

Anti-CES1 antikor (Abcam, İngiltere)

Anti CES2 antikor (R&D Systems, ABD)

Anti-uridin fosforilaz 1 (UPP1) antikor (Abcam, İngiltere)

Anti-uridin fosforilaz 2 (UPP2) antikor (Fisher Scientific, ABD)

Anti-DPD antikor (Abcam, İngiltere)

Anti-mouse m-IgGκ BP-HRP konjuge antikor (Santa Cruz, ABD)

Anti-rabbit IgG HRP konjuge antikor (Cell Signaling, ABD)

Anti-goat IgG HRP konjuge antikor (R&D Systems, ABD)

### 3.1.2. Cihazlar ve Aletler

HPLC cihazı, 2695 ayırma modülü (Waters, ABD)

LC-HRMS Thermo Orbitrap Q-Exactive (Thermo Fisher, ABD)

Çift dalga boyunda çalışan UV/VIS dedektör (Waters, ABD)

Gemini HPLC kolonu, C18, 5 µm, 150×4.6 mm (Phenomenex, ABD)

InertSustain HPLC kolonu, C18, 150×4.6 mm (GL Sciences, Japonya)

Ön kolon kartuşu tutucu (Phenomenex, ABD)

Ön kolon kartuşu, C18, 4x3 mm (Phenomenex, ABD)

Vakum manifoldu (KNF, Almanya)

Oasis HLB ekstraksiyon kartuşu, 1cc/30 mg (Waters, ABD)

Otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya)

Ultrasonik banyo (Elma, Almanya)

Mekanik doku homojenizatörü (Art-Miccra-D1, Almanya)

Vortex karıştırıcı (IKA, Almanya)

Paslanmaz çelik fare gavajı (Fine Science Tools, ABD)

Cerrahi makaslar ve pensler (Bahadır Medikal, Türkiye)

CFX Connect Real-Time Detection System (Bio-Rad, ABD)

T100 Thermal Cyclers cihazı (Bio-Rad, ABD)

Geldoc jel görüntüleme cihazı (Biorad, ABD)

Agaroz jel elektroforez modülü (Bio-Rad, ABD)

İmmunoblot elektroforez sistemi (Bio-Rad, ABD)

ChemiDoc Touch kemilüminesan görüntüleme sistemi (Bio-Rad, ABD)

Microplate Reader- Mikroplaka Okuyucu (Biotek Synergy, ABD)

Mikropipetler (Eppendorf, Almanya)

Buz makinası (Scotsman, ABD)

Soğutmalı santrifüj (Sigma Aldrich, Almanya)

Santrifüj Z326K (Hermle, Almanya)

Elektronik Hassas Terazı (Sartorius, Almanya)

Buzdolabı, +4 °C (Arçelik, Türkiye)

Derin Dondurucular -20 (Arçelik, Türkiye) ve -80 °C (Esco, Singapur)

### 3.1.3. Bilgisayar Yazılımları

Empower Chromatography Data Software (Waters, ABD)

Prism 5.00 (GraphPad Software, ABD)

Image Lab (Bio-Rad, ABD)

IBM SPSS Statistics 22 (IBM, ABD)

### 3.2. Deney Hayvanları ve Senkronizasyon

Deneylerde, 14-16 haftalık C57BL/6J soyu erkek fareler kullanılmıştır. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (Aziz Sancar DETAE) Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı'ndan temin edilen fareler, deney süresince İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanı Bakım ve Barındırma Ünitesinde (EDEHAB), 4 tanesi bir arada olmak üzere uygun büyüklükteki polikarbonat kafeslerde barındırılmıştır. Deney ve bakım odalarında, standart sıcaklık ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) ve nem koşulları ( $55\pm 2\%$ ) sağlanmıştır. Deney hayvanları *ad libitum* olarak beslenmiş su almaları deneyler boyunca serbest bırakılmıştır. Aydınlatma düzeni, 12 saat aydınlık- 12 saat

karanlık olacak biçimdedir ve aydınlatmada kullanılan ışık şiddeti kafesin konumuna göre 100-150 lüktür.

Çalışmada farklı fare gruplarına dört farklı sirkadiyan zamanda ilaç uygulaması yapılmıştır. Deney grupları ve her bir grupta kullanılan fare sayıları Tablo 3-1’de verilmiştir. ZT ifadesi Zeitgeber Time’in kısaltmasıdır ve zaman/ritim verici anlamındadır. Işık en önemli ritim vericidir ve farelerin ışıkla senkronizasyonları gerçekleştirilmektedir. ZT1 ifadesi ışık açıldıktan 1 saat sonrayı ifade eder. ZT7, ışık açıldıktan 7 saat sonra; ZT13, ışık açıldıktan 13 saat sonra; ZT19 ise ışık açıldıktan 19 saat sonra anlamına gelir. Farelerin ilaç uygulama zamanına göre senkronize edilmesi belirlenen ışık düzenlerinde 3 hafta sürede gerçekleştirilmiştir. ZT1 ve ZT7 grubundaki fareler 07:00-19:00 saatlerinde aydınlık, 19:00-07:00 saatlerinde karanlık düzeninde tutulurken; ZT13 ve ZT19 grupları 19:00-07:00 saatlerinde aydınlıkta, 07:00-19:00 saatlerinde karanlıkta kalacak şekilde bir ışık düzeninde tutulmuştur. Farelerin ışığa senkronizasyonunu teyit etmek amacıyla, sirkadiyan saat proteinlerinden olan BMAL1 ve CRY1 düzeyleri ve *Bmal1* mRNA ekspresyonlarındaki zamana bağlı değişiklikler değerlendirilmiştir.

**Tablo 3-1: Deney grupları ve kullanılan fare sayıları.**

| İlaç uygulama zamanları                  | Numune toplama zamanları |           |          |        |        |        |        |
|------------------------------------------|--------------------------|-----------|----------|--------|--------|--------|--------|
|                                          | 0.saat                   | 0,25.saat | 0,5.saat | 1.saat | 2.saat | 4.saat | 6.saat |
| <b>ZT1</b>                               | 5 fare*                  | 5 fare    | 5 fare   | 5 fare | 5 fare | 5 fare | 5 fare |
| <b>ZT7</b>                               | 5 fare*                  | 5 fare    | 5 fare   | 5 fare | 5 fare | 5 fare | 5 fare |
| <b>ZT13</b>                              | 5 fare*                  | 5 fare    | 5 fare   | 5 fare | 5 fare | 5 fare | 5 fare |
| <b>ZT19</b>                              | 5 fare*                  | 5 fare    | 5 fare   | 5 fare | 5 fare | 5 fare | 5 fare |
| <b>ZT1’ (başlangıçtan 24 saat sonra)</b> | 5 fare*                  | -         | -        | -      | -      | -      | -      |
| <b>Toplam fare sayısı</b>                | 145                      |           |          |        |        |        |        |

\*İşaretli grupların karaciğer örnekleri moleküler analizlerde kullanılmıştır.

### 3.3. Kronofarmakokinetik Çalışma

#### 3.3.1. İlaç Uygulama ve Numune Toplama

Farelere uygulanacak olan kapesitabin, propilen glikol:distile su (25:75) içinde çözülerek formüle edilmiştir. Her grup için belirlenen sirkadiyan saatte tek seferde 500 mg/kg dozda kapesitabin oral gavaj ile uygulanmıştır. Kapesitabin uygulanmasını

takiben 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 ve 6. saatlerde sevofluran anestezisi altında farelerin göğüs kafesleri açılmış ve kalpten 0,7-0,8 ml kan alınarak fareler sakrifiye edilmiştir. K2 EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri 4000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve enzimatik dönüşümü durdurmak amacıyla her bir örneğe 1/50 oranında 1 N NaOH çözeltisi eklenmiştir (Onodera ve ark., 2000). Elde edilen plazmalar farmakokinetik analizler yapılncaya kadar -80 °C derin dondurucuda saklanmıştır. Farelerden karaciğer dokuları çıkarılmış ve hemen sıvı azotla dondurulmuştur. Farmakokinetik ve moleküler analizler yapılana kadar tüm dokular -80 °C soğutucu dolapta saklanmıştır.

### 3.3.2. Kapesitabinin Analitik Tayin Metodu

Plazma ve karaciğer örneklerinde kapesitabin düzeylerinin tayininde Farkouh ve ark.'a (2010) ait olan HPLC metodu bazı minör değişiklikler yapılarak kullanılmıştır. Kapesitabin tayininde kullanılan metoda ait kromatografik koşullar Tablo 3-2'de gösterilmiştir.

**Tablo 3-2: Kapesitabin miktar tayininde kullanılan HPLC metoduna ait kromatografik koşullar.**

| Parametre/Alet               | Kromatografik Koşullar              |
|------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Analitik kolon</b>        | C18 kolon, 150×4,6 mm, 5 µm         |
| <b>Mobil faz</b>             | Metanol: HPLC grade su (50:50, v:v) |
| <b>Akış hızı</b>             | 0,6 ml/dak                          |
| <b>Kolon sıcaklığı</b>       | 40 °C                               |
| <b>Enjeksiyon hacmi</b>      | 30 µl                               |
| <b>Dedektör dalga boyu</b>   | 305 nm                              |
| <b>Örnekleyici sıcaklığı</b> | 4 °C                                |
| <b>Retansiyon zamanı</b>     | 13,5 dakika                         |
| <b>Ortalama basınç</b>       | 1000 psi                            |

#### 3.3.2.1. Mobil Fazın Hazırlanması

Mobil fazı hazırlamak amacıyla, 500 ml HPLC grade metanol ve 500 ml Ultra saf su mezür ile ölçüldükten sonra 1 L hacmindeki bir şişede karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışım ultrasonik banyoda 40 dakika süreyle ultrasonik banyoda degaze edilmiştir.

### 3.3.2.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Standart çözeltileri hazırlamak amacıyla öncelikle kapesitabinin 1 mg/ml konsantrasyonunda ana stok çözeltisi hazırlanmış ve tüm diğer seyreltmeler ana stok çözeltisi kullanılarak yapılmıştır. Ana stoğun ve standart çözeltilerin hazırlanmasında çözücü olarak metanol:distile su (50:50, v:v) kullanılmış ve bu çözeltiler +4 °C’de buzdolabında saklanmıştır.

Plazma standartları hazırlanırken 0,2, 0,5, 1, 2, 5 ve 10 µg/ml son konsantrasyonları elde etmek amacıyla, her bir standart için 90 µl boş fare plazmasına 10 µl sırasıyla 2, 5, 10, 20, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında kapesitabin çözeltileri ilave edilmiştir.

Karaciğer standartları hazırlanırken 0,5, 1, 2, 5 ve 10 µg/ml son konsantrasyonları elde etmek amacıyla, her bir standart için 180 µl boş fare karaciğer homojenatına 20 µl hacimde sırasıyla 5, 10, 20, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında kapesitabin çözeltileri ilave edilmiştir.

### 3.3.2.3. Ekstraksiyon

Kapesitabinin plazmadan ekstraksiyonunda, Oasis HLB katı faz ekstraksiyon kartuşları kullanılmıştır. Ekstraksiyon kartuşları önce 1 ml metanol ile şartlandırılmış, sonra kartuştan 1 ml distile su geçirilmiştir. Daha sonra 100 µl plazma örneği kartuştan geçirilmiş ve bunu takiben ekstraksiyon kartuşu 250 µl distile su:metanol (95:5 v:v) ile yıkanmıştır. Son olarak kartuştan 200 µl metanol geçirilerek kapesitabin elüe edilmiştir.

Karaciğer örneklerinde kirliliklerin daha fazla olması nedeniyle kapesitabinin karaciğerden ekstraksiyonunda sıvı-sıvı ekstraksiyon ve katı faz ekstraksiyon bir arada kullanılmıştır. İlk olarak karaciğer dokularına ağırlıklarına göre 1:1 oranında izotonik sodyum klorür çözeltisi eklenerek mekanik homojenizatörle buz üzerinde homojenizasyon yapılmıştır. 200 µl karaciğer homojenatına 600 µl 0,25 M çinko sülfat çözeltisi (distile suda hazırlanmış) eklenmiş, 90 saniye vortekslelendikten sonra 4000 rpm’de 10 dakika süreyle santrifüj edilip üst faz ayrılmıştır. Kapesitabinin bulunduğu üst faz ile Oasis HLB ekstraksiyon kartuşlarına geçilmiş ve kartuştan ekstraksiyon için plazma kısmında belirtilen protokol uygulanmıştır.

### 3.3.2.4. Metot Validasyonu

Farkouh ve ark. (2010) tarafından yayınlanan ve insan plazmasında kullanılan analitik metodun fare plazmasında ve karaciğerinde validasyonu gerçekleştirilmiştir. Kapesitabine ait standart çözeltiler ve fare plazma ve karaciğer standartları kullanılarak gerçekleştirilen validasyon çalışmaları kapsamında doğrusallık, doğruluk, kesinlik, seçicilik, tayin sınırı, geri kazanım ve stabilite parametreleri değerlendirilmiştir.

Doğrusallık, 0,2-10 µg/ml konsantrasyon aralığında plazma veya karaciğer standartları kullanılarak değerlendirilmiştir. Belirlenen konsantrasyonlarda standartlar altışar defa analiz edilmiştir. Regresyon denklemi, denkleme ait  $r^2$  değeri ve bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

Doğruluk ve kesinlik, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliğin test edilmesiyle değerlendirilmiştir. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması yapılırken üç farklı günde, gün içi tekrarlanabilirlik çalışması yapılırken ise aynı gün üç farklı zamanda 0,2, 0,5, 1, 2, 5 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında plazma ve karaciğer standartları hazırlanmış ve sisteme enjeksiyon yapılmıştır. Pik alanlarının ortalamaları ile değişim katsayıları hesaplanmıştır.

Seçicilik değerlendirilirken, kapesitabin içermeyen boş plazma veya karaciğer örnekleri ilgili ekstraksiyon metodları kullanılarak çalışılmış ve enjeksiyon yapılmıştır. Sonuçta boş plazma ve karaciğer örneklerinde kapesitabine ait pikin bulunduğu zamanda pik olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Tayin sınırının (LOD) hesaplanmasında  $3.3 \times \sigma/S$  denklemi, kantifikasyon sınırının (LOQ) hesaplanmasında ise  $10 \times \sigma/S$  denklemi kullanılmıştır.  $\sigma$  değeri yanıtın standart sapmasını ifade ederken, S değeri kalibrasyon eğrisinin eğimini gösterir (D. Ozturk, 2019).

Geri kazanımın hesaplanması amacıyla, farklı zamanlarda çalışılan üç farklı konsantrasyondaki örneğin standart eğriden % kaç oranında doğru olarak elde edilebildiği değerlendirilmiştir. Plazma ve karaciğer standartlarıyla 0,5, 2 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında geri kazanım değerlendirilmiştir.

### 3.3.3. 5'DFCR ve 5'DFUR Metabolitlerinin Analitik Tayin Metodu

Plazma ve karaciğer örneklerinde 5'DFCR ve 5'DFUR düzeylerinin tayininde Farkouh ve ark.'a (2014) ait olan HPLC metodu değiştirilerek kullanılmıştır. 5'DFCR

ve 5'DFCR tayininde kullanılan metoda ait kromatografik koşullar Tablo 3-3'de gösterilmiştir.

**Tablo 3-3: 5'DFCR ve 5'DFUR miktar tayininde kullanılan HPLC metoduna ait kromatografik koşullar.**

| Parametre/Alet               | Kromatografik Koşullar                                                      |                    |     |     |
|------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------|-----|-----|
| <b>Analitik kolon</b>        | C18 kolon, 150×4,6 mm, 5 µm                                                 |                    |     |     |
| <b>Mobil faz</b>             | Mobil faz A: %10 metanol: %90 5 mM disodyum hidrojen fosfat tamponu (pH: 8) |                    |     |     |
|                              | Mobil faz B: %90 metanol: %10 5 mM disodyum hidrojen fosfat tamponu (pH: 8) |                    |     |     |
| <b>Gradient akış düzeni</b>  | Zaman (dakika)                                                              | Akış hızı (ml/dak) | %A  | %B  |
|                              | 0                                                                           | 0,6                | 100 | 0   |
|                              | 12                                                                          | 0,6                | 100 | 0   |
|                              | 20                                                                          | 0,8                | 0   | 100 |
|                              | 30                                                                          | 0,8                | 0   | 100 |
|                              | 32                                                                          | 0,6                | 100 | 0   |
| <b>Kolon sıcaklığı</b>       | 34 °C                                                                       |                    |     |     |
| <b>Enjeksiyon hacmi</b>      | 30 µl                                                                       |                    |     |     |
| <b>Dedektör dalga boyu</b>   | 254 nm                                                                      |                    |     |     |
| <b>Örnekleyici sıcaklığı</b> | 4 °C                                                                        |                    |     |     |
| <b>Retansiyon zamanı</b>     | 5'DFCR için 6,5 dakika; 5'DFUR için 9,9 dakika                              |                    |     |     |
| <b>Ortalama basınç</b>       | 1200 psi                                                                    |                    |     |     |

### 3.3.3.1. Mobil Fazın Hazırlanması

5'DFCR ve 5'DFUR düzeylerinin tayininde gradient akış düzeniyle çalışılan iki farklı mobil faz (mobil faz A ve mobil faz B) kullanılmıştır. Öncelikle 1 L distile su kullanılarak 5 mM konsantrasyonda disodyum hidrojen fosfat tamponu hazırlanmış ve o-fosforik asit ile pH 8'e ayarlanmıştır. Daha sonra, mobil faz A'yı hazırlamak için 1 L hacmindeki bir şişeye disodyum hidrojen fosfat tamponundan 900 ml alınmış ve üzerine 100 ml metanol ilave edilmiştir. Mobil faz B'yi hazırlamak için ise disodyum hidrojen fosfat tamponundan 100 ml alınmış ve üzerine 900 ml metanol ilave edilmiştir. Hazırlanan mobil fazlar iyice karıştırıldıktan sonra ultrasonik banyoda 40 dakika süreyle degaze edilmiştir.

### 3.3.3.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Standart çözeltilerini hazırlarken kullanmak için 1 mg/ml 5'DFCR ve 5'DFUR stok çözeltileri hazırlanmıştır. Sırasıyla 10, 20, 30, 50 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarında 5'DFCR ve 1, 2, 5, 10 ve 20 µg/ml konsantrasyonlarında 5'DFUR içeren 5 adet plazma standardını hazırlanmak amacıyla 90 µl boş fare plazmasına 10 µl 5'DFCR ve 5'DFUR çözeltileri ilave edilmiştir.

### 3.3.3.3. Ekstraksiyon

5'DFCR ve 5'DFUR, plazma ve karaciğer örneklerinin ekstraksiyonunda sıvı-sıvı ekstraksiyon ve katı faz ekstraksiyon bir arada kullanılmıştır. Karaciğer dokuları için, ağırlıklarına göre 1:1 oranında izotonik sodyum klorür çözeltisi eklenerek mekanik homojenizatörle buz üzerinde homojenizasyon yapılmıştır. 100 µl plazma örneği veya karaciğer homojenatına, 200 µl 0,25 M çinko sülfat çözeltisi (distile suda hazırlanmış) eklenmiş, 30 saniye vortekslendikten sonra 4000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilip üst faz ayrılmıştır. 5'DFCR ve 5'DFUR içeren üst faz ile Oasis HLB ekstraksiyon kartuşlarına geçilmiştir. Ekstraksiyon kartuşları önce 1 ml metanol ile şartlandırılmış, sonra kartuştan 1 ml distile su geçirilmiştir. Daha sonra 5'DFCR ve 5'DFUR içeren üst faz kartuştan geçirilmiş ve bunu takiben ekstraksiyon kartuşu 250 µl distile su:metanol (95:5 v:v) ile yıkanmıştır. Son olarak kartuştan 200 µl metanol:su (50:50, v:v) geçirilerek 5'DFCR ve 5'DFUR elüe edilmiştir.

### 3.3.3.4. Metot Validasyonu

Plazma ve karaciğerde, 5'DFCR ve 5'DFUR metabolitlerinin analitik tayin metodunun validasyonunda, standart çözeltiler, fare plazma ve karaciğer standartları kullanılmıştır. Doğrusallık, doğruluk, kesinlik, seçicilik, tayin sınırı, geri kazanım ve stabilite parametreleri kapesitabin için belirtilen biçimde değerlendirilmiştir.

### 3.3.4. 5-FU Metabolitinin Analitik Tayin Metodu

Plazma ve karaciğer örneklerinde 5-FU düzeylerinin tayininde Gülçin ve ark.'a (2010) ait olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) metodu değiştirilerek kullanılmıştır. 5-FU tayininde kullanılan metoda ait kromatografik koşullar Tablo 3-4'te gösterilmiştir.

**Tablo 3-4: 5-FU miktar tayininde kullanılan LC-MS metoduna ait kromatografik koşullar.**

| <b>HPLC Koşulları</b>                    |                                                  |                    |    |     |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------|----|-----|
| <b>Analitik kolon</b>                    | Troyasil C18 HS, 150 x 3 mm, 5 µm                |                    |    |     |
| <b>Mobil faz</b>                         | Mobil faz A: %1 Formik asit içeren HPLC grade su |                    |    |     |
|                                          | Mobil faz B: %1 Formik asit içeren metanol       |                    |    |     |
| <b>Gradient akış düzeni</b>              | Zaman (dakika)                                   | Akış hızı (ml/dak) | %A | %B  |
|                                          | 0                                                | 0,35               | 50 | 50  |
|                                          | 1                                                | 0,35               | 50 | 50  |
|                                          | 3                                                | 0,35               | 0  | 100 |
|                                          | 6                                                | 0,35               | 0  | 100 |
|                                          | 7                                                | 0,35               | 50 | 50  |
|                                          | 15                                               | 0,35               | 50 | 50  |
| <b>MS Koşulları</b>                      |                                                  |                    |    |     |
| <b>Sistem</b>                            | Thermo Orbitrap Q-Exactive                       |                    |    |     |
| <b>İyon kaynağı</b>                      | Elektro Sprey İyonizasyon (ESI)                  |                    |    |     |
| <b>Kütle tarama aralığı</b>              | 100-900 <i>m/z</i>                               |                    |    |     |
| <b>Sheath gazı akış hızı</b>             | 45                                               |                    |    |     |
| <b>Auxiliary (Aux) gazı akış hızı</b>    | 10                                               |                    |    |     |
| <b>Sprey voltajı</b>                     | 3,80 kV                                          |                    |    |     |
| <b>Kapiler sıcaklık</b>                  | 320 °C                                           |                    |    |     |
| <b>Aux gaz ısıtıcı sıcaklığı</b>         | 320 °C                                           |                    |    |     |
| <b>S-lens radyofrekans (RF) seviyesi</b> | 50,0                                             |                    |    |     |

#### 3.3.4.1. Mobil Fazın Hazırlanması

Mobil fazları hazırlamak amacıyla, 1 L HPLC grade metanol ve 1 L ultra saf su mezür ile ölçüldükten sonra her birine hacimce %1 formik asit eklenmiş ve karıştırılmıştır.

#### 3.3.4.2. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Standart çözeltilerini hazırlamak amacıyla öncelikle 1 mg/ml konsantrasyonda 5-FU stok çözeltisi hazırlanmıştır. Ana stoğun ve standart çözeltilerin hazırlanmasında çözücü olarak metanol kullanılmıştır. Plazma standartları hazırlanırken 1, 10, 100, 200, 400, 500 ve 750 ng/ml son konsantrasyonları elde etmek amacıyla, her bir standart için

80 µl boş fare plazmasına 20 µl sırasıyla 5, 50, 500, 1000, 2000, 25000 ve 3750 ng/ml konsantrasyonlarında 5-FU çözeltileri ilave edilmiştir.

Karaciğer standartları hazırlanırken 5, 10, 100, 200, 750, 1000, 2000 ve 5000 ng/ml son konsantrasyonları elde etmek amacıyla, her bir standart için 80 µl boş fare karaciğer homojenatına 20 µl hacimde sırasıyla 0,025, 0,05, 0,5, 1, 3,75, 5, 10 ve 25 µg/ml konsantrasyonlarında 5-FU çözeltileri ilave edilmiştir.

### 3.3.4.3. Ekstraksiyon

5-FU'nun plazma ve karaciğer örneklerinin ekstraksiyonunda Shiokawa ve ark. (2019) tarafından çalışılan sıvı-sıvı ekstraksiyon metodu kullanılmıştır. 100'er µl plazma örneğine ve karaciğer homojenatına, 80 µl 2 M amonyum asetat çözeltisi (distile suda hazırlanmış) eklenerek 30 saniye vortekslenmiştir. Sonra örneklere 500 µl formik asit:asetonitril (2:98 v:v) ilave edilmiş ve tüpler 30 saniye vortekslenmiştir. 14000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilen tüplerde 5-FU'nun bulunduğu üst faz analiz edilmek üzere ayrılmıştır.

### 3.3.4.4. Metot Validasyonu

Plazma ve karaciğerde, 5-FU'nun analitik tayin metodunun validasyonunda, standart çözeltiler ile fare plazma ve karaciğer standartları kullanılmıştır. Doğrusallık, seçicilik, tayin sınırı, geri kazanım parametreleri değerlendirilmiştir.

### 3.3.5. Farmakokinetik Parametrelerin Hesaplanması

Plazma ve karaciğer standartlarına ait kromatogramlardan elde edilen pik alanları kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Bu eğrinin  $y=ax+b$  biçimindeki denkleminde konsantrasyonu bilinmeyen örneklere ait pik alanları yerleştirilerek ilgili pik alanının karşılık geldiği konsantrasyon değeri bulunmuştur. 0-6.saat arasındaki plazma ve karaciğer konsantrasyon zaman eğrilerine ait  $AUC_{0-6sa}$  değerleri yamuklar yöntemiyle bulunmuştur. Konsantrasyon zaman grafiklerindeki son dört konsantrasyon değeri alınarak üssel grafik çizilmiştir ve grafiğin denklemi kullanılarak eliminasyon hız sabiti ( $k_{el}$ ) değeri belirlenmiştir.  $AUC_{6sa-\infty}$  değerinin hesaplanmasında  $C_{6sa}/k_{el}$  formülü kullanılmıştır. Plazma ve karaciğer konsantrasyon-zaman eğrilerine bakılarak  $C_{maks}$  ve  $t_{maks}$  değerleri tespit edilmiştir.  $t_{1/2}$  değeri,  $0,693/k_{el}$  denklemi kullanılarak bulunmuştur. Klirens ( $CL/F$ ) değerinin hesaplanmasında  $Doz/AUC_{0-\infty}$  denkleminde,  $Vd/F$  değerinin hesaplanmasında ise  $(Cl/F)/k_{el}$  denkleminde yararlanılmıştır.

### 3.3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel anlamlılık, Prism 5.00 (GraphPad, ABD) programında tek yönlü varyans analizini (ANOVA, Analysis of Variance) takiben Tukey post-hoc test kullanılarak değerlendirilmiştir. Sirkadiyan ritimlere ilişkin istatistiksel değerlendirme, SPSS Statistics 22 (IBM, ABD) programında Cosinor analizi ile yapılmıştır. Tüm analizlerde  $p < 0,05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 3.4. Moleküler Çalışma

### 3.4.1. mRNA Ekspresyonlarının Belirlenmesi

#### 3.4.1.1. Karaciğer dokusundan RNA izolasyonu

Karaciğer dokularından RNA izolasyonu, RNeasy mini kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak ticari kitin protokolüne uygun biçimde yapılmıştır. -80 °C’de saklanan karaciğer dokuları, cam bir petri kabına alınarak buz üzerinde makas/bistüri yardımıyla çalışmaya uygun (yaklaşık 10 mg) parçalara ayrılmıştır. Daha sonra karaciğer doku örnekleri, cam doku öğütücü ve %1 oranında  $\beta$ -merkaptoetanol içeren RLT tamponu kullanılarak mekanik biçimde homojenize edilmiştir. Homojenizasyonda, her 10 mg doku için 350  $\mu$ l RLT tamponu kullanılmıştır. Homojenize edilen karaciğer dokularını içeren tüplere 350  $\mu$ l %70’lik etanol çözeltisi eklenmiş ve elde edilen 700  $\mu$ l örnek çözeltisi RNeasy kitinin kolon içeren santrifüj tüplerine alınmıştır. 8000g’de 15 saniye süreyle santrifüj edildikten sonra alt tüpe geçen kısım uzaklaştırılmıştır. Kolonda DNaz parçalama yapıldıktan sonra, kolona 700  $\mu$ l RW1 tamponu eklenmiş ve 8000g’de 15 saniye süreyle santrifüj edilerek alt tüpe geçen kısım uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kolona 500  $\mu$ l RPE tamponu eklenmiş ve 8000g’de 15 saniye süreyle santrifüj edildikten sonra alt tüpe geçen kısım uzaklaştırılmıştır. Son yapılan işlem santrifüj süresi 2 dakika olacak şekilde tekrar edilmiştir. RNeasy santrifüj kolonu temiz ve RNaz ve DNaz içermeyen bir tüpe yerleştirilerek kolonun membranına 40  $\mu$ l RNaz içermeyen su eklenmiş ve 1 dakika süreyle 8000g’de santrifüj edilerek total RNA elüe edilmiştir. Elde edilen RNA’ların konsantrasyonları NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, ABD) spektrofotometre cihazıyla ölçülmüş ve her bir örnek için cDNA’ya çevrilirken kullanılması gereken hacimler belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen RNA’nın kalitesini değerlendirmek amacıyla RNA örnekleri %0,5’lik agaroz jelde (dietyl pirokarbonat (DEPC) içeren su ile hazırlanmıştır) yürütülmüş ve daha sonra jel UV ışık altında görüntülenerek RNA örneklerinde degradasyon olmadığı tespit edilmiştir.

### 3.4.1.2. cDNA Sentezi

İzole edilen total RNA'lerden cDNA sentezi, RevertAid Ters Transkriptaz cDNA sentez kiti (Thermo, ABD) kullanılarak ve kit için önerilen protokole uygun olarak yapılmıştır. cDNA sentezi için RNA konsantrasyonuna bağlı olarak 0,5-1,2 µl total RNA kullanılmıştır. Steril ve nükleaz içermeyen eppendorf tüplerine her bir örnek için hesaplanan miktarlarda total RNAlar, 1 µl oligo (dT)18 primer, 10 µl nükleaz içermeyen su eklenmiştir. Örnekler, 65 °C'de 5 dakika süreyle thermal cycler polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) cihazında inkübe edildikten sonra buz üzerine alınarak her bir tüpe, 4 µl 5X reaksiyon tamponu, 1 µl RNaz inhibitörü, 2 µl 10 mM DNTP karışımı, 1 µl RevertAid M-MuLV Ters Transkriptaz eklenmiş ve örnekler 42 °C'de 60 dakika ve 70 °C'de 5 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir örneğin hacmi RNaz ve DNaz içermeyen su ile 100 µl'ye tamamlanmıştır.

### 3.4.1.3. mRNA Ekspresyonlarının belirlenmesi

Elde edilen cDNA'lar kullanılarak gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile örneklerdeki *Bmal1* mRNA ekspresyonları belirlenmiştir. Referans gen olarak gliseraldehit-3 fosfat dehidrojenaz (*Gapdh*) kullanılmıştır. Kullanılan primerler Tablo 3-5'te gösterilmiştir. Elde edilen cDNA'lar PCR'da kullanılmak üzere 1/5 oranında seyreltilmiştir. Her bir tüpe 10 µl 2x SYBR Green, 3 µl cDNA, 1µl gene özgü primer, 6 µl RNaz ve DNaz içermeyen su eklenmiştir. 95 °C'de 10 saniye denatürasyon, 60 °C'de 20 saniye primer bağlanması (annealing) ve 72 °C'de 30 saniye uzama (extension) basamaklarından oluşan 35 döngü ile gerçekleştirilmiştir. Her bir örnek iki tekrar olacak şekilde reaksiyona tabii tutulmuş ve elde edilen değerlerin ortalaması alınmıştır. Sonuçta elde edilen CT (cycle of threshold) değerleri kullanılarak gen ekspresyonlarına ilişkin hesaplamalar yapılmıştır. Her bir örnek için çalışılan gene ait CT değerinden, referans gene ait CT değeri çıkarıldıktan sonra  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  formülü ile hesaplama yapılmıştır.

**Tablo 3-5: Kullanılan primer dizileri.**

| Gen           | Primer dizileri                      |                                  |
|---------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| <i>mBmal1</i> | Forward:<br>GACTACCAAGAAAGTATGGACACA | Reverse:<br>TTTGTCCCGACGCCTCTTTT |
| <i>mGapdh</i> | Forward:<br>AACTTTGGCATTGTGGAAGG     | Reverse:<br>ACACATTGGGGGTAGGAACA |

### 3.4.2. Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

#### 3.4.2.1. Karaciğer Dokusundan Protein İzolasyonu

-80 °C’de saklanan karaciğer dokuları, cam bir petri kabına alınarak buz üzerinde makas/bistüri yardımıyla çalışmaya uygun (yaklaşık 10 mg) parçalara ayrılmıştır. Daha sonra karaciğer doku örnekleri, cam doku öğütücü ve parçalama tamponu (RIPA tamponu: Radio-immunoprecipitation assay buffer (50 ml için): 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, %1 Triton X, %0,1 SDS, 44,5 ml distile su, %1 proteaz inhibitörü kokteyli) kullanılarak mekanik olarak homojenize edilmiştir. Homojenizasyonda, her bir mg doku için 50 µl RIPA tamponu kullanılmıştır. Homojenize edilen örnekler buz üzerinde 10 dakika süreyle inkübe edildikten sonra, +4°C’de, 13.000 g’de, 15 dakika süreyle santrifüj edilip üst faz temiz tüpe ayrılmıştır. Elde edilen örneklerin protein miktar tayini, Pierce protein analizi (Thermo Scientific, ABD) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Absorbans değerleri, Biotek Synergy H1 (ABD) mikropilaka okuma cihazı ile 660 nm’de ölçülmüştür. Sığır serum albumin (BSA: Bovine serum albumin) proteininin standart eğrisinden hareketle, örneklerdeki protein miktarları belirlenmiştir.

#### 3.4.2.2. Western Blotlama

Protein örnekleri, 4X Laemmli tampon çözeltisiyle (250 mM Tris HCl pH: 6,8; %4 SDS; %40 gliserol; %0,02 bromofenol mavisi; hacmin %10’u kadar beta merkaptotanol) karıştırılarak 8 dakika süreyle 95°C’de inkübe edilmiş ve SDS-PAGE jellere yüklenene kadar buza saplanmıştır. Örnekler, farklı zamanlarda tekrar kullanılmaları gerektiğinde -20 °C’de saklanmıştır.

Örnekler, hesaplanan total protein miktarlarına göre, her bir çukurda eşit protein olacak biçimde SDS-PAGE jellere yüklenmiş ve elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Tank elektroforez çözeltisiyle doldurulduktan sonra, güç kaynağına bağlanmış ve 100 V’a ayarlanarak 90 dakika süreyle elektroforez gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3-6: SDS-PAGE jelin hazırlanışı.**

|                       |                                                                                                                      |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ayırıcı jel (%10'luk) | 1,9 ml distile su, 1,7 ml akrilamid karışımı, 1,3 ml tris (pH 8.8), 50 µl %10'luk SDS, 50 µl %10'luk APS, 2 µl TEMED |
| Yığıcı jel            | 1,4 ml distile su, 330 µl akrilamid karışımı, 250 µl tris (pH 6.8), 20 µl %10'luk SDS, 20 µl %10'luk APS, 2 µl TEMED |

Elektroforez bittikten sonra, 2-3 dakika boyunca transfer tamponunda bekletilen jel, proteinlerin jelden membrana transferi için PVDF membran ile beraber transfer kasetine yerleştirilmiştir. Transfer kaseti, transfer çözeltisiyle doldurulan transfer tankına yerleştirildikten sonra, buz aküleri de tanka yerleştirilip 100 V'da 90 dakika süreyle soğuk transfer gerçekleştirilmiştir.

Elektroforez ve transfer aşamalarında kullanılan tamponlar Tablo 3-7'de gösterilmiştir.

**Tablo 3-7: Elektroforez ve transfer aşamalarında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.**

| Çözeltiler             | Kullanılan kimyasallar                                                                                                                                                            |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Elektroforez çözeltisi | SDS Tamponu (10 L): 30,3 g Tris, 144 g Glisin, 10 g SDS, distile su ile son hacim 10 L'ye tamamlanır. Manyetik karıştırıcıda bileşenlerin iyice çözünmesi sağlanır.               |
| Transfer çözeltisi     | Transfer tamponu (1 L): 3,04 g Tris bazı ve 14,4 g glisin kullanılarak hazırlanan 10X transfer tamponundan 100 ml alınarak, 200 ml metanol ve 700 ml distile su ile karıştırılır. |

Transferden sonra, membranlar antikorun membrana non-spesifik bağlanmasını önlemek için %5'lik süt tozu içeren TBS-T çözeltisi kullanılarak çalkalayıcıda 1 saat süreyle bloklama işlemine tabi tutulmuştur. Birincil ve ikincil antikorlar %5 süt tozu içeren TBS-T çözeltisinde üreticinin önerdiği konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Membranlar +4 °C'de çalkalayıcı üzerinde, birincil antikor ile gece boyunca (18 saat) inkübe edildikten sonra 3 defa 5'er dakika süreyle TBS-T çözeltisiyle yıkanmıştır. Daha sonra, oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde ikincil antikor ile 1 saat boyunca

inkübasyon gerçekleştirilmiş ve 3 defa 5'er dakika süreyle TBS-T çözeltisiyle yıkama yapılmıştır.

**Tablo 3-8: Bloklama ve yıkama aşamalarında kullanılan çözeltilerin hazırlanışı.**

| Çözeltiler                | Kullanılan kimyasallar ve hazırlanışları                                                                                                                               |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10X TBS çözeltisi         | 24 g Tris bazı ve 80 g NaCl'in 800 mL distile suda manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak çözünmesi sağlanır ve pH 7,6'ya ayarlandıktan sonra hacim 1L'ye tamamlanır. |
| TBST-T çözeltisi          | Filtrelenmiş 50 ml 10X TBS, 450 ml distile su, 750 µl Tween 20                                                                                                         |
| %5'lik süt tozu çözeltisi | 2 g süt tozu, 40 ml TBS-T                                                                                                                                              |

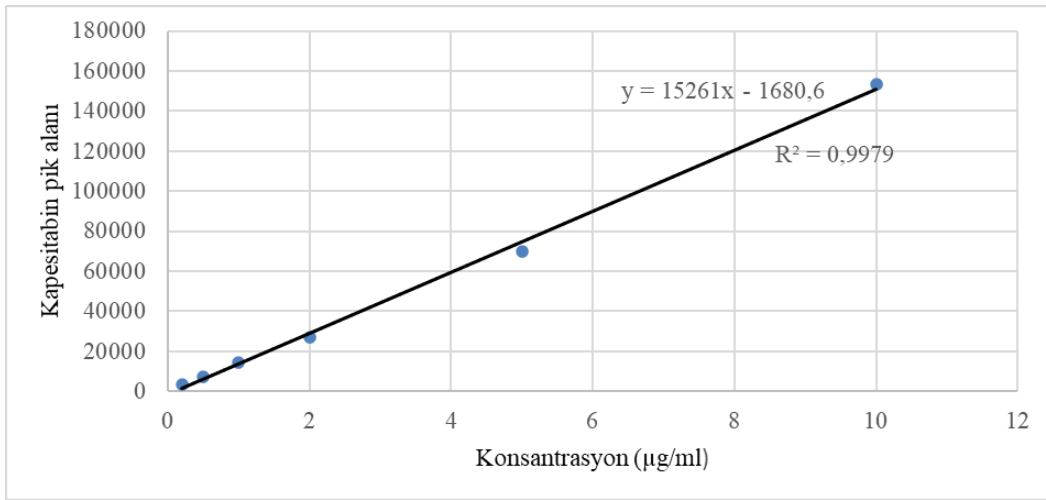
Görüntüleme aşaması için, kemilüminesan çözeltisi (WesternBright Sirius, Advansta, ABD) hazırlanmış ve membran üzerine membranı kaplayacak miktarda eklenmiştir. Çözelti membrandan uzaklaştırıldıktan sonra görüntüleme cihazı (Bio-Rad ChemiDoc Imaging System, ABD) ile görüntüleme yapılmış ve istenen görüntüler kaydedilmiştir. Elde edilen görüntülerde, Bio-RadImage Lab 6.1 (ABD) yazılımı kullanılarak CRY1, BMAL1, CDA, CES1, CES2, UPP2, DPD proteinlerinin bant yoğunluklarına ilişkin alanlar hesaplanmış ve daha sonra elde edilen alanlar her bir örnek için yükleme kontrolü olarak kullanılan  $\beta$ -Aktin proteinine ait bant yoğunluklarına bağlı olarak elde edilen alanlara bölünmüştür. Her bir membran için normalizasyon işlemleri yapılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Analitik Metot Validasyonu Bulguları

#### 4.1.1. Kapesitabin Tayininde Kullanılan Analiz Metodunun Validasyon Bulguları

Kapesitabin plazma tayininde kullanılan analitik metot, 0,1-10 µg/ml konsantrasyon aralığında doğrusallık göstermektedir. Kapesitabin plazma standartlarına ait kalibrasyon eğrisi Şekil 4-1’de verilmiştir.



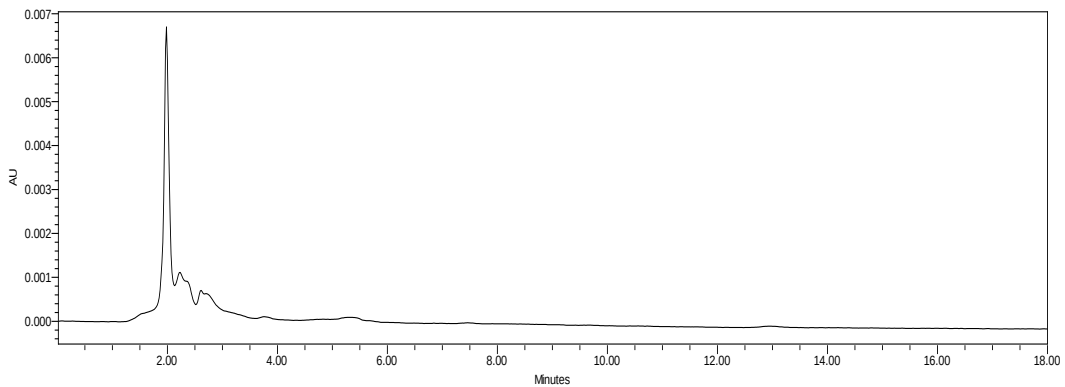
**Şekil 4-1: Kapesitabin plazma standartlarına ait kalibrasyon eğrisi.**

0,2 µg/ml ile 10 µg/ml konsantrasyonları arasında yapılan gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarında elde edilen % CV değerleri sırasıyla %4,08 ve %6,03’tür. Geri kazanım değerleri ise, 0,75 µg/ml konsantrasyonunda kapesitabin plazma standardı için %110,1; 3 µg/ml konsantrasyonunda kapesitabin plazma standardı için %98,87 ve 7,5 µg/ml konsantrasyonunda kapesitabin plazma standardı için 98,31 olarak bulunmuştur. Plazmada kapesitabin tayinine ilişkin analitik metot validasyonu bulguları Tablo 4-1’de özetlenmiştir.

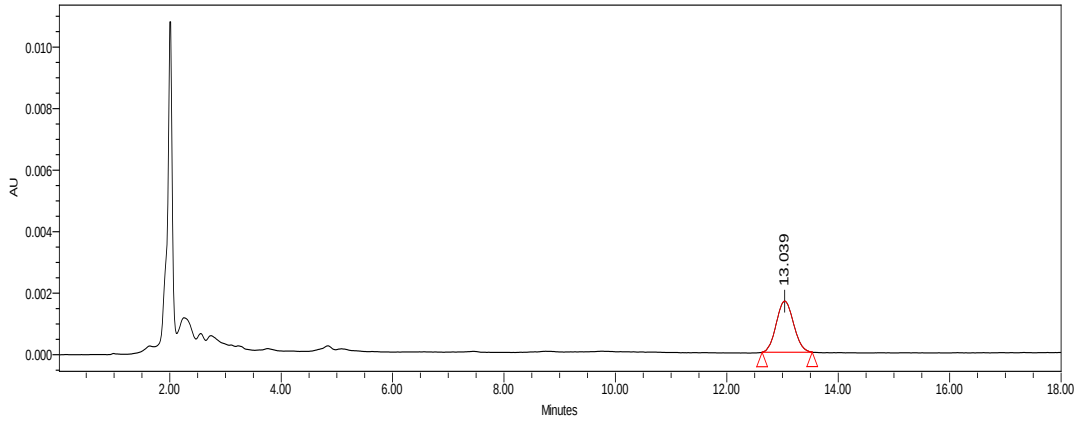
**Tablo 4-1: Plazmada kapesitabin tayininde kullanılan analitik metoda ilişkin validasyon bulguları.**

| Validasyon Parametreleri    | Değerlendirilen değişkenler                                 | Elde edilen değerler |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------|
| <b>Doğrusallık</b>          | Doğrusallık sınırları                                       | 0,1-10 µg/ml         |
|                             | Regresyon denklemi                                          | $y=15261x-1680,6$    |
|                             | R <sup>2</sup> değeri                                       | 0,9979               |
| <b>Doğruluk ve Kesinlik</b> | Gün içi tekrarlanabilirlik (% CV)                           | %4,08                |
|                             | Günler arası tekrarlanabilirlik (% CV)                      | %6,03                |
| <b>Tayin sınırı</b>         | LOD ve LOQ değerleri (ng/ml)                                | 4,95; 15             |
| <b>Geri kazanım</b>         | 0,75 µg/ml, 3 µg/ml ve 7,5 µg/ml konsantrasyonları için (%) | %110,1; 98,87; 98,31 |

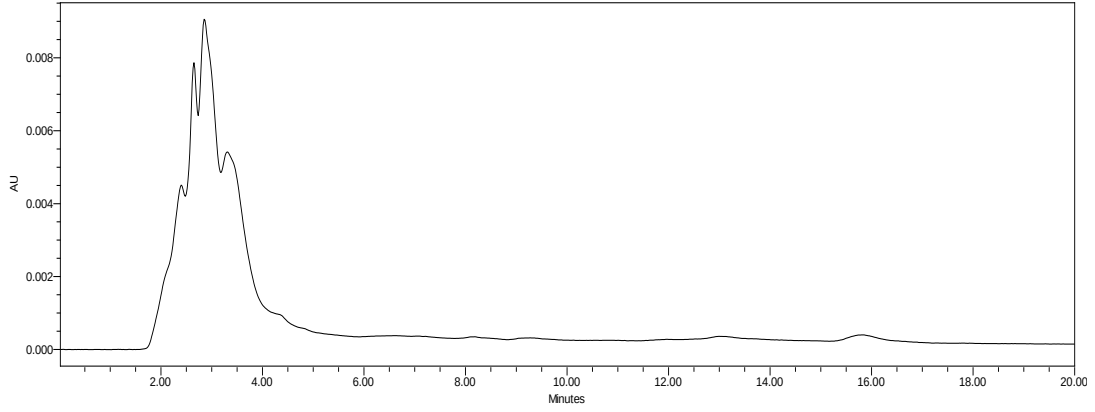
Kapesitabin tayininde kullanılan ters faz kromatografi metoduyla boş fare plazmasından ve kapesitabin spike edilmiş fare plazmasından elde edilen kromatogramlar Şekil 4-2 ve Şekil 4-3'te gösterilmiştir. Kapesitabin için alıkonma zamanı 13,0 dakikadır. Kapesitabinin alıkonma zamanında boş plazmada başka herhangi bir pik görülmemektedir ve bu veri analitik metodun kapesitabin tayini için seçiciliğini göstermektedir.



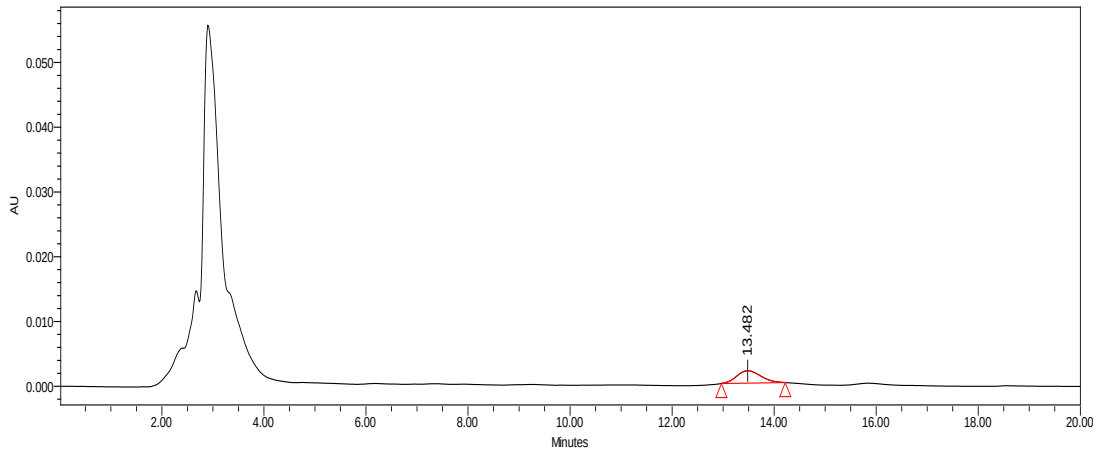
**Şekil 4-2: Kapesitabin tayininde kullanılan ters faz kromatografi metoduyla boş fare plazmasından elde edilen kromatogram.**



**Şekil 4-3: Kapesitabin tayininde kullanılan ters faz kromatografi metoduyla 1 µg/ml kapesitabin çözeltisi spike edilen fare plazmasından elde edilen kromatogram.**



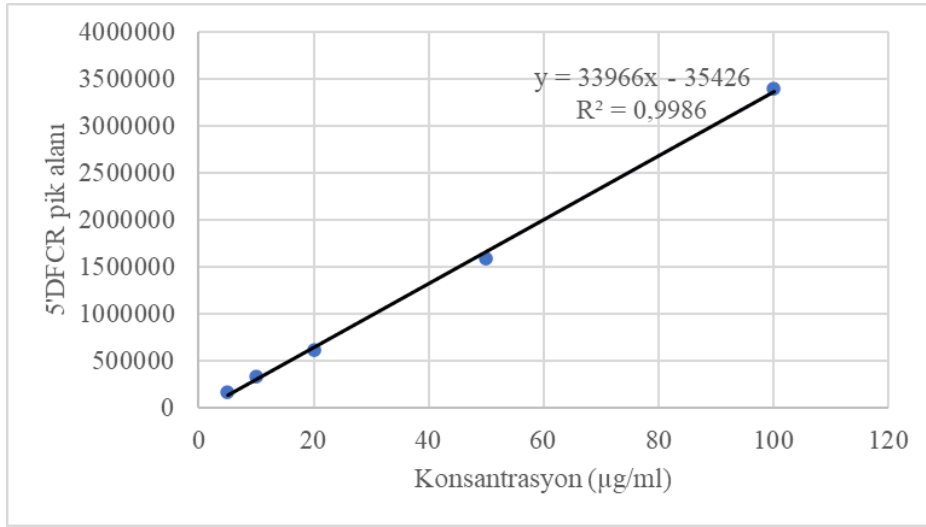
**Şekil 4-4: Kapesitabin tayininde kullanılan ters faz kromatografi metoduyla boş fare karaciğerinden elde edilen kromatogram.**



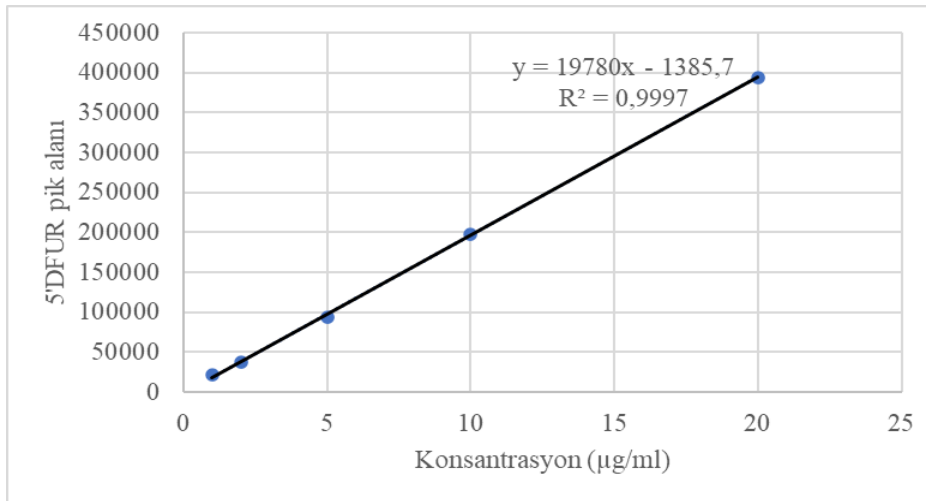
**Şekil 4-5: Kapesitabin tayininde kullanılan ters faz kromatografi metoduyla 2 µg/ml kapesitabin çözeltisi spike edilen fare karaciğerinden elde edilen kromatogram.**

#### 4.1.2. 5'DFCR ve 5'DFUR Tayininde Kullanılan Analiz Metodunun Validasyon Bulguları

5'DFCR ve 5'DFUR plazma tayininde kullanılan analitik metot, 5'DFCR için 5-100 µg/ml konsantrasyon aralığında, 5'DFUR için ise 1-20 µg/ml konsantrasyon aralığında doğrusallık göstermektedir. 5'DFCR ve 5'DFUR plazma standartlarına ait kalibrasyon eğrileri Şekil 4-6 ve Şekil 4-7'de verilmiştir.



Şekil 4-6: 5'DFCR plazma standartlarına ait kalibrasyon eğrisi.



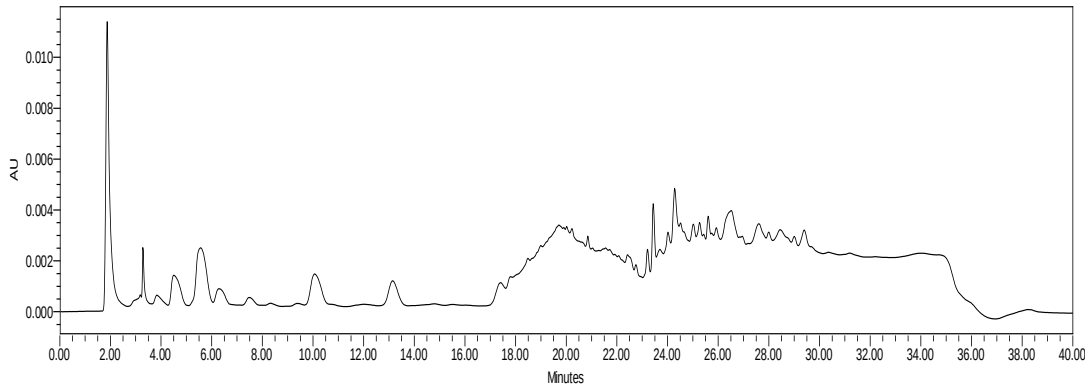
Şekil 4-7: 5'DFUR plazma standartlarına ait kalibrasyon eğrisi.

Plazmada 5'DFCR ve 5'DFUR tayinine ilişkin analitik metot validasyonu bulguları Tablo 4-2'de özetlenmiştir.

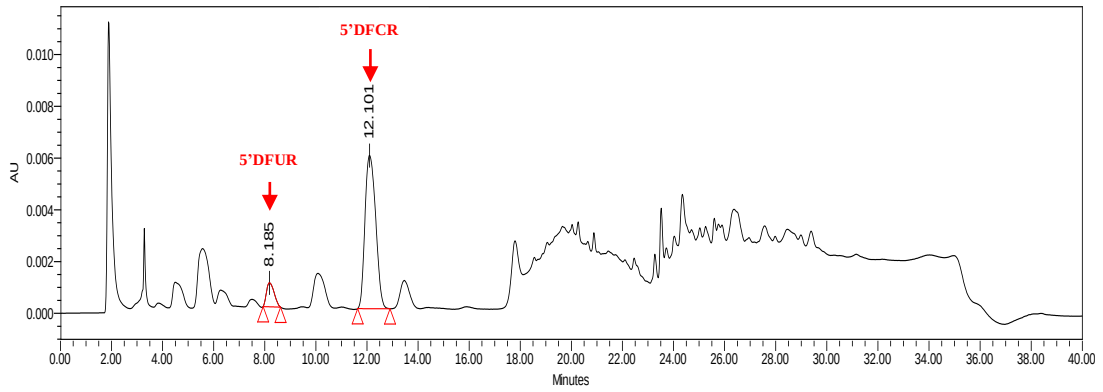
**Tablo 4-2: Plazmada 5'DFCR ve 5'DFUR tayininde kullanılan analitik metoda ilişkin validasyon bulguları.**

| Validasyon Parametreleri | Değerlendirilen değişkenler               | Elde edilen değerler    |                         |
|--------------------------|-------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                          |                                           | 5'DFCR                  | 5'DFUR                  |
| Doğrusallık              | Doğrusallık sınırları                     | 5-100 µg/ml             | 1-20 µg/ml              |
|                          | Regresyon denklemi                        | $y=33966x-35426$        | $y=19780x-1385,7$       |
|                          | R <sup>2</sup> değeri                     | R <sup>2</sup> = 0,9986 | R <sup>2</sup> = 0,9997 |
| Doğruluk ve Kesinlik     | Gün içi tekrarlanabilirlik (%CV)          | %0,99                   | %1,36                   |
|                          | Günler arası tekrarlanabilirlik (%CV)     | %7,04                   | %2,94                   |
| Tayin sınırı             | LOD ve LOQ değerleri (µg/ml)              | 5,61; 17                | 5,12; 15,5              |
| Geri kazanım             | 5'DFCR (0,5 µg/ml, 3 µg/ml, 9 µg/ml) (%); | %102,5; 100,3; 95,1     | %106,8; 104,8; 99,9     |
|                          | 5'DFUR (2 µg/ml, 15 µg/ml, 45 µg/ml) (%)  |                         |                         |

5'DFCR ve 5'DFUR tayininde kullanılan ters faz kromatografi metoduyla boş fare plazmasından ve 5'DFCR ve 5'DFUR spike edilmiş fare plazmasından elde edilen kromatogramlar Şekil 4-8 ve Şekil 4-9'da gösterilmiştir. 5'DFCR için alıkonma zamanı 12,1 dakika; için ise 8,2 dakikadır. 5'DFCR ve 5'DFUR 'nin alıkonma zamanında boş plazmada başka herhangi bir pik görülmemektedir ve bu veri analitik metodun 5'DFCR ve 5'DFUR tayini için seçiciliğini göstermektedir.



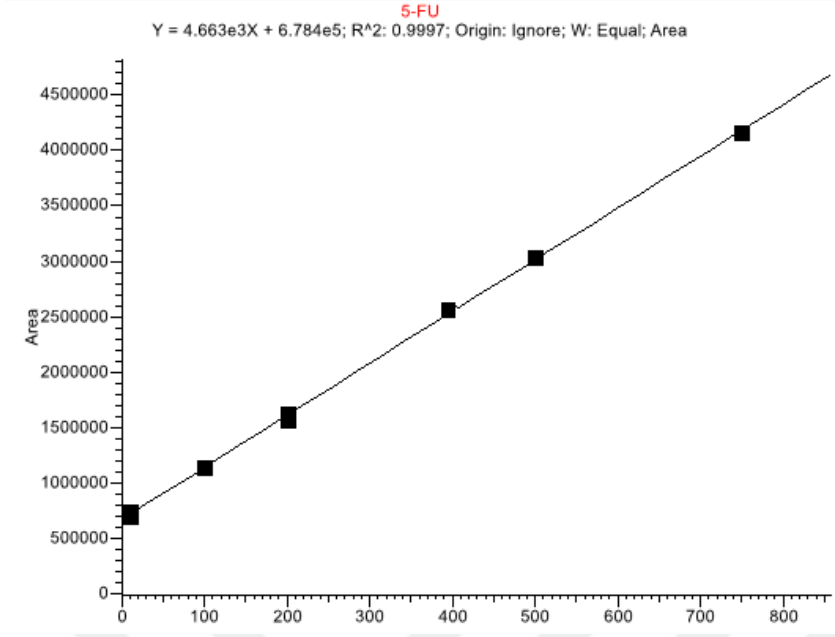
**Şekil 4-8: 5'DFCR ve 5'DFUR metabolitlerinin tayininde kullanılan ters faz kromatografi metoduyla boş fare plazmasından elde edilen kromatogram.**



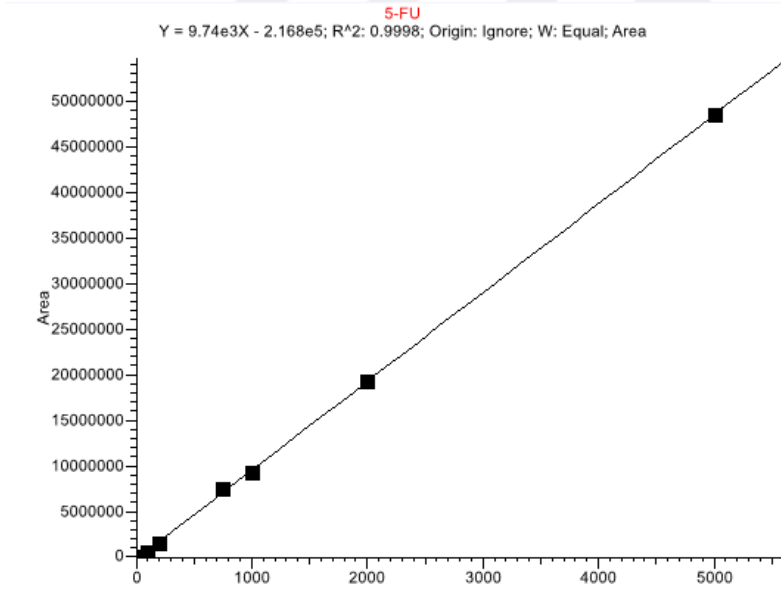
**Şekil 4-9: 5'DFCR ve 5'DFUR metabolitlerinin tayininde kullanılan ters faz kromatografi metoduyla 5 µg/ml 5'DFCR ve 1 µg/ml 5'DFUR çözeltisi spike edilen fare plazmasından elde edilen kromatogram.**

#### 4.1.3. 5-FU Tayininde Kullanılan Analiz Metodunun Validasyon Bulguları

5-FU'nun tayininde kullanılan analitik metodun, plazma için 1-750 ng/ml konsantrasyon aralığında; karaciğer için 5-5000 ng/ml konsantrasyon aralığında doğrusallık gösterdiği belirlenmiştir. 5-FU plazma standartlarına ait kalibrasyon eğrisi Şekil 4-10'da, 5-FU karaciğer standartlarına ait kalibrasyon eğrisi ise Şekil 4-11'de verilmiştir.



**Şekil 4-10: 5-FU plazma standartlarına ait kalibrasyon eğrisi.**



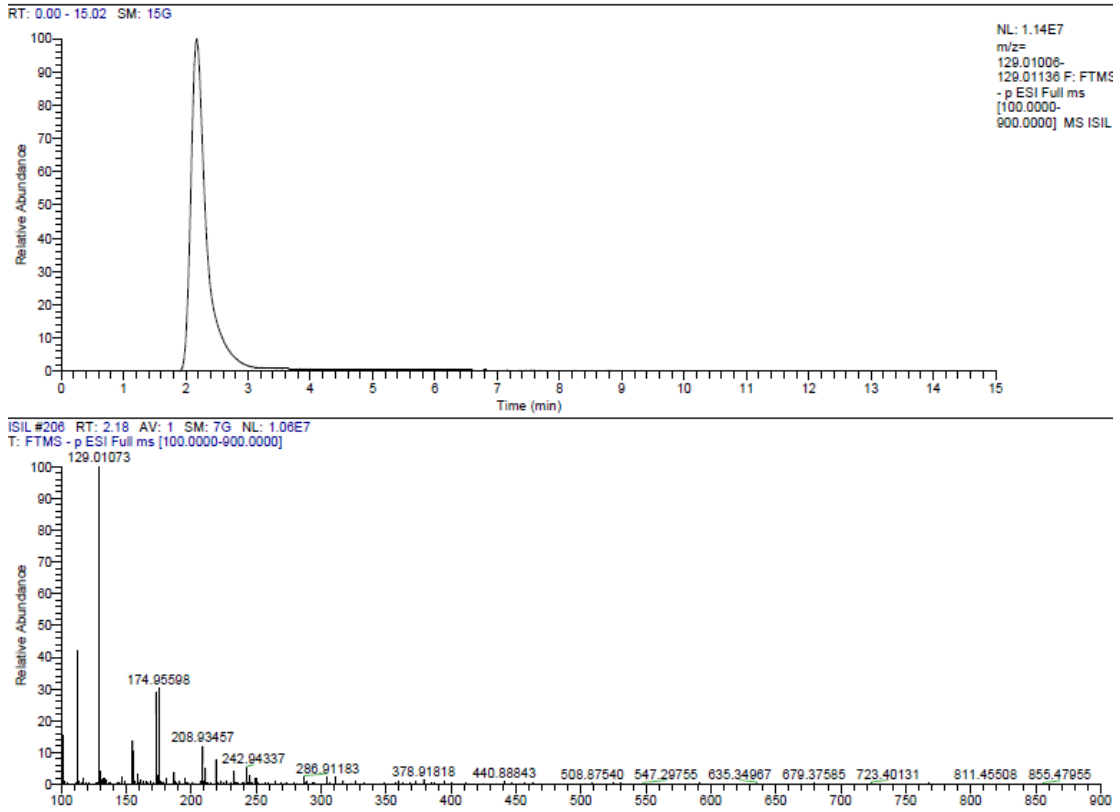
**Şekil 4-11: 5-FU karaciğer standartlarına ait kalibrasyon eğrisi.**

5-FU tayinine ilişkin analitik metot validasyonu bulguları Tablo 4-3'te özetlenmiştir.

**Tablo 4-3: 5-FU tayininde kullanılan analitik metoda ilişkin plazmada ve karaciğerde validasyon bulguları.**

| Validasyon Parametreleri | Değerlendirilen değişkenler  | Elde edilen değerler |                     |
|--------------------------|------------------------------|----------------------|---------------------|
|                          |                              | Plazma               | Karaciğer           |
| <b>Doğrusallık</b>       | Doğrusallık sınırları        | 1-750 ng/ml          | 5-5000 ng/ml        |
|                          | Lineer regresyon denklemi    | $y=4,663e3x-6,784e5$ | $y=9,74e3x-2,168e5$ |
|                          | R <sup>2</sup> değeri        | 0,999                | 0,999               |
| <b>Tayin sınırı</b>      | LOD ve LOQ değerleri (ng/ml) | 1; 3,3               | 1,5; 5,04           |
| <b>Geri kazanım</b>      | (%)                          | 99,56                | 99,25               |

5-FU tayininde kullanılan LC-MS metoduyla 5-FU spike edilmiş fare plazmasından elde edilen kromatogram ve kütle spektrumu Şekil 4-12’de gösterilmiştir.

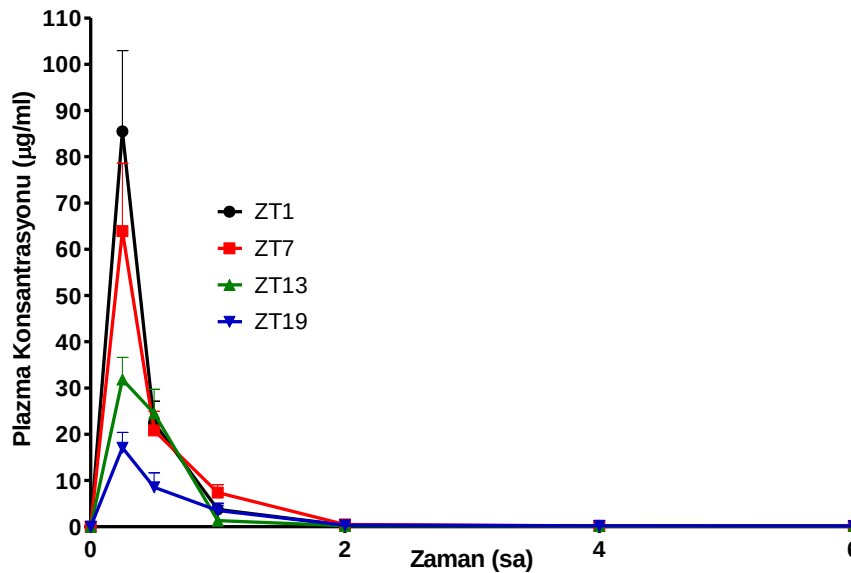


**Şekil 4-12: 5-FU’nun tayininde kullanılan LC-MS metoduyla 5-FU çözeltisi spike edilen fare plazmasından elde edilen kromatogram (üstte) ve 5-FU’nun kütle spektrumu (altta).**

## 4.2. Kronofarmakokinetik Çalışma Sonuçları

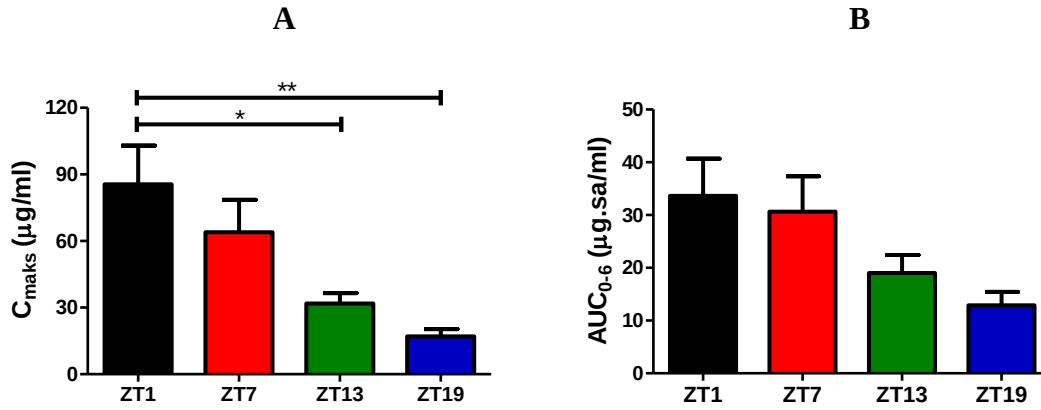
### 4.2.1. Kapesitabinin Plazmadaki Kronofarmakokinetiğinin Değerlendirilmesi

ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan uygulanan kapesitabinin farmakokinetiğinin değerlendirilmesi sonucunda, gruplar arasında uygulama zamanına bağlı olarak anlamlı farklılıklar görülmüştür. Kapesitabinin plazma konsantrasyon grafiğinden elde edilen ortalama  $C_{maks}$  değeri, ZT1 grubunda ZT13 ve ZT19'a göre sırasıyla 2,68 ve 5 kat fazladır (\* $p<0,05$ ). ZT7 grubuna ait ortalama  $C_{maks}$  değeri, ZT13 ve ZT19'a göre sırasıyla 2,01 ve 3,74 kat fazla bulunmuştur. Ortalama  $AUC_{0-6sa}$  değerleri karşılaştırıldığında, ZT1 grubundaki ortalama  $AUC_{0-6sa}$ , ZT13 ve ZT19 gruplarına göre sırasıyla 1,77 ve 2,61 kat fazla bulunmuştur. ZT7 grubunda ise ortalama  $AUC_{0-6sa}$ , ZT13 ve ZT19 gruplarına kıyasla sırasıyla 1,61 ve 2,38 kat fazladır.  $t_{maks}$ , tüm gruplar için 0,25 saattir. Kapesitabin, tüm gruplarda hızlı bir şekilde metabolize olmuştur ve yarılanma ömrü kısadır.  $t_{1/2}$  değeri, ZT19 grubunda ZT1 ve ZT7 grupları için sırasıyla 1,43 ve 1,56 kat uzun olmakla beraber gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermemektedir. ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen kapesitabin plazma konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 4-13'te,  $C_{maks}$  ve  $AUC_{0-6sa}$  değerlerinin karşılaştırılmasını içeren grafikler ise Şekil 4-14'te verilmiştir.



**Şekil 4-13:** C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen kapesitabin plazma konsantrasyon-zaman grafiği.

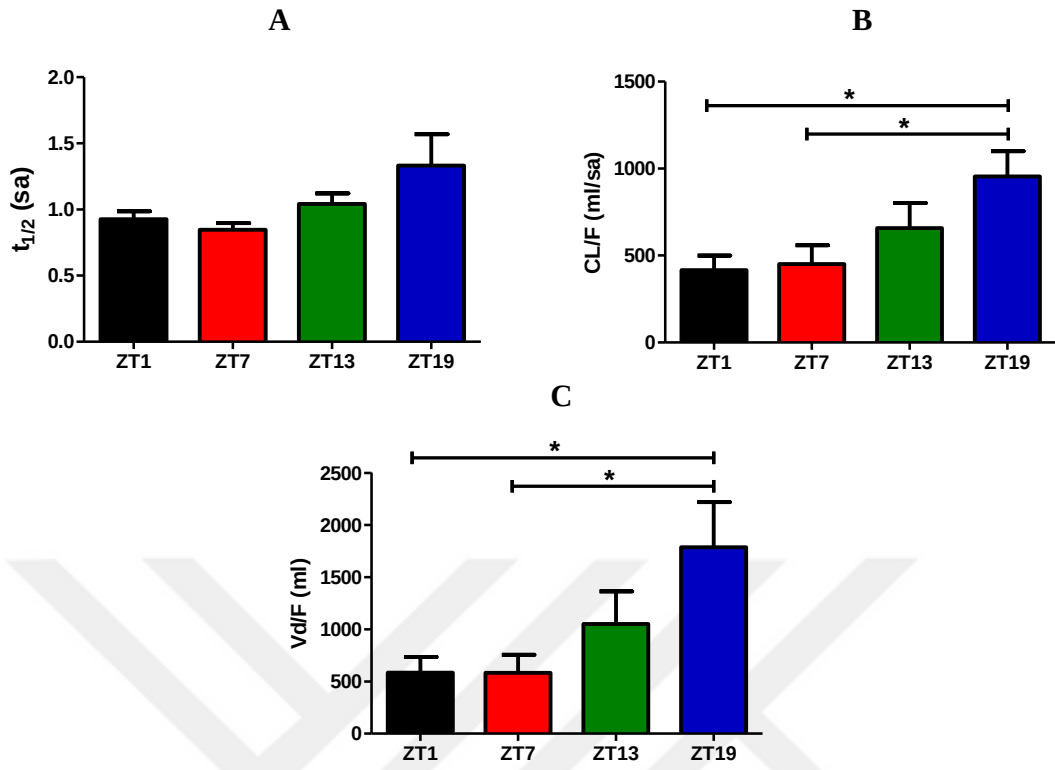
Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için).



**Şekil 4-14: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen kapesitabine ait plazma C<sub>max</sub> (A) ve AUC<sub>0-6sa</sub> (B) değerleri.**

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). 1-yönlü ANOVA'yı takiben Tukey post-test uygulanmıştır (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

Kapesitabinin eliminasyonuna ilişkin parametreler değerlendirildiğinde, ZT19 grubuna ait ortalama CL/F değeri, ZT1 ve ZT7 gruplarına göre sırasıyla 2,29 ve 2,12 kat yüksek bulunmuştur (\*p<0,05). ZT13 grubuna ait ortalama CL/F değeri, ZT1 ve ZT7 gruplarına göre sırasıyla 1,58 ve 1,46 kat yüksektir. Ortalama Vd/F değerleri ise, ZT19 grubunda ZT1 ve ZT7 gruplarına göre sırasıyla 3,06 ve 3,07 kat fazla bulunmuştur (\*p<0,05). ZT13 grubuna ait ortalama Vd/F değeri, ZT1 ve ZT7 gruplarına göre sırasıyla 1,80 ve 1,81 kat fazladır. ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen, kapesitabine ait plazma t<sub>1/2</sub>, CL/F ve Vd/F değerleri Şekil 4-15'te verilmiştir. Kapesitabinin plazma farmakokinetiğine ilişkin elde edilen değerler Tablo 4-4'te sunulmuştur.



**Şekil 4-15:** C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen kapesitabine ait plazma  $t_{1/2}$  (A), CL/F (B) ve Vd/F (C) değerleri.

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). 1-yönlü ANOVA'yı takiben Tukey post test uygulanmıştır (\*p<0,05).

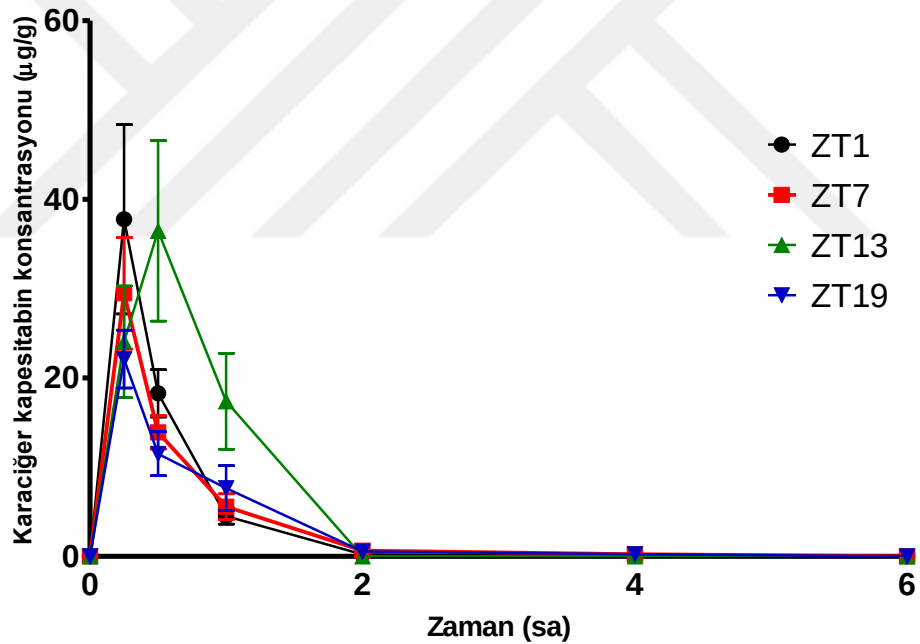
**Tablo 4-4:** Kapesitabinin plazma farmakokinetiğine ilişkin bulgular.

|                                                            | ZT1                | ZT7                | ZT13               | ZT19               |
|------------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| $AUC_{0-6sa}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{sa}/\text{ml}$ )    | 33,64 $\pm$ 7,06   | 30,63 $\pm$ 6,73   | 19,03 $\pm$ 3,39   | 12,88 $\pm$ 2,55   |
| $AUC_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{sa}/\text{ml}$ ) | 33,87 $\pm$ 7,06   | 30,83 $\pm$ 6,72   | 19,27 $\pm$ 3,38   | 13,17 $\pm$ 2,56   |
| $C_{maks}$ ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )                     | 85,50 $\pm$ 17,45  | 63,94 $\pm$ 14,63  | 31,87 $\pm$ 4,73   | 17,09 $\pm$ 3,30   |
| $t_{maks}$ (sa)                                            | 0,25               | 0,25               | 0,25               | 0,25               |
| $t_{1/2}$ (sa)                                             | 0,93 $\pm$ 0,06    | 0,85 $\pm$ 0,05    | 1,04 $\pm$ 0,08    | 1,33 $\pm$ 0,24    |
| CL/F (ml/sa)                                               | 416,2 $\pm$ 83,67  | 450,3 $\pm$ 109,40 | 658,3 $\pm$ 143,80 | 954,5 $\pm$ 146,60 |
| $k_{el}$ ( $\text{sa}^{-1}$ )                              | 0,76 $\pm$ 0,05    | 0,83 $\pm$ 0,05    | 0,68 $\pm$ 0,05    | 0,58 $\pm$ 0,08    |
| Vd/F (ml)                                                  | 584,4 $\pm$ 150,10 | 581,5 $\pm$ 173,50 | 1051 $\pm$ 313,00  | 1787 $\pm$ 432,10  |

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için).

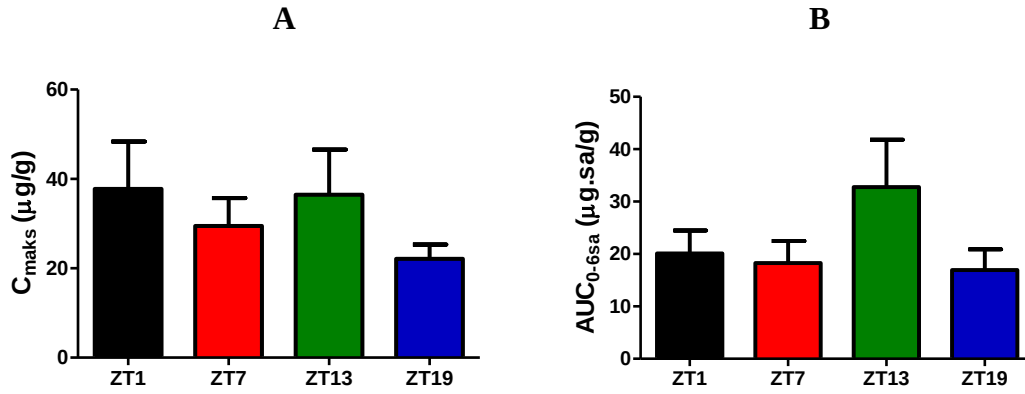
#### 4.2.2. Kapesitabinin Karaciğerdeki Kronofarmakokinetiğinin Değerlendirilmesi

Kapesitabin C57BL/6J soyu erkek farelerin karaciğer dokusunda da kısa süre içinde  $t_{maks}$  değerine ulaşmış ve hızla metabolize olmuştur.  $t_{maks}$ , ZT1, ZT7 ve ZT19 grupları için 0,25 saat ve ZT13 grubu için ise 0,5 saattir. Kapesitabinin karaciğer konsantrasyon grafiğinden elde edilen ortalama  $AUC_{0-6sa}$  değerleri karşılaştırıldığında, ZT13 grubundaki ortalama  $AUC_{0-6sa}$ , ZT1, ZT7 ve ZT19 gruplarına göre sırasıyla 1,63, 1,79 ve 1,93 kat fazla bulunmuştur. Kapesitabinin karaciğer-konsantrasyon grafiğinden elde edilen ortalama  $C_{maks}$  değeri, ZT1 grubunda ZT19'a göre 1,71 kat, ZT13 grubunda ise ZT19'a göre 1,65 kat fazladır. ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen kapesitabin plazma konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 4-16'da,  $C_{maks}$  ve  $AUC_{0-6sa}$  değerlerinin karşılaştırılmasını içeren grafikler ise Şekil 4-17'de verilmiştir.



Şekil 4-16: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen kapesitabine ait karaciğer konsantrasyon-zaman grafiği.

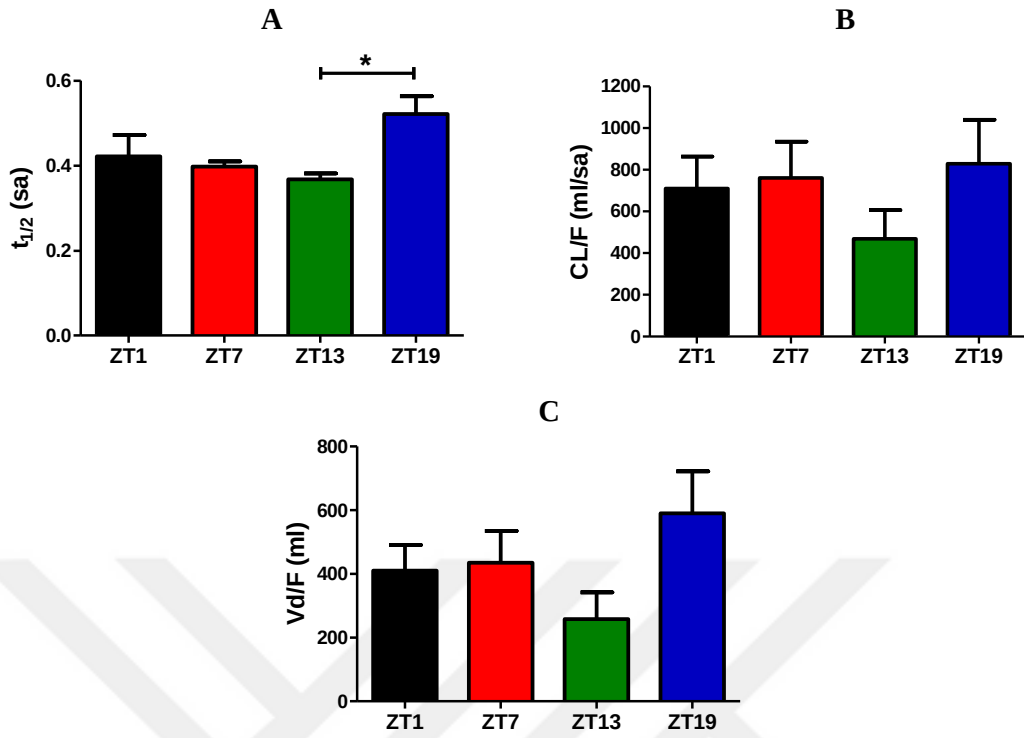
Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için).



**Şekil 4-17: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen kapesitabine ait karaciğer  $C_{maks}$  (A) ve  $AUC_{0-6sa}$  (B) değerleri.**

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için).

Kapesitabinin karaciğerdeki yarılanma ömrü değerlendirildiğinde,  $t_{1/2}$  değeri ZT19'da ZT13'e göre 1,41 kat uzun bulunmuştur (\* $p < 0,05$ ). Kapesitabinin karaciğerden klirensi ZT13'te, ZT1, ZT7 ve ZT19'a göre sırasıyla 1,52, 1,62 ve 1,77 kat fazladır. Karaciğerdeki ortalama  $V_d/F$  değerleri ise, ZT13'te, ZT1, ZT7 ve ZT19'a göre sırasıyla 1,59, 1,68 ve 2,29 kat fazladır. ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen, kapesitabinin karaciğerdeki  $t_{1/2}$ ,  $CL/F$  ve  $V_d/F$  değerleri Şekil 4-18'de verilmiştir. Kapesitabinin karaciğerdeki farmakokinetiğine ilişkin elde edilen değerler Tablo 4-5'te bulunmaktadır.



**Şekil 4-18:** C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen karaciğer kapesitabin  $t_{1/2}$  (A), CL/F (B) ve Vd/F (C) değerleri.

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). 1-yönlü ANOVA'ya takiben Tukey post-test uygulanmıştır (\*p<0,05).

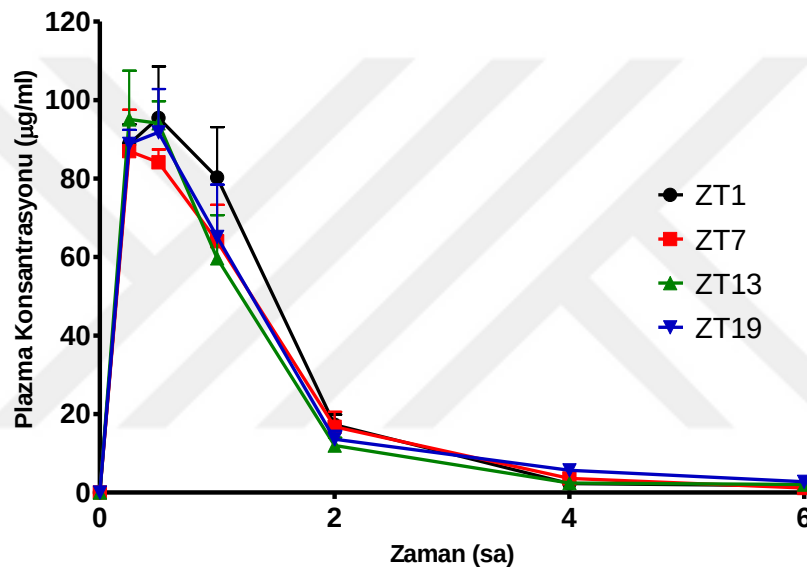
**Tablo 4-5:** Kapesitabinin karaciğerdeki farmakokinetiğine ilişkin bulgular.

|                                         | ZT1                 | ZT7                 | ZT13                | ZT19                |
|-----------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>AUC<sub>0-6sa</sub> (µg.sa/g)</b>    | 20,12 $\pm$ 4,38    | 18,25 $\pm$ 4,21    | 32,75 $\pm$ 9,07    | 16,93 $\pm$ 3,96    |
| <b>AUC<sub>0-∞</sub> (µg.sa/g)</b>      | 20,12 $\pm$ 4,39    | 18,25 $\pm$ 4,21    | 32,75 $\pm$ 9,07    | 16,94 $\pm$ 3,96    |
| <b>C<sub>maks</sub> (µg/g)</b>          | 37,77 $\pm$ 10,60   | 29,47 $\pm$ 6,24    | 36,47 $\pm$ 10,11   | 22,10 $\pm$ 3,25    |
| <b>t<sub>maks</sub> (sa)</b>            | 0,25                | 0,25                | 0,5                 | 0,25                |
| <b>t<sub>1/2</sub> (sa)</b>             | 0,42 $\pm$ 0,05     | 0,40 $\pm$ 0,01     | 0,37 $\pm$ 0,01     | 0,52 $\pm$ 0,04     |
| <b>CL/F (ml/sa)</b>                     | 709,90 $\pm$ 153,30 | 760,90 $\pm$ 174,10 | 468,50 $\pm$ 138,00 | 828,90 $\pm$ 210,50 |
| <b>k<sub>el</sub> (sa<sup>-1</sup>)</b> | 1,71 $\pm$ 0,15     | 1,74 $\pm$ 0,05     | 1,90 $\pm$ 0,08     | 1,37 $\pm$ 0,11     |
| <b>Vd/F (ml)</b>                        | 410,6 $\pm$ 80,30   | 434,8 $\pm$ 100,10  | 258,3 $\pm$ 83,72   | 590,4 $\pm$ 131,70  |

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için).

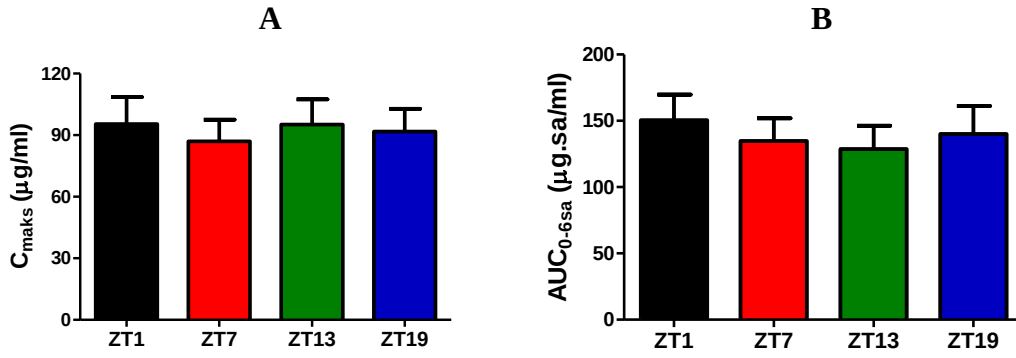
#### 4.2.3. 5'DFCR ve 5'DFUR Metabolitlerinin Plazmadaki Kronofarmakokinetiğinin Değerlendirilmesi

ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanmasını takiben oluşan 5'DFCR ve 5'DFUR metabolitlerinin farmakokinetik profili değerlendirilmiştir. 5'DFCR plazma konsantrasyon grafiğinden elde edilen ortalama  $C_{maks}$  değeri ve ortalama  $AUC_{0-6sa}$  değerleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFCR plazma konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 4-19'da,  $C_{maks}$  ve  $AUC_{0-6sa}$  değerlerinin karşılaştırılmasını içeren grafikler ise Şekil 4-20'de verilmiştir.



Şekil 4-19: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFCR metabolitine ait plazma konsantrasyon-zaman grafiği.

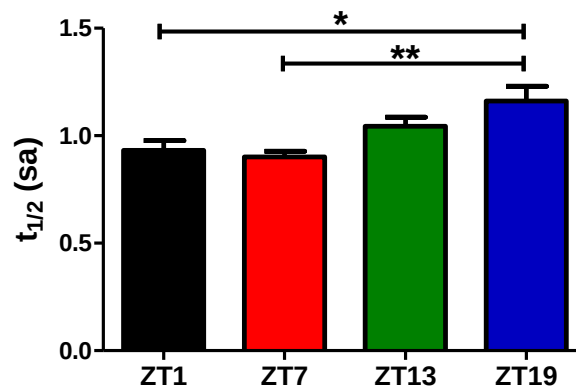
Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için).



**Şekil 4-20: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFCR metabolitine ait plazma C<sub>max</sub> (A) ve AUC<sub>0-6sa</sub> (B) değerleri.**

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için).

C57BL/6J soyu erkek farelere oral yoldan verilen kapesitabin, tüm gruplarda kısa süre içinde 5'DFCR'ye metabolize olmuştur. 5'DFCR'nin t<sub>max</sub> değeri, ZT1 ve ZT13 grupları için 0,25 saat iken, ZT1 ve ZT19 grupları için 0,5 saattir. Ortalama t<sub>1/2</sub> değeri, ZT19 grubunda ZT1 ve ZT7 gruplarına göre sırasıyla 1,25 ve 1,29 kat uzundur (\*p<0,05). ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen, 5'DFCR'ye ait plazma t<sub>1/2</sub> değerlerinin karşılaştırılması Şekil 4-21'de verilmiştir. 5'DFCR'nin plazma farmakokinetiğine ilişkin veriler, Tablo 4-6'da sunulmuştur.



**Şekil 4-21: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFCR'ye ait plazma kapesitabin t<sub>1/2</sub> değerleri.**

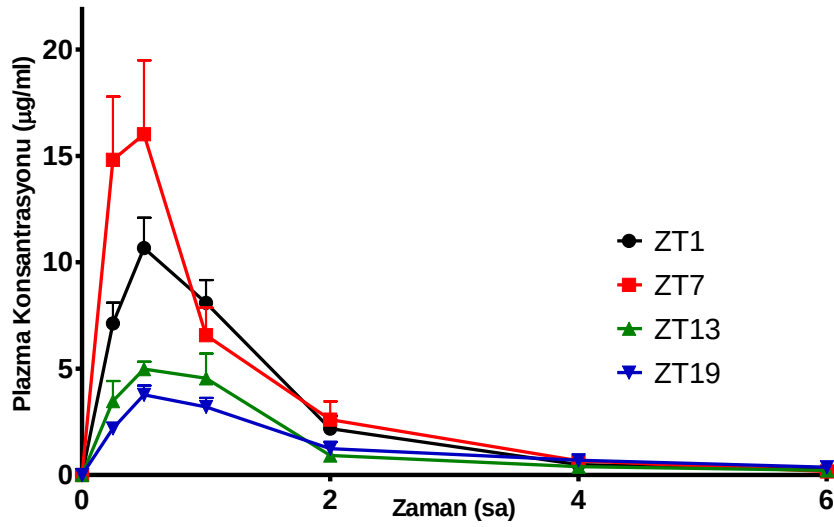
Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). 1-yönlü ANOVA'yı takiben Tukey post-test uygulanmıştır (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

**Tablo 4-6: 5'DFCR'nin plazma farmakokinetiğine ilişkin bulgular.**

|                                         | <b>ZT1</b>     | <b>ZT7</b>     | <b>ZT13</b>    | <b>ZT19</b>    |
|-----------------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>AUC<sub>0-6sa</sub> (µg.sa/ml)</b>   | 150,40 ± 19,26 | 134,80 ± 17,09 | 128,70 ± 17,59 | 140,10 ± 21,01 |
| <b>AUC<sub>0-∞</sub> (µg.sa/ml)</b>     | 152,80 ± 19,36 | 136,30 ± 17,07 | 132,10 ± 18,58 | 145,00 ± 22,85 |
| <b>C<sub>maks</sub> (µg/ml)</b>         | 95,45 ± 13,13  | 86,98 ± 10,55  | 95,11 ± 12,36  | 91,79 ± 11,03  |
| <b>t<sub>maks</sub> (sa)</b>            | 0,5            | 0,25           | 0,25           | 0,5            |
| <b>t<sub>1/2</sub> (sa)</b>             | 0,93 ± 0,05    | 0,90 ± 0,03    | 1,04 ± 0,04    | 1,16 ± 0,07    |
| <b>k<sub>el</sub> (sa<sup>-1</sup>)</b> | 0,75 ± 0,03    | 0,77 ± 0,02    | 0,67 ± 0,03    | 0,61 ± 0,03    |

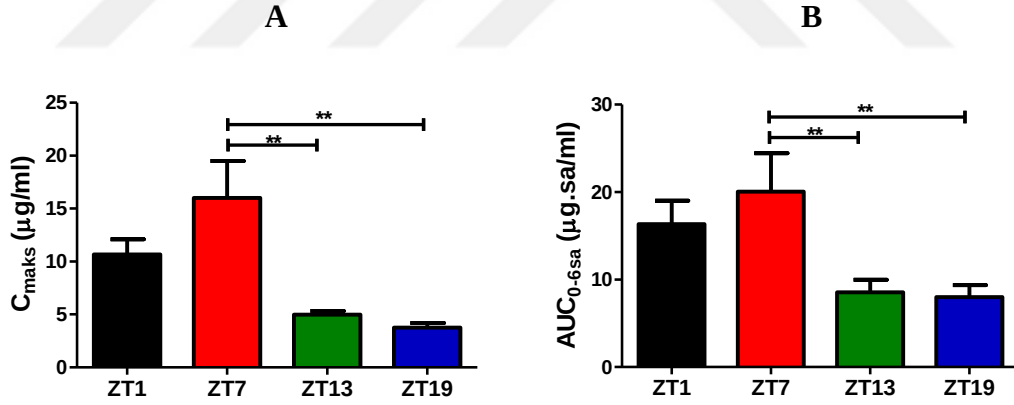
Sonuçlar, ortalama ± SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için).

Kapesitabinin metabolik dönüşümünde 5'DFCR'den sonraki basamakta oluşan 5'DFUR metabolitinin plazma konsantrasyon grafiğinden elde edilen ortalama AUC<sub>0-6sa</sub> değerleri, ZT7 grubunda ZT13 ve ZT19'a göre 2,35 ve 2,51 kat fazla bulunmuştur (\*\*p<0,05). ZT1 grubuna ait ortalama AUC<sub>0-6sa</sub> değerleri ise, ZT13 ve ZT19 gruplarına göre sırasıyla 1,91 ve 2,05 kat fazladır. 5'DFUR plazma konsantrasyon grafiğinden elde edilen ortalama C<sub>maks</sub> değerleri karşılaştırıldığında, ZT7 grubuna ait ortalama C<sub>maks</sub>'ın ZT13 ve ZT19 gruplarına göre sırasıyla 3,21 ve 4,25 kat fazla olduğu görülmüştür (\*\*p<0,01). ZT1 grubunda ortalama C<sub>maks</sub>, ZT13 ve ZT19 gruplarına kıyasla sırasıyla 2,14 ve 2,83 kat fazladır. ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFUR plazma konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 4-22'de, C<sub>maks</sub> ve AUC<sub>0-6sa</sub> değerlerinin karşılaştırılmasını içeren grafikler ise Şekil 4-23'te verilmiştir.



Şekil 4-22: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFUR metabolitine ait plazma konsantrasyon-zaman grafiği.

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için).

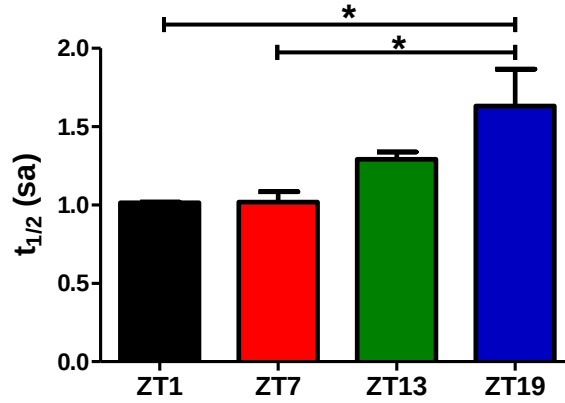


Şekil 4-23: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFUR metabolitine ait plazma C<sub>maks</sub> (A) ve AUC<sub>0-6sa</sub> (B) değerleri.

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). 1-yönlü ANOVA'yı takiben Tukey post-test uygulanmıştır (\*\*p<0,01).

ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 gruplarında 5'DFUR için plazmadaki t<sub>maks</sub> 0,5 saattir. Gruplar arasında 5'DFUR'un ortalama t<sub>1/2</sub> değerleri kıyaslandığında, ZT19 grubunda t<sub>1/2</sub>'nin ZT1 ve ZT7 gruplarında göre 1,6 kat uzun olduğu görülmüştür (\*p<0,05). ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen,

5'DFUR'a ait plazma  $t_{1/2}$  değerleri Şekil 4-24'te verilmiştir. 5'DFUR'un plazma farmakokinetiğine ilişkin elde edilen değerler Tablo 4-7'de bulunmaktadır.



**Şekil 4-24:** C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFUR'a ait plazma kapesitabin  $t_{1/2}$  değerleri.

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). 1-yönlü ANOVA'ya takiben Tukey post-test uygulanmıştır (\*p<0,05).

**Tablo 4-7:** 5'DFUR'un plazma farmakokinetiğine ilişkin bulgular.

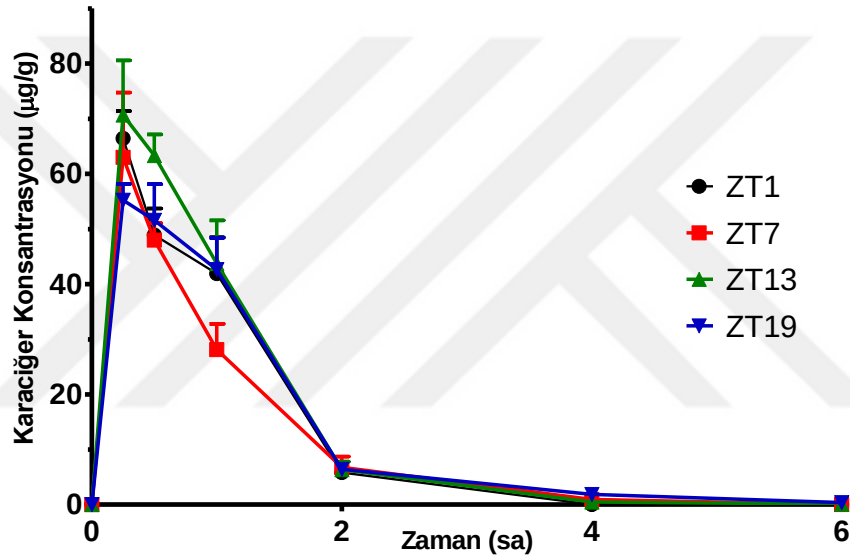
|                                         | ZT1              | ZT7              | ZT13             | ZT19             |
|-----------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <b>AUC<sub>0-6sa</sub> (µg.sa/ml)</b>   | 16,33 $\pm$ 2,68 | 20,05 $\pm$ 4,39 | 8,54 $\pm$ 1,44  | 7,98 $\pm$ 1,40  |
| <b>AUC<sub>0-∞</sub> (µg.sa/ml)</b>     | 16,69 $\pm$ 2,74 | 20,30 $\pm$ 4,39 | 8,98 $\pm$ 1,51  | 9,13 $\pm$ 2,13  |
| <b>C<sub>maks</sub> (µg/ml)</b>         | 10,67 $\pm$ 1,42 | 16,02 $\pm$ 3,47 | 4,984 $\pm$ 0,35 | 3,768 $\pm$ 0,43 |
| <b>t<sub>maks</sub> (sa)</b>            | 0,5              | 0,5              | 0,5              | 0,5              |
| <b>t<sub>1/2</sub> (sa)</b>             | 1,01 $\pm$ 0,01  | 1,02 $\pm$ 0,07  | 1,29 $\pm$ 0,05  | 1,63 $\pm$ 0,23  |
| <b>k<sub>el</sub> (sa<sup>-1</sup>)</b> | 0,68 $\pm$ 0,00  | 0,69 $\pm$ 0,04  | 0,54 $\pm$ 0,02  | 0,45 $\pm$ 0,05  |

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için).

#### 4.2.4. 5'DFCR ve 5'DFUR Metabolitlerinin Karaciğerdeki Kronofarmakokinetiğinin Değerlendirilmesi

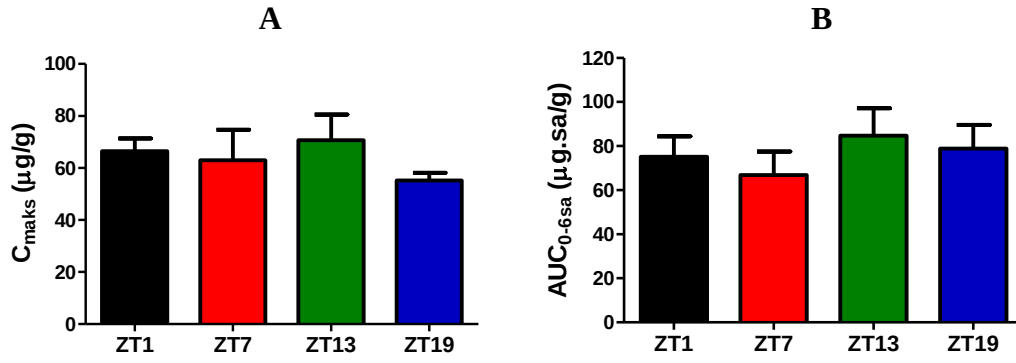
C57BL/6J soyu erkek farelere, ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan kapesitabin uygulanması sonucunda oluşan 5'DFCR ve 5'DFUR metabolitlerinin karaciğer dokusundaki farmakokinetik profili değerlendirilmiştir.

Kapesitabin, karaciğer dokusunda da plazmaya benzer bir farmakokinetik profil izlemiş ve hızla 5'DFCR ile 5'DFUR'ye metabolize olmuştur. 5'DFCR metabolitine ait karaciğer konsantrasyon-zaman grafiği kullanılarak elde edilen ortalama  $C_{maks}$  ve ortalama  $AUC_{0-6sa}$  değerleri, ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 grupları arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir. ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFCR karaciğer konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 4-25'te,  $C_{maks}$  ve ortalama  $AUC_{0-6sa}$  değerlerinin karşılaştırıldığı grafikler Şekil 4-26'da verilmiştir.



**Şekil 4-25: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFCR metabolitine ait karaciğer konsantrasyon-zaman grafiği.**

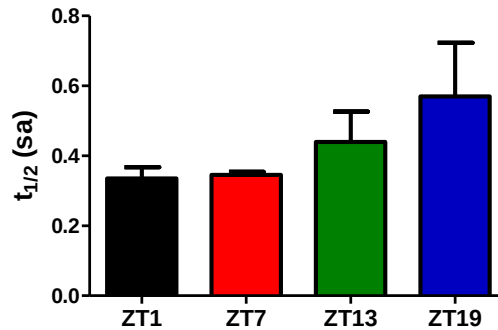
Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için).



**Şekil 4-26: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFCR metabolitine ait karaciğer  $C_{maks}$  (A) ve  $AUC_{0-6sa}$  (B) değerleri.**

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). 1-yönlü ANOVA'yı takiben Tukey post-test uygulanmıştır.

C57BL/6J soyu erkek farelere oral yoldan verilen kapesitabin, karaciğer dokusunda da plazmaya benzer bir biçimde ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 gruplarının tümünde kısa süre içinde 5'DFCR'ye metabolize olmuştur. ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanmasını takiben karaciğer dokusunda elde edilen 5'DFCR'ye ait  $t_{maks}$  değeri, tüm gruplar için 0,25 saat olarak bulunmuştur. ZT19 grubuna ait ortalama  $t_{1/2}$  değeri, ZT1 ve ZT7 gruplarıyla kıyaslandığında sırasıyla 1,63 ve 1,68 kat uzundur. ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFCR'nin karaciğer dokusundaki  $t_{1/2}$  değerleri Şekil 4-27'de verilmiştir. 5'DFCR'nin karaciğer farmakokinetiğine ilişkin veriler, Tablo 4-8'de verilmiştir.



**Şekil 4-27: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFCR'ye ait karaciğer  $t_{1/2}$  değerleri.**

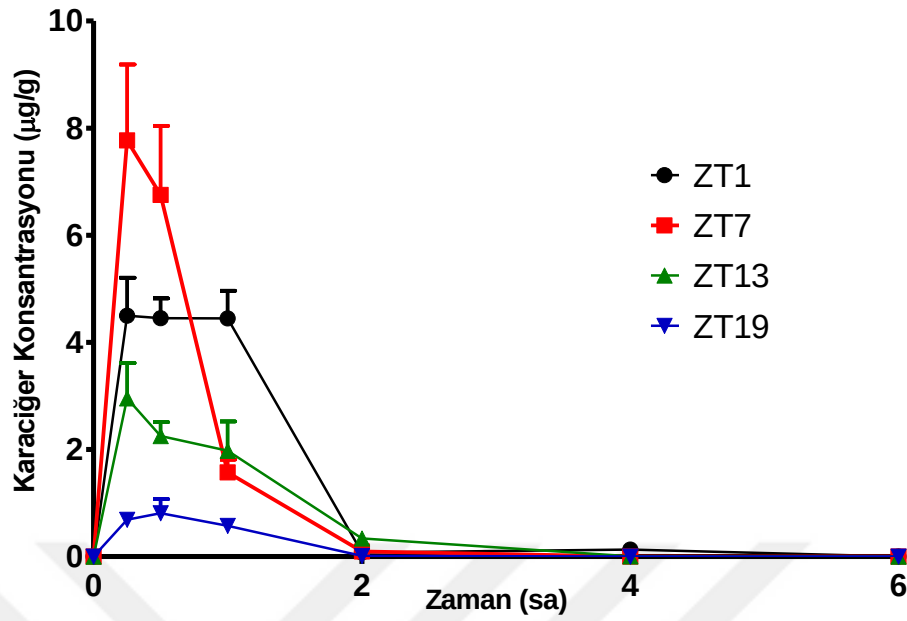
Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). 1-yönlü ANOVA'yı takiben Tukey post-test uygulanmıştır.

**Tablo 4-8: 5'DFCR'nin karaciğerdeki farmakokinetiğine ilişkin bulgular.**

|                                         | <b>ZT1</b>   | <b>ZT7</b>    | <b>ZT13</b>   | <b>ZT19</b>   |
|-----------------------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>AUC<sub>0-6sa</sub> (µg.sa/g)</b>    | 75,20 ± 9,25 | 66,81 ± 10,71 | 84,80 ± 12,40 | 78,86 ± 10,81 |
| <b>AUC<sub>0-∞</sub> (µg.sa/g)</b>      | 75,20 ± 9,25 | 66,81 ± 10,71 | 84,89 ± 12,63 | 79,43 ± 11,2  |
| <b>C<sub>maks</sub> (µg/g)</b>          | 66,45 ± 4,94 | 63,00 ± 11,74 | 70,67 ± 9,90  | 55,24 ± 2,92  |
| <b>t<sub>maks</sub> (sa)</b>            | 0,25         | 0,25          | 0,25          | 0,25          |
| <b>t<sub>1/2</sub> (sa)</b>             | 0,34 ± 0,03  | 0,35 ± 0,01   | 0,44 ± 0,09   | 0,57 ± 0,15   |
| <b>k<sub>el</sub> (sa<sup>-1</sup>)</b> | 2,118 ± 0,15 | 2,008 ± 0,05  | 1,801 ± 0,30  | 1,565 ± 0,33  |

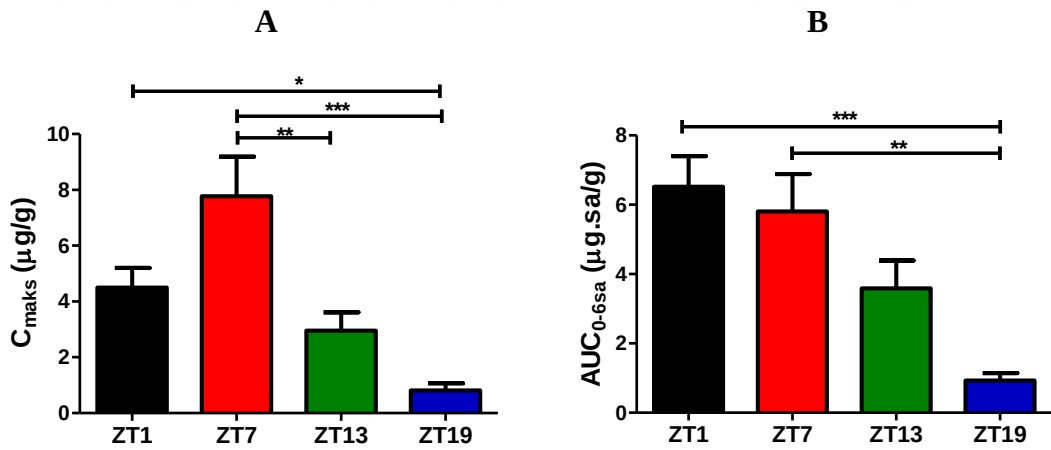
Sonuçlar, ortalama ± SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için).

ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanana farelerde, 5'DFUR metabolitine ait karaciğer konsantrasyon-zaman grafiği değerlendirildiğinde, ZT1 ve ZT7 gruplarına ait ortalama AUC<sub>0-6sa</sub> değerleri ZT19 grubuna göre sırasıyla 7 (\*\*p<0,001) ve 6,24 (\*\*p<0,01) kat fazla bulunmuştur. ZT13 grubuna ait ortalama AUC<sub>0-6sa</sub> değeri ZT19 grubuna göre 3,86 kat fazla bulunmuştur. Karaciğer konsantrasyon zaman grafiğinden elde edilen 5'DFUR C<sub>maks</sub> değerleri karşılaştırıldığında, ZT1 grubuna ait ortalama C<sub>maks</sub> değeri, ZT13 ve ZT19 gruplarına kıyasla sırasıyla 1,53 (p>0,05) ve 5,56 (\*p<0,05) kat fazla bulunmuştur. ZT7 grubuna ait ortalama C<sub>maks</sub> değeri, ZT13 ve ZT19 gruplarına kıyasla sırasıyla 2,63 (\*\*p<0,01) ve 9,59 (\*\*p<0,001) kat fazladır. ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFUR metabolitine ait karaciğer konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 4-28'de, C<sub>maks</sub> ve AUC<sub>0-6sa</sub> değerlerini içeren grafikler ise Şekil 4-29'da gösterilmiştir.



**Şekil 4-28:** C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFUR metabolitine ait karaciğer konsantrasyon-zaman grafiği.

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için).

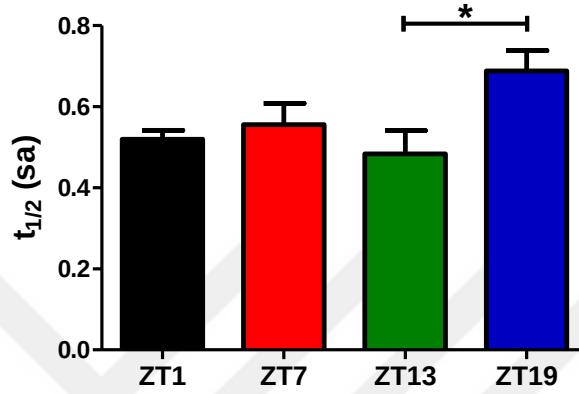


**Şekil 4-29:** C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFUR metabolitine ait karaciğer  $C_{maks}$  (A) ve  $AUC_{0-6sa}$  (B) değerleri.

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). 1-yönlü ANOVA'yı takiben Tukey post-test uygulanmıştır (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

Karaciğer dokusunda yapılan analizlerde, ZT1, ZT7 ve ZT13 gruplarında 5'DFUR'un  $t_{maks}$  değeri 0,25 saat iken, ZT19 grubunda  $t_{maks}$  0,5 saattir. ZT1, ZT7, ZT13

ve ZT19 grupları arasında 5'DFUR'a ait ortalama  $t_{1/2}$  değerleri karşılaştırıldığında, ZT19 grubuna ait  $t_{1/2}$  değeri ZT13 grubuna göre 1,44 kat daha uzun bulunmuştur (\* $p<0,05$ ). ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen, 5'DFUR'a ait karaciğer  $t_{1/2}$  değerleri Şekil 4-30'da, 5'DFUR'un karaciğer farmakokinetiğine ilişkin sayısal veriler ise Tablo 4-9'da verilmiştir.



**Şekil 4-30: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5'DFUR metabolitine ait karaciğer  $t_{1/2}$  değerleri.**

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). 1-yönlü ANOVA'yı takiben Tukey post-test uygulanmıştır (\* $p<0,05$ ).

**Tablo 4-9: 5'DFUR'un karaciğerdeki farmakokinetiğine ilişkin bulgular.**

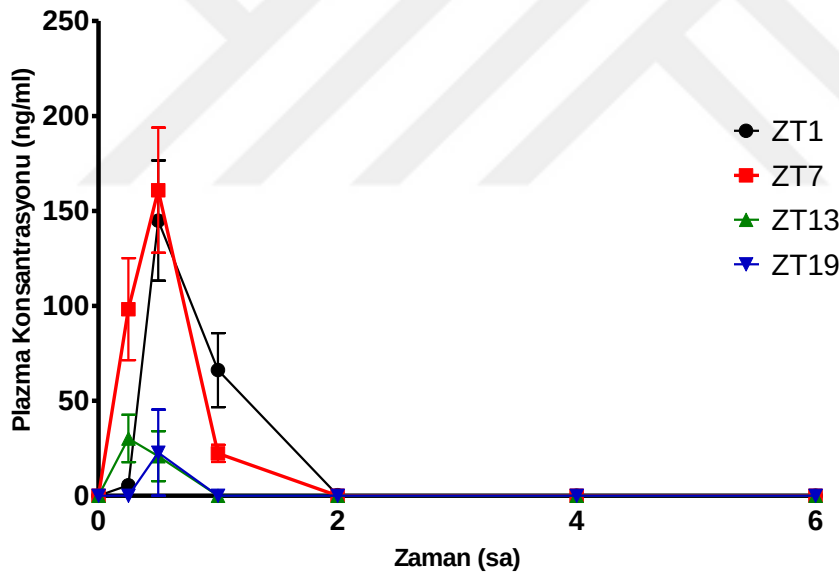
|                                         | ZT1             | ZT7             | ZT13            | ZT19            |
|-----------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>AUC<sub>0-6sa</sub> (µg.sa/g)</b>    | 6,51 $\pm$ 0,89 | 5,80 $\pm$ 1,09 | 3,59 $\pm$ 0,81 | 0,93 $\pm$ 0,21 |
| <b>AUC<sub>0-∞</sub> (µg.sa/g)</b>      | 6,51 $\pm$ 0,89 | 5,80 $\pm$ 1,09 | 3,59 $\pm$ 0,81 | 0,93 $\pm$ 0,21 |
| <b>C<sub>maks</sub> (µg/g)</b>          | 4,50 $\pm$ 0,71 | 7,77 $\pm$ 1,42 | 2,95 $\pm$ 0,66 | 0,81 $\pm$ 0,26 |
| <b>t<sub>maks</sub> (sa)</b>            | 0,25            | 0,25            | 0,25            | 0,5             |
| <b>t<sub>1/2</sub> (sa)</b>             | 0,52 $\pm$ 0,02 | 0,56 $\pm$ 0,05 | 0,48 $\pm$ 0,06 | 0,69 $\pm$ 0,05 |
| <b>k<sub>el</sub> (sa<sup>-1</sup>)</b> | 1,34 $\pm$ 0,06 | 1,30 $\pm$ 0,13 | 1,49 $\pm$ 0,13 | 1,03 $\pm$ 0,09 |

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için).

#### 4.2.5. 5-FU'nun Plazmadaki Kronofarmakokinetiğinin Değerlendirilmesi

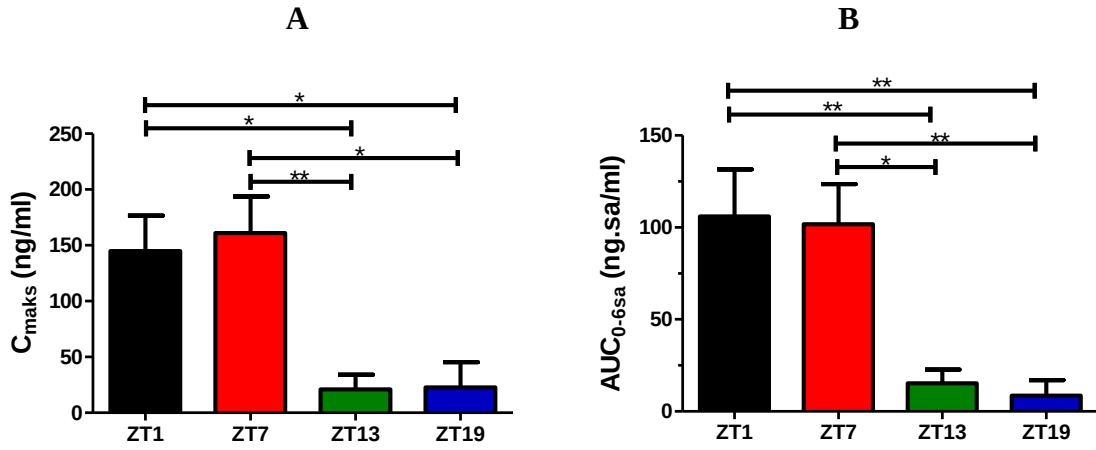
C57BL/6J soyu erkek farelere, ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan kapesitabin uygulandığında kapesitabinin metabolik dönüşümünde 5'DFUR'dan

sonraki basamakta oluşan 5-FU metabolitinin plazmadaki farmakokinetiği değerlendirilmiştir. Plazmadaki 5-FU düzeyleri birçok zaman noktasında tayin limitinin altında kalmıştır ve dedekte edilememiştir. Gruplar arasında 5-FU'ya ait plazma konsantrasyon-zaman grafiği kullanılarak elde edilen  $AUC_{0-6sa}$  değerleri kıyaslandığında, ortalama  $AUC_{0-6sa}$  ZT1 grubunda ZT13 ve ZT19 gruplarına göre sırasıyla 6,89 ve 12,44 kat fazla bulunmuştur (\*\* $p<0,01$ ). ZT7 grubuna ait ortalama  $AUC_{0-6sa}$  değeri, ZT13 ve ZT19 gruplarına göre sırasıyla 6,61 (\* $p<0,05$ ) ve 11,93 (\*\* $p<0,01$ ) kat fazladır.  $C_{maks}$  değerleri, ZT1 grubunda ZT13 ve ZT19 gruplarına göre sırasıyla 6,94 ve 6,38 kat fazla bulunmuştur (\* $p<0,05$ ). ZT7 grubuna ait  $C_{maks}$  değerleri, ZT13 ve ZT19 gruplarına göre sırasıyla 7,70 (\*\* $p<0,01$ ) ve 7,09 (\* $p<0,05$ ) kat fazladır. ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5-FU plazma konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 4-31'de,  $C_{maks}$  ve ortalama  $AUC_{0-6sa}$  değerlerine ilişkin grafikler Şekil 4-32'de verilmiştir.



**Şekil 4-31: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5-FU metabolitine ait plazma konsantrasyon-zaman grafiği.**

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için).



**Şekil 4-32: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5-FU metabolitine ait plazma  $C_{maks}$  (A) ve  $AUC_{0-6sa}$  (B) değerleri.**

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). 1-yönlü ANOVA'yı takiben Tukey post-test uygulanmıştır (\*p<0,05; \*\*p<0,01).

Plazmada yapılan 5-FU konsantrasyon tayini analizlerde, ZT1, ZT7 ve ZT19 gruplarında 5-FU'nun  $t_{maks}$  değeri 0,5 saat iken, ZT13 grubunda  $t_{maks}$  0,25 saat olarak belirlenmiştir. 5-FU'nun plazma farmakokinetiğine ilişkin veriler, Tablo 4-10'da bulunmaktadır.

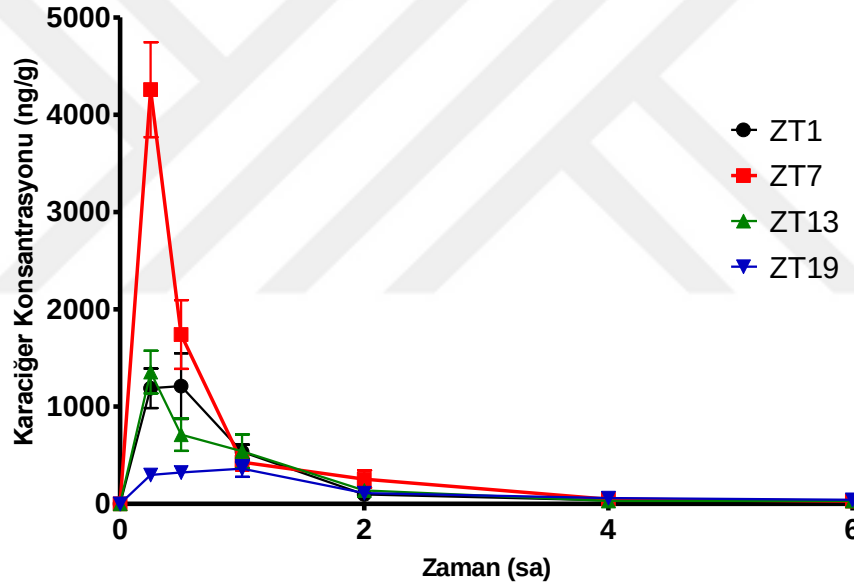
**Tablo 4-10: 5-FU'nun plazmadaki farmakokinetiğine ilişkin bulgular.**

|                             | ZT1               | ZT7               | ZT13              | ZT19              |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| $AUC_{0-6sa}$ (ng.sa/ml)    | 105,9 $\pm$ 25,58 | 101,6 $\pm$ 21,97 | 15,37 $\pm$ 7,46  | 8,51 $\pm$ 8,51   |
| $AUC_{0-\infty}$ (ng.sa/ml) | 105,9 $\pm$ 25,58 | 101,6 $\pm$ 21,97 | 15,37 $\pm$ 7,46  | 8,51 $\pm$ 8,51   |
| $C_{maks}$ (ng/ml)          | 144,9 $\pm$ 31,63 | 160,9 $\pm$ 32,92 | 20,89 $\pm$ 13,13 | 22,70 $\pm$ 22,70 |
| $t_{maks}$ (sa)             | 0,5               | 0,5               | 0,25              | 0,5               |
| $t_{1/2}$ (sa)              | 0,26 $\pm$ 0,01   | 0,28 $\pm$ 0,003  | 0,56 $\pm$ 0,06   | 0,47 $\pm$ 0,0    |

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için).

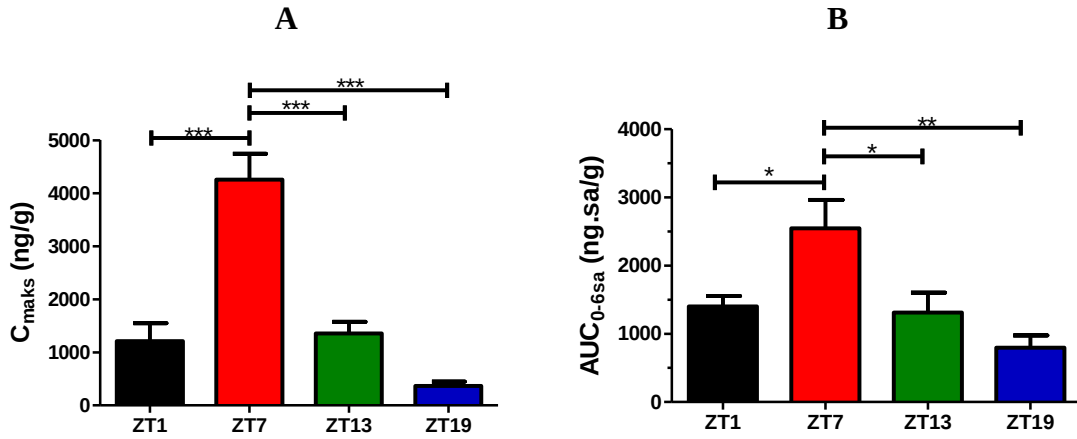
#### 4.2.6. 5-FU'nun Karaciğerdeki Kronofarmakokinetiğinin Değerlendirilmesi

ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanana farelerde, 5-FU metabolitine ait karaciğer konsantrasyon-zaman grafiği değerlendirildiğinde, ZT7 grubuna ait ortalama  $AUC_{0-6sa}$  değeri ZT1, ZT13 ve ZT19 gruplarına göre sırasıyla 1,82 (\* $p<0,05$ ), 1,94 (\* $p<0,05$ ) ve 3,20 (\*\* $p<0,01$ ) kat fazla bulunmuştur. Karaciğer konsantrasyon zaman grafiğinden elde edilen 5-FU  $C_{maks}$  değerleri karşılaştırıldığında, ZT7 grubuna ait ortalama  $C_{maks}$  değeri, ZT1, ZT13 ve ZT19 gruplarına kıyasla sırasıyla 3,52, 3,14 ve 11,73 kat fazladır (\*\* $p<0,001$ ). ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5-FU metabolitine ait karaciğer konsantrasyon-zaman grafiği Şekil 4-33'te,  $C_{maks}$  ve  $AUC_{0-6sa}$  değerlerini içeren grafikler ise Şekil 4-34'te gösterilmiştir.



Şekil 4-33: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5-FU metabolitine ait karaciğer konsantrasyon-zaman grafiği.

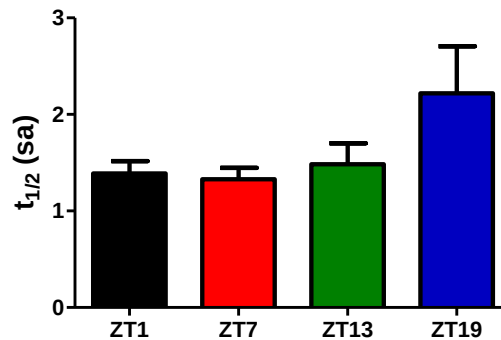
Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için).



**Şekil 4-34: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5-FU metabolitine ait karaciğer C<sub>max</sub> (A) ve AUC<sub>0-6sa</sub> (B) değerleri.**

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). 1-yönlü ANOVA'yı takiben Tukey post-test uygulanmıştır (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001).

Karaciğer dokusunda yapılan analizlerde, 5-FU'ya ait ortalama  $t_{max}$  değeri ZT1 grubunda 0,5 saat, ZT7 ve ZT13 gruplarında 0,25 saat, ZT19 grubunda ise 1 saattir. ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 grupları arasında 5-FU'ya ait ortalama  $t_{1/2}$  değerleri karşılaştırıldığında, ZT19 grubuna ait  $t_{1/2}$  değeri ZT1, ZT7 ve ZT13 gruplarına göre sırasıyla 1,6 kat, 1,7 kat ve 1,5 kat daha uzun bulunmuştur (p>0,05). ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen, 5-FU'ya ait karaciğer  $t_{1/2}$  değerleri Şekil 4-35'te, 5-FU'nun karaciğer farmakokinetiğine ilişkin sayısal veriler ise Tablo 4-11'de verilmiştir.



**Şekil 4-35: C57BL/6J soyu erkek farelere ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında oral yoldan 500 mg/kg kapesitabin uygulanmasını takiben elde edilen 5-FU metabolitine ait karaciğer  $t_{1/2}$  değerleri.**

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). 1-yönlü ANOVA'yı takiben Tukey post-test uygulanmıştır.

**Tablo 4-11: 5-FU'nun karaciğerdeki farmakokinetiğine ilişkin bulgular.**

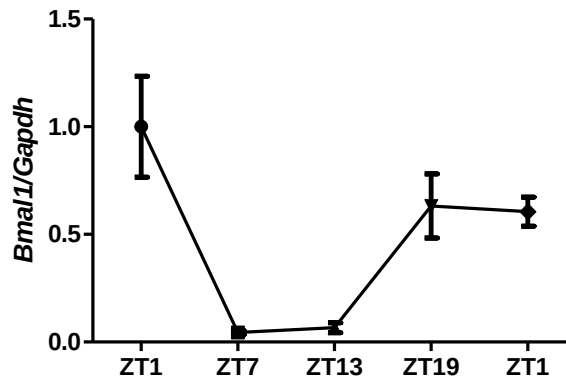
|                                         | ZT1          | ZT7          | ZT13         | ZT19          |
|-----------------------------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| <b>AUC<sub>0-6sa</sub> (ng.sa/g)</b>    | 1402 ± 153,1 | 2548 ± 417,8 | 1313 ± 292,8 | 797,4 ± 181,0 |
| <b>AUC<sub>0-∞</sub> (ng.sa/g)</b>      | 1460 ± 151,0 | 2603 ± 417,0 | 1377 ± 288,6 | 920,5 ± 178,4 |
| <b>C<sub>maks</sub> (ng/g)</b>          | 1210 ± 337,8 | 4258 ± 487,5 | 1355 ± 219,1 | 362,9 ± 84,50 |
| <b>t<sub>maks</sub> (sa)</b>            | 0,5          | 0,25         | 0,25         | 1             |
| <b>t<sub>1/2</sub> (sa)</b>             | 1,39 ± 0,12  | 1,33 ± 0,12  | 1,48 ± 0,22  | 2,22 ± 0,49   |
| <b>k<sub>el</sub> (sa<sup>-1</sup>)</b> | 0,51 ± 0,04  | 0,54 ± 0,04  | 0,51 ± 0,07  | 0,36 ± 0,05   |

Sonuçlar, ortalama ± SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için).

### 4.3. Moleküler Çalışma Sonuçları

#### 4.3.1. Sirkadiyan Saat Genlerinden *Bmal1* Ekspresyonlarındaki Zamana Bağlı Değişikliklerin Değerlendirilmesi

C57BL/6J soyu erkek farelerden ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokuları ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinde, ana sirkadiyan saat genlerinden olan *Bmal1*'in mRNA ekspresyonunda zamana bağlı anlamlı değişiklikler görülmüştür. *Bmal1* ekspresyonlarında görülen ritmik değişikliklerin istatistiksel anlamlılığı, Cosinor analizi ile değerlendirilmiştir (\*p<0,0001). ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularına ait *Bmal1* mRNA düzeyleri Şekil 4-36'da gösterilmiştir.

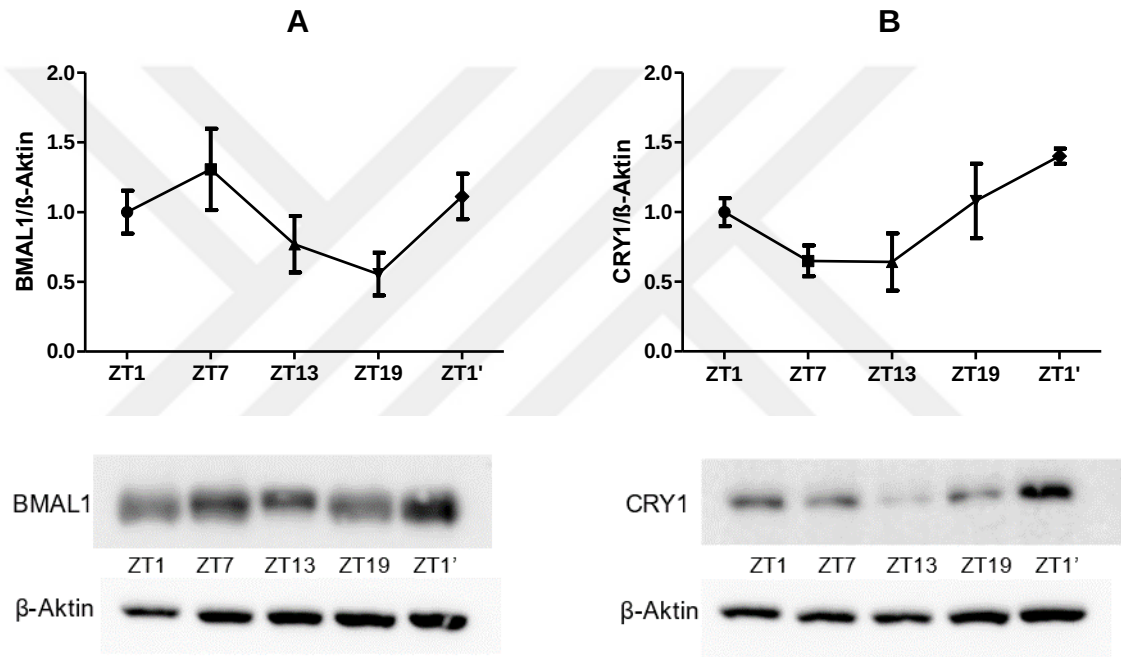


**Şekil 4-36: C57BL/6J soyu erkek farelerde ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularında *Bmal1* mRNA düzeyleri.**

Sonuçlar, ortalama ± SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). Cosinor analizi uygulanmıştır (\*p<0,0001).

#### 4.3.2. Sirkadiyan Saat Proteinlerinden BMAL1 ve CRY1 Düzeylerindeki Zamana Bağlı Değişikliklerin Değerlendirilmesi

C57BL/6J soyu erkek farelerden ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokuları ile gerçekleştirilen Western Blot analizlerinde, ana sirkadiyan saat proteinlerinden olan BMAL1 ve CRY1'in protein ekspresyonlarında zamana bağlı anlamlı değişiklikler görülmüştür. BMAL1 ve CRY1 protein ekspresyonlarında görülen ritmik değişikliklerin istatistiksel anlamlılığı, Cosinor analizi ile değerlendirilmiştir (\* $p < 0,05$ ). ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularına ait BMAL1 (A) ve CRY1 (B) protein düzeyleri Şekil 4-37'de gösterilmiştir.



**Şekil 4-37: C57BL/6J soyu erkek farelerde ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularında BMAL1 ve CRY1 protein düzeyleri.**

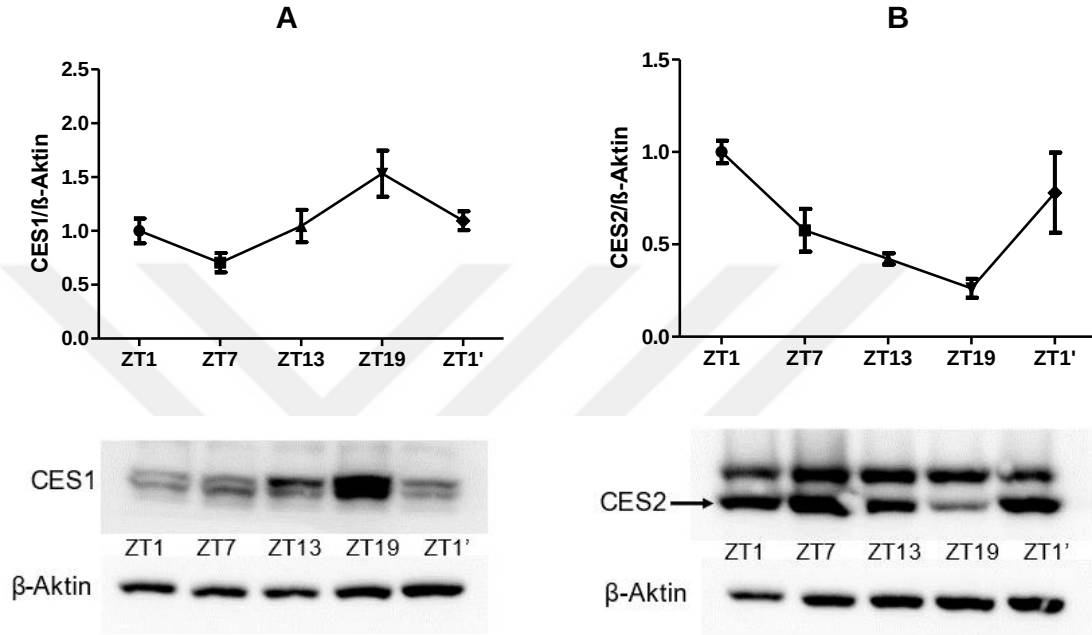
Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). Cosinor analizi uygulanmıştır (\* $p < 0,05$ ).

#### 4.3.3. Kapesitabinin Metabolizmasında Rol Oynayan Enzimlerin Protein Düzeylerinde Zamana Bağlı Değişikliklerin Değerlendirilmesi

##### 4.3.3.1. CES1 ve CES2 Protein Düzeylerinde Zamana Bağlı Değişikliklerin Değerlendirilmesi

ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında farelerden izole edilen karaciğer dokuları ile gerçekleştirilen Western Blot analizlerinde, kapesitabinin 5'DFCR'ye metabolize edilmesinde görev alan CES1 ve CES2'nin protein ekspresyonları

değerlendirilmiştir. CES2 protein ekspresyonunda zamana bağlı olarak anlamlı ritmik değişiklikler görülmüştür (Cosinor analizi;  $**p<0,01$ ). CES1 protein ekspresyonunda da sirkadiyan ritim görülmüştür (Cosinor analizi;  $***p<0,001$ ). ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularındaki CES1 (A) ve CES2 (B) protein düzeyleri Şekil 4-38’de gösterilmiştir.

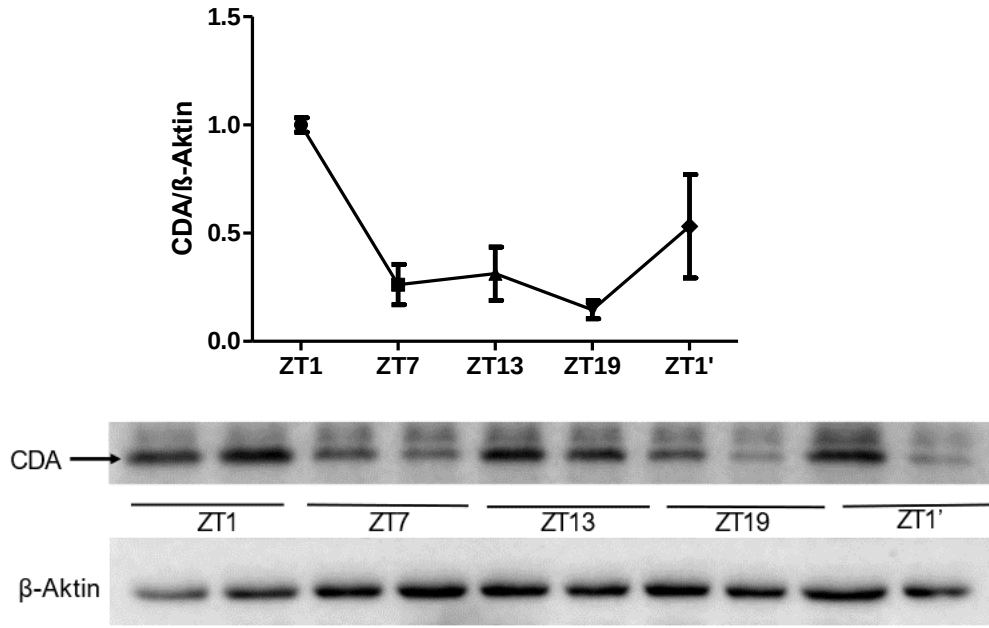


**Şekil 4-38: C57BL/6J soyu erkek farelerde ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularında CES1 ve CES2 protein düzeyleri.**

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). Cosinor analizi uygulanmıştır (CES1:  $***p<0,001$ ; CES2:  $**p<0,01$ ).

#### 4.3.3.2. CDA Protein Düzeylerinde Zamana Bağlı Değişikliklerin Değerlendirilmesi

C57BL/6J soyu erkek farelerin karaciğer dokularında, 5'DFCR'nin 5'DFUR'ye dönüştürülmesinde görev alan CDA proteininin ekspresyonunda zamana bağlı olarak anlamlı ritmik değişiklikler görülmüştür (Cosinor analizi;  $*p<0,05$ ). ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularındaki CDA protein düzeyleri Şekil 4-39'da gösterilmiştir.

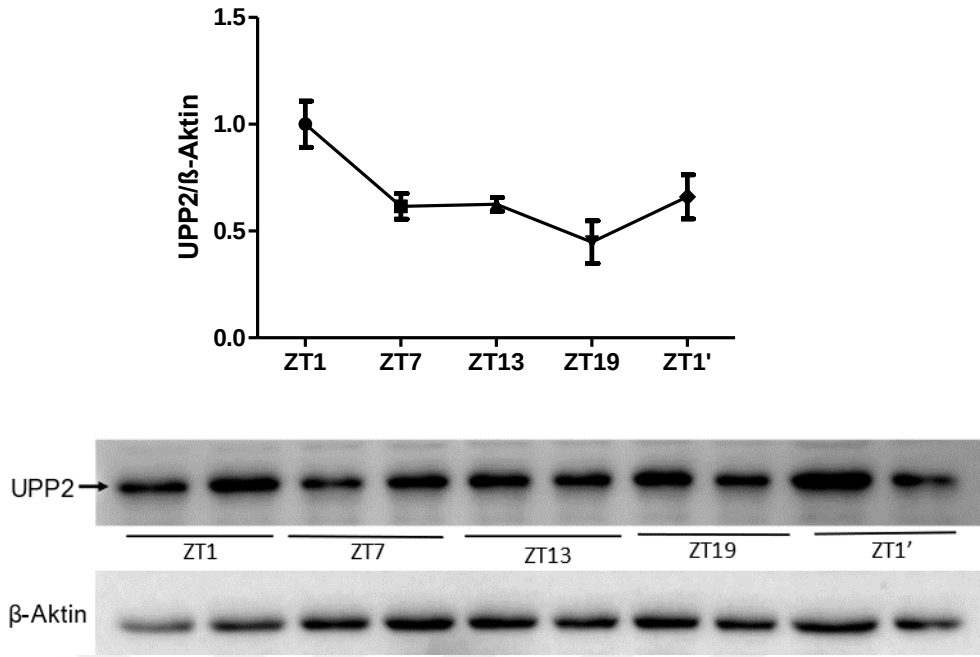


**Şekil 4-39: C57BL/6J soyu erkek farelerde ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularında CDA protein düzeyleri.**

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). Cosinor analizi uygulanmıştır (\*p<0,05).

#### **4.3.3.3. UPP2 Protein Düzeylerinde Zamana Bağlı Değişikliklerin Değerlendirilmesi**

C57BL/6J soyu erkek farelerin karaciğer dokularında, 5'DFUR'nin 5-FU'ya dönüştürülmesinde görev alan UPP2 proteininin ekspresyonunda zamana bağlı olarak anlamlı ritmik değişiklikler görüşmüştür (Cosinor analizi; \*p<0,05). ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularındaki UPP2 protein düzeyleri Şekil 4-40'da gösterilmiştir.

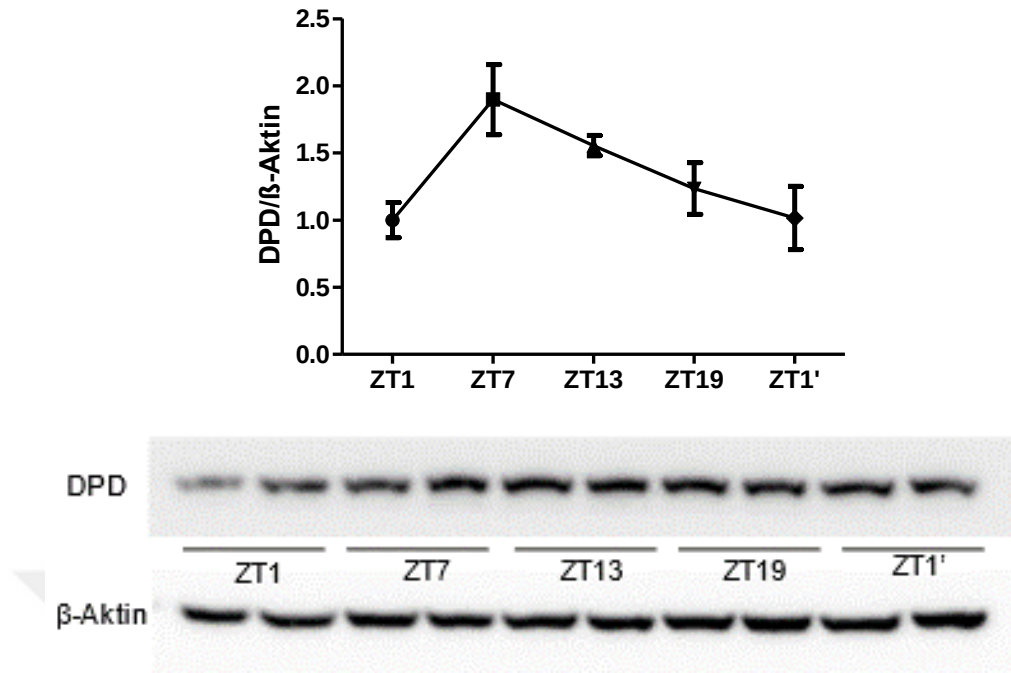


**Şekil 4-40: C57BL/6J soyu erkek farelerde ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularında UPP2 protein düzeyleri.**

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). Cosinor analizi uygulanmıştır (\*p<0,05).

#### 4.3.3.4. DPD Protein Düzeylerinde Zamana Bağlı Değişikliklerin Değerlendirilmesi

C57BL/6J soyu erkek farelerin karaciğer dokularında, 5-FU'nun katabolize edilmesinde görev alan DPD proteininin ekspresyonunda zamana bağlı olarak anlamlı değişiklik görülmüştür (Cosinor analizi; \*\*p<0,01). ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularındaki DPD protein düzeyleri Şekil 4-41'de gösterilmiştir.



**Şekil 4-41: C57BL/6J soyu erkek farelerde ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularında DPD protein düzeyleri.**

Sonuçlar, ortalama  $\pm$  SEM şeklinde ifade edilmiştir (n=5/her bir zaman noktası için). Cosinor analizi uygulanmıştır (\*\*p<0,01)

Ana sirkadiyan saat proteinlerinden ikisi olan BMAL1 ile CRY1'in ve kapesitabinin metabolizmasında görev alan CES1, CES2, CDA, UPP2 ile DPD'nin, ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarındaki protein ekspresyonlarına ilişkin olarak cosinor analizi ile elde edilen veriler Tablo 4-12'de verilmiştir.

**Tablo 4-12: C57BL/6J soyu erkek farelerde BMAL1, CRY1, CES1, CES2, CDA, UPP2 ve DPD proteinlerinin ekspresyonlarındaki sirkadiyan değişiklikler.**

| Protein | P değeri | Mesor | Amplitüd | Akrofaz |
|---------|----------|-------|----------|---------|
| BMAL1   | 0,02     | 0,92  | 0,40     | 5,64    |
| CRY1    | 0,01     | 0,90  | 0,36     | 22,55   |
| CES1    | 0,001    | 1,08  | 0,41     | 18,91   |
| CES2    | 0,008    | 0,54  | 0,28     | 3,27    |
| CDA     | 0,04     | 0,60  | 0,29     | 2,89    |
| UPP2    | 0,03     | 0,64  | 0,19     | 2,76    |
| DPD     | 0,004    | 1,37  | 0,46     | 9,63    |

## 5. TARTIŞMA

Sirkadiyan zamanlama sisteminin kontrolünde, memelilerde birçok fizyolojik fonksiyon zamana bağlı ritmik değişiklikler göstermektedir (Smolensky & Peppas, 2007). Her gün başta aydınlık-karanlık döngüsü olmak üzere çevresel döngüler tarafından senkronize edilen sirkadiyan ritimler, insanlarda ve kemirgenlerde çeşitli fizyolojik fonksiyonların pik ve çukur zamanlarının tahmin edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Sirkadiyan saatin kontrolünde olan absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon süreçleri, ilaç hedefleri, hücre döngüsü, DNA tamiri, apoptoz gibi fonksiyonlar antikanser ilaç farmakolojisinde uygulama zamanına bağlı değişikliklere neden olmaktadır (Lévi ve ark., 2010).

Kronoterapi ile antikanser ilaçların sirkadiyan ritimler dikkate alınarak uygulanması gelişmekte olan bir alandır. Klinikte yaygın olarak kullanılan çok sayıda antikanser ilaç için uygulama zamanının ilaç tolere edilebilirliğine etkisinin anlamlı düzeyde olduğu gösterilmiştir (Hill ve ark., 2020; Innominato ve ark., 2010). Çeşitli klinik çalışmalarda elde edilen sonuçlar, kronoterapiyle uygulanan antikanser ilaçların konvansiyonel tedaviye kıyasla 5 kata kadar daha iyi tolere edildiğini ve yaklaşık iki kat daha fazla etkililik gösterdiğini ortaya koymuştur (N. Ozturk ve ark., 2017). İlaç tolere edilebilirliğinde ve etkililiğinde görülen sirkadiyan ritimler, ilaç ve metabolitlerine maruziyetteki tekrarlayıcı değişiklikleri ifade eden “kronofarmakokinetik” ile ilaç hedeflerindeki ritmik değişiklikleri ele alan “kronofarmakodinamik” alanlarında yapılan detaylı araştırmalara kaynaklık etmiştir (Ballesta ve ark., 2017).

Son yıllarda gerçekleştirilen çeşitli kronoterapi çalışmalarında, kapesitabinin uygulama zamanındaki değişikliklerin kapesitabinin etkinliğinde ve toksisitesinde bir takım değişikliklere neden olabildiği gösterilmiştir (Akgun ve ark., 2014; Bajetta ve ark., 2014; Pilancı ve ark., 2016; Roosendaal ve ark., 2020; Santini ve ark., 2007). Akgun ve ark. (2014), Bajetta ve ark. (2014) ile Santini ve ark. (2007) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda toksisite ve/veya etkililik değerlendirilmiş olup, kapesitabin ve metabolitlerinin farmakokinetiğine ilişkin parametrelerde uygulama zamanına bağlı oluşabilecek değişiklikler incelenmemiştir. Pilancı ve ark. (2016) tarafından yapılmış çalışmada, 30 metastatik kolorektal kanser hastasına oksaliptatin ( $30 \text{ mg/m}^2$ , 1.gün) ile beraber kronomodüle edilmiş oral kapesitabin ( $2000 \text{ mg/m}^2/\text{gün}$ ,

14 gün boyunca, her 21 günde) tedavisi uygulanmıştır. Çalışmada tercih edilen kronomodüle tedavi rejimine göre, kapesitabinin %50'si sabah 08:00'da %50'si ise öğlen 12:00'da verilmiştir ve tedavinin birinci gününde 5 hastadan alınan kan örnekleriyle farmakokinetik değerlendirme yapılmıştır. 08:00 ve 12:00 gruplarında  $AUC_{0-4sa}$  değerleri sırasıyla  $3,70 \pm 0,70$  ve  $2,30 \pm 0,72$   $\mu g.sa/ml$  olarak bulunmuştur ( $p=0,06$ ). Değerlendirilen farmakokinetik parametreler ( $AUC_{0-4sa}$ ,  $C_{maks}$ ,  $t_{maks}$ ,  $t_{1/2}$ ) açısından gruplar arasında anlamlı bir fark gösterilmemiştir (Pilancı ve ark., 2016). Bahsedilen çalışmada kapesitabinin plazma düzeylerindeki sirkadiyan değişiklikler tam olarak aydınlatılmamakla birlikte sabah uygulama ile öğlen uygulama sonrasında elde edilen plazma seviyeleri ve kapesitabine maruziyet ( $AUC_{0-4sa}$ ) farklılık göstermektedir. Dolayısıyla zamana bağlı farmakokinetik farklılıklar sınırlı sayıda hasta üzerinde ortaya konmuştur. Ancak bu gün içi farklılıkların mekanizması konusunda, bahsedilen klinik çalışmada herhangi bir veri ortaya konmamıştır. Bu verilerden yola çıkılarak kapesitabinin kronofarmakokinetiğine ilişkin kapsamlı bir preklinik çalışma yapmak gerekli görülmüştür.

Roosendaal ve ark. (2020) tarafından yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışmada, ileri evre solid tümör taşıyan 25 adet hastaya, kapesitabin oral yol ile kronomodüle şekilde (dozun 3/8'i 09:00'da ve 5/8'i 24:00'da) aralıksız olarak (21 gün boyunca, her 21 günde) uygulanmıştır. Kapesitabin, 1000, 1275, 1600, 2000 ve 2550  $mg/m^2/gün$  olarak basamaklı şekilde artan dozlarda uygulanmış ve her doz seviyesi için tedavinin 7. ve 8. günlerinde hastalardan alınan kan örnekleriyle farmakokinetik analizler yapılmıştır. Kapesitabin, 5'DFCR, 5'DFUR ve 5-FU'nun plazma  $AUC_{0-5sa}$  değerleri doza göre normalize edilerek kıyaslandığında 09:00 ve 24:00 saatleri arasında  $AUC_{0-5sa}$  değerleri açısından anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bahsedilen çalışmada kapesitabin, 5'DFCR, 5'DFUR ve 5-FU'nun plazma farmakokinetiğinde sirkadiyan ritim görülmediği rapor edilmiştir. Çalışmada kapesitabin tedavisi alan hastaların periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMK) DPD enzimi aktivitesinin sirkadiyan ritim gösterdiği ortaya konmuştur (Roosendaal ve ark., 2020). Fakat sonuçta farmakokinetik parametreler açısından yalnızca iki zaman noktası karşılaştırılmış ve farmakokinetik-farmakodinamik etkileşim yeterli şekilde açıklanamamıştır.

Klinik düzeyin yanı sıra preklinik düzeyde de kapesitabinin metabolizmasında görev alan enzimlerin sirkadiyan ritimleriyle kapesitabinin farmakokinetiğinin

ilişkilendirilmesi konusunda yeterli veri bulunmamaktadır. Deney hayvanlarında kapesitabinin farmakokinetiğindeki sirkadiyan değişiklikler ilk defa Kobuchi ve ark. (2018) tarafından Wistar soyu erkek sıçanlarda ortaya koyulmuştur. Bu çalışmada aç bırakılan sıçanlara, ZT5, ZT11 ya da ZT23 zamanlarında kapesitabin uygulanmış ve bunu takiben kapesitabin, 5'DFCR, 5'DFUR ve 5-FU'nun plazma düzeyleri analiz edilmiştir. Bu çalışmada kapesitabin ve metabolitlerinin farmakokinetiği sadece plazma düzeyinde ve yalnızca üç sirkadiyan zamanda incelenmiştir. Çalışmaya bakıldığında, kapesitabinin kronofarmakokinetiğini tam olarak ortaya koymak için kapesitabinin plazma farmakokinetiğinin farklı sirkadiyan zamanlarda da değerlendirilmesi gerekli gözükmemektedir. Ayrıca literatürde, karaciğer dokusunda kapesitabinin sirkadiyan ritmini gösteren bir veri bulunmamaktadır.

Çalışmalarımızın başında, farelerin ışığa senkronizasyonunu teyit etmek amacıyla, aydınlık-karanlık döngüsü değiştirilen C57BL/6J soyu erkek farelerden ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında izole edilen karaciğer dokularında ana sirkadiyan saat proteinlerinden olan BMAL1 ve CRY1'in ekspresyonları zamana bağlı olarak değerlendirilmiştir. Yapılan cosinor analizi sonucunda BMAL1 ve CRY1'in sirkadiyan ritim gösterdiği görülmüş (\* $p < 0,05$ ) ve farelerin uygun şekilde senkronize edilmiş olduğu belirlenmiştir. Yakın zamanda Lu ve ark. (2020) tarafından C57BL/6 soyu yabanıl tip farelerin karaciğer dokusunda yapılan Western Blot analizlerinde BMAL1 protein düzeylerine ait pik zamanı ZT8, çukur zamanı ZT20 olarak bulunmuştur. Wang ve ark. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada ise, C57BL/6 soyu erkek farelerin karaciğer dokusunda yapılan protein analizlerinde BMAL1'in ZT16-ZT20 zamanlarında çukur değerlerini gösterdiği belirlenmiştir. Bilindiği gibi, CRY1 proteini sirkadiyan döngünün başında (ZT0) yüksek düzeydedir, aydınlık faz boyunca degrade olan CRY1'in düzeyi düşmektedir. Karanlık dönemin sonunda ise CRY1 seviyeleri yüksektir (Ye ve ark., 2014). Bizim çalışmamıza ait sonuçlarda da literatür ile oldukça benzer şekilde, BMAL1'in pik zamanı ZT7, çukur zamanı ZT19; CRY1'in pik zamanı ZT1, çukur zamanı ise ZT13 olarak belirlenmiştir. Ayrıca daha önce kronofarmakokinetik çalışma birimimizde, farelerin senkronizasyonunu teyit etmek için vücut sıcaklığı ritimleri değerlendirilmiştir. Günde 4 defa ölçüm yapılan farelerin ortalama vücut sıcaklıklarının farelerin aktivite periyodu olan karanlık fazda, dinlenme periyodu olan aydınlık faza göre daha fazla olduğu ve günlük vücut sıcaklığı değişikliklerinin sirkadiyan ritim izlediği (Fourier analizi,  $p < 0,0001$ ) gösterilmiştir (Öztürk, 2019).

Çalışmamızda, 4 farklı sirkadiyan zamanda oral yol ile 500 mg/kg kapesitabin uygulanan C57BL/6J soyu erkek farelerde kapesitabinin ve metabolitlerinin farmakokinetiğine ilişkin veriler incelendiğinde, uygulama zamanına bağlı anlamlı farmakokinetik değişiklikler görülmüştür. Kapesitabine ait ortalama plazma  $C_{maks}$  değerleri ZT1 grubunda ZT13 ve ZT19 gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (\* $p<0,05$ ). Ortalama plazma  $AUC_{0-6sa}$  değerleri de ZT1 (33,64  $\mu g.sa/ml$ ) ve ZT7 (30,63  $\mu g.sa/ml$ ) gruplarında ZT13 (19,03  $\mu g.sa/ml$ ) ve ZT19 (12,88  $\mu g.sa/ml$ ) gruplarına göre daha yüksektir. Kapesitabinin plazmada  $t_{maks}$  değeri ise tüm gruplarda aynıdır. Kobuchi ve ark. (2018) tarafından sıçanlarda yapılan çalışmada, ZT5, ZT11, ZT23 zamanlarından kapesitabin uygulanması sonucunda plazmada  $C_{maks}$  ve  $AUC_{0-\infty}$  değerinin en yüksek olduğu grup ZT5, en düşük olduğu grup ise ZT11 olarak belirlenmiştir (\* $p<0,05$ ). Kapesitabin  $t_{maks}$  değerleri ise ZT5, ZT11, ZT23 grupları arasında farklılık göstermemiştir (Kobuchi ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda da benzer biçimde kapesitabinin plazma düzeylerinin farelerin aktivite zamanında dinlenme zamanına kıyasla daha düşük olduğu görülmektedir. Kapesitabine sistemik maruziyet açısından grupların sıralanması; ZT1>ZT7>ZT13>ZT19 biçimindedir. Kapesitabinin oral yol ile verilen bir ilaç olması nedeniyle absorpsiyon düzeyinde görülen değişikliklerin  $t_{maks}$  değerlerinde farklılığa neden olması beklenebilir. Mide kan akımı, gastrointestinal kanal motilitesi ve mide asiditesi gibi absorpsiyona ilişkin faktörlerin sirkadiyan ritim gösterdiği ve çoğu ilaç için absorpsiyonun aktivite döneminde daha fazla olduğu bilinmektedir (Musiek & Fitzgerald, 2013). Fakat kapesitabin için absorpsiyon çok hızlıdır ve gruplar arasında  $t_{maks}$  (0,25 saat) değerleri arasında bir fark oluşmamıştır. Metabolizma açısından, kapesitabinin karaciğerde CES enzimleri aracılığıyla hızlı bir biçimde 5'DFCR'ye metabolize olduğu bilinmektedir (Reigner ve ark., 2001). Ces izoformlarının birçoğu sirkadiyan ritim gösterir ve fare karaciğer dokusunda genellikle aktivite döneminde daha yüksek düzeylerde eksprese edilir (Y. K. J. Zhang ve ark., 2009). İnsanda plazmada CES1'in bulunmadığı kabul edilirken fare ve sıçan plazmasında CES1 yüksek düzeyde bulunmaktadır. Fare karaciğerinde ise CES1 ve CES2 enzimlerinin her ikisi de yüksek düzeyde bulunur (Di, 2018; S. Oda ve ark., 2015). CES1 ve CES2'nin kapesitabinin katabolize edilmesindeki katalitik aktivitelerinin benzer derecelerde olduğu in vitro enzim aktivite çalışmalarıyla belirlenmiştir (Quinney ve ark., 2005). Elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında kapesitabinin plazma düzeylerindeki zamana bağlı değişiklikler, CES1 protein

düzeyleriyle ilişkili gözükmemektedir. CES1'in pik yaptığı ZT19 zamanında plazmada kapesitabin en düşük düzeydedir. Kapesitabinin karaciğer farmakokinetiği değerlendirildiğinde,  $AUC_{0-6sa}$  değerleri ZT13 (32,75  $\mu g.sa/ml$ ) grubunda, ZT1 (20,12  $\mu g.sa/ml$ ), ZT7 (18,25  $\mu g.sa/ml$ ) ve ZT19 (16,93  $\mu g.sa/ml$ ) gruplarına göre daha yüksek bulunmuştur (\* $p>0,05$ ). Karaciğerde  $t_{maks}$  değerleri ZT13 grubunda 0,5 saat iken, ZT1, ZT7 ve ZT19 gruplarında 0,25 saattir. Karaciğerde plazmadan farklı olarak CES2 düzeyinin yüksek olması ve sirkadiyan ritim gösteren CES2'nin farelerin aktivite döneminde azalması karaciğer farmakokinetiğindeki bu farklılığın nedeni olabilir. Uygulanma zamanına bağlı olarak kapesitabinin plazma dağılım hacmi ve oral klirens değerlerinin de sirkadiyan değişiklikler gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen verilere bakıldığında,  $Vd/F$  ve  $CL/F$  değerleri ZT19 grubunda ZT1 ve ZT7 gruplarına göre anlamlı olarak fazladır ( $p<0,05$ ).  $Vd/F$  ve  $CL/F$  değerlerine ilişkin bahsedilen değişikliklerin, kapesitabinin metabolizmasını etkileyen sirkadiyan varyasyonlar sonucunda biyoyararlanım ve AUC değerlerinin de etkilenmesine bağlı olarak oluştuğu düşünülebilir. Klirens üzerinde etkili olan ve sirkadiyan ritim gösteren, karaciğer ve böbrek kan akımı, glomerüler filtrasyon hızı da farelerde aktivite döneminde artmaktadır (Koopman ve ark., 1989; Musiek & Fitzgerald, 2013). ZT13 ve ZT19 gruplarında, ZT1 ve ZT7 gruplarına göre klirens değerlerinin yüksek olması, karaciğer ve böbrek kan akımında artış ile de ilişkilendirilebilir.

Çalışmamızda, 500 mg/kg kapesitabin uygulanan erkek farelerde 5'DFCR metabolitinin plazma farmakokinetiğine ilişkin veriler değerlendirildiğinde, ortalama  $C_{maks}$  ve  $AUC_{0-6h}$  değerleri için gruplar arasında bir farklılık görülmemiştir, değerler birbirine oldukça yakındır ve sirkadiyan ritim göstermemektedir. 5'DFUR metaboliti ise farelerin dinlenme periyoduna denk gelen ZT1 ve ZT7 zamanlarında aktivite periyoduna göre plazmada daha yüksek düzeyde bulunmaktadır. 5'DFUR için ortalama plazma  $C_{maks}$  ve  $AUC_{0-6h}$  değerleri, ZT7 gruplarında ZT13 ve ZT19 gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (\*\* $p<0,01$ ). Kobuchi ve ark. (2018) tarafından sıçanlarda yapılan kronofarmakokinetik çalışmada, kapesitabin ve 5'DFCR'nin sirkadiyan ritmi aynı şemayı izlemiştir, yani  $C_{maks}$  ve  $AUC_{0-\infty}$  değerinin en yüksek olduğu grup ZT5, en düşük olduğu grup ise ZT11 olmuştur (\* $p<0,05$ ). 5'DFUR ise plazmada herhangi bir ritim göstermemiştir (Kobuchi ve ark., 2018). 5'DFCR'yi 5'DFUR'a metabolize eden CDA enziminin sıçan dokularında oldukça düşük düzeyde eksprese edildiği bilinmektedir. İnsanda ve farede ise CDA sıçanlara göre daha yüksek

düzyededir (Shindoh ve ark., 2006). Kobuchi ve ark., (2018) tarafından sıçanlarda yapılan çalışmayla kıyaslandığında, fareler üzerinde yapılan çalışmamızda, 5'DFCR ve 5'DFUR düzeylerinde görülen gün içi farklılıklar CDA ekspresyonundaki türe özgü değişimle açıklanabilir. Eliminasyona ilişkin parametreler değerlendirildiğinde 5'DFUR için  $t_{1/2}$ 'de uygulama zamanına bağlı değişiklikler tespit edilmiştir. ZT19 grubunda  $t_{1/2}$  değeri ZT1 ve ZT7 gruplarına göre anlamlı olarak daha fazladır (\* $p<0,05$ ). Karaciğer farmakokinetiği değerlendirildiğinde, 5'DFCR metaboliti için ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 grupları arasında farmakokinetik parametreler açısından ilaç uygulama zamanına bağlı bir farklılık görülmemiştir. 5'DFUR'un karaciğerdeki farmakokinetiğine ilişkin sirkadiyan değişiklikler plazma ile benzerdir ve farelerin dinlenme periyodunda karaciğerde daha yüksek 5'DFUR konsantrasyonları görülmüştür. 5'DFUR'a ait  $AUC_{0-6sa}$  değerleri açısından grupların sıralanması; ZT1>ZT7>ZT13>ZT19 biçiminde,  $C_{maks}$  değerleri açısından ise sıralama ZT7>ZT1>ZT13>ZT19 biçimindedir. Karaciğerden 5'DFUR eliminasyonuna ilişkin parametrelerden  $t_{1/2}$  değeri ZT19 grubunda ZT13 grubuna göre anlamlı olarak daha uzundur ( $p<0,05$ ).

Oral kapesitabin uygulanan C57BL/6J soyu erkek farelerde 5-FU'nun plazma farmakokinetiğine ilişkin veriler incelendiğinde, dinlenme dönemine karşılık gelen ZT1 ve ZT7 grupları ile aktivite dönemine karşılık gelen ZT13 ve ZT19 grupları arasında  $C_{maks}$  ve  $AUC_{0-6sa}$  değerleri açısından 6-12 kat farklılık görülmüştür. 5-FU'ya ait ortalama  $C_{maks}$  değerleri açısından grupların sıralanması, ZT7>ZT1>>ZT19>ZT13 biçimindedir. 5-FU'ya ilişkin ortalama  $AUC_{0-6sa}$  değerleri açısından ise gruplar ZT1>ZT7>>ZT13>ZT19 biçinde sıralanmaktadır. Oral kapesitabin uygulanan farelerde sistemik 5-FU maruziyeti çok düşük düzeyde olmuştur. Plazma 5-FU konsantrasyonları çoğu zaman noktasında tayin limitinin (3 ng/ml) altında kalmıştır. Kobuchi ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada, sıçanlara ZT5, ZT11 veya ZT23'te kapesitabin uygulanması sonucunda 5-FU'ya ait AUC değerleri ZT5'te en düşük düzeyde, ZT23'te ise en yüksek düzeyde olmuştur. 5'DFCR ve sonrasında oluşan metabolitlere ilişkin sirkadiyan ritimlerin fare ve sıçanda farklılık göstermesi, türler arasında metabolize edici enzim ekspresyonlarındaki farklılıklarla ilişkili olabilir. Kapesitabinin 5-FU'ya dönüşümündeki metabolik enzim aktivitelerine ilişkin farklılıklar, fare, sıçan ve insanlarda karşılaştırılmalı olarak gösterilmiştir (Shindoh ve ark., 2011). Ayrıca Kobuchi ve ark., (2018) tarafından sıçanlarda yapılan çalışmada, kapesitabin 12 saat açlığı takiben uygulanmıştır. Açlık-tokluk durumunun da sirkadiyan ritimler üzerinde

etkisinin olduğu bilinmektedir (Levi & Schibler, 2007). Kapesitabin klinik kullanımında hastalara tok olarak verilmektedir (Reigner ve ark., 2001). 11 kolorektal kanser hastası ile yapılan bir klinik çalışmada, gıdaların kapesitabinin absorpsiyon hız ve derecesini azalttığı belirtilmiş, fakat kapesitabinin metabolitleri olan 5'DFCR, 5'DFUR ve 5-FU'nun AUC değerlerine gıdanın etkisi önemsiz olmuştur (Reigner ve ark., 1998). Yapılan tüm klinik çalışmalarda kapesitabin yemeklerden sonra 30 dakika içinde verilmiştir (Xeloda, 2021). Bu nedenle çalışmamızda *ad libitum* uygulama tercih edilmiştir. Çalışmamızda, kapesitabinden metabolize edilen 5-FU miktarı tam olarak bilinmediği için 5-FU'ya ilişkin klirens ve dağılım hacmi değerleri hesaplanamamıştır. 5-FU'nun plazma konsantrasyonlarındaki ve toksisitesindeki değişikliklerin DPD enzim aktivitesindeki sirkadiyan değişikliklerle ilişki gösterdiği öne sürülmektedir (Harris ve ark., 1990; Levi & Schibler, 2007). Gerçekleştirdiğimiz Western blot analizleriyle, farelerde DPD proteininin ZT7'de maksimum düzeyde olduğu, ZT1'de ise minimum düzeyde olduğu ortaya koyulmuştur. Moleküler ve farmakokinetik veriler beraber değerlendirildiğinde, 5-FU'nun plazmada en fazla olduğu zamanda DPD düzeyinin düşük olduğu görülmektedir. 5-FU'nun karaciğerdeki farmakokinetiği değerlendirildiğinde, karaciğerde plazmaya göre 20-25 kat fazla 5-FU bulunduğu görülmüştür. Kapesitabin uygulanan insanlardaki 5-FU düzeylerinin, karaciğer dokusunda plazmaya göre 8-10 kat daha fazla olduğu, kolorektal tümör dokusunda ise plazmaya göre yaklaşık 20 kat daha fazla olduğu bilinmektedir. 5-FU'nun plazma/karaciğer dokusu dağılımındaki farklılık, kapesitabini 5-FU'ya metabolize eden enzim aktivitelerinin karaciğerde plazmaya göre daha fazla olmasıyla açıklanmaktadır (Reigner ve ark., 2001). Karaciğerdeki 5-FU  $C_{maks}$  değerlerinde, dinlenme döneminin ortasına karşılık gelen ZT7 grubu ile ZT1, ZT13 ve ZT19 grupları arasında 3-12 kat farklılık görülmüştür ( $***p<0,001$ ). 5-FU'ya ait karaciğer ortalama  $C_{maks}$  değerleri açısından grupların sıralaması, ZT7>>ZT13>ZT1>>ZT19 biçimindedir. 5-FU'ya ilişkin karaciğer ortalama  $AUC_{0-6sa}$  değerleri açısından ise gruplar ZT7>>ZT1>ZT13>>ZT19 biçimde sıralanmaktadır. Karaciğerde 5-FU'nun en fazla bulunduğu zamanda, DPD düzeyi de fazladır. Kobuchi ve ark. (2016) tarafından popülasyon farmakokinetiği modeliyle yapılan çalışmada, sıçanlarda i.v. yolla uygulanan 5-FU klirensinin en fazla olduğu zamanın DPD aktivitesinin pik zamanına tam olarak denk gelmemesi, 5-FU'nun klirensi üzerinde DPD enzim aktivitesi dışında birçok faktörün etkili olabileceğini düşündürmüştür. 5-FU'yu anabolize edici bir enzim olan ve DPD aktivitesi ile ters fazla

olarak sirkadiyan ritim gösteren timidin kinaz aktivitesinin 5-FU düzeylerindeki sirkadiyan değişikliklerde etkili olabileceği düşünülmektedir (Kobuchi ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda da 5-FU karaciğer düzeylerine, DPD metabolizması dışında sirkadiyan ritim gösteren enzimlerin ve fizyolojik fonksiyonların etkisi söz konusu olabilir.

ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zamanlarında C57BL/6J soyu erkek farelerden izole edilen karaciğer dokularında yapılan Western Blot analizleriyle, kapesitabini metabolize edici enzimler olan CES1'in pik zamanı ZT19 (\*\*\* $p<0,001$ ), CES2'nin pik zamanı ise ZT3 (\*\* $p<0,01$ ) olarak belirlenmiştir. Her iki protein için de zamana bağlı bir varyasyon söz konusudur. Fare karaciğer dokusunda *Ces1* ve *Ces2* mRNA ekspresyonlarının sirkadiyan ritim izlediği daha önce gösterilmiştir (Y. K. J. Zhang ve ark., 2009). İnsan Caco-2 hücrelerinde de *CES2*'nin mRNA düzeyinde sirkadiyan ritmi ortaya koyulmuştur (Ballesta ve ark., 2011). Fakat CES1 ve CES2 proteinlerinin sirkadiyan ritimlerine ilişkin yeterli çalışma bulunmamaktadır.

Farelerden izole edilen karaciğer dokularında yapılan analizlere, CDA protein ekspresyonunda sirkadiyan ritim görülmüştür (Cosinor; \* $p<0,05$ ). CDA proteini, ZT1 grubunda en yüksek düzeydeyken, ZT19 grubunda en düşük düzeydedir. Geçmiş yıllarda Thompson ve ark. (1989) tarafından romatoid artrit hastalarında yapılan bir çalışmada, insan serumunda CDA düzeylerinde zamana bağlı değişiklikler gösterilmiştir. Bunun dışında literatürde CDA proteininin sirkadiyan ritmine ilişkin veri bulunmamaktadır. Çalışmamız, farelerde CDA sirkadiyan ritmini ilk defa göstermesi bakımından önem taşımaktadır.

5'DFUR'nin 5-FU'ya metabolize edilmesi, insanlarda ağırlıklı olarak timidin fosforilaz enzimi ile gerçekleşirken, fare ve sıçanların bulunduğu kemirgenler sınıfında uridin fosforilazlar (UPP1 ve UPP2) aracılığıyla gerçekleşir (Miwa ve ark., 1998; Onodera ve ark., 2000). Çalışmamızda farelere ait karaciğer dokularında sirkadiyan ritim gösterdiği belirlenen UPP2 protein ekspresyonu, ZT1 grubunda en yüksek düzeydeyken, ZT19 grubunda en düşük düzeyde olmuştur (Cosinor; \* $p<0,05$ ). Eckel-Mahan ve ark. (2012) tarafından C57BL/6 soyu erkek farelerde yapılan çalışmada, ZT3, ZT9, ZT15 ve ZT21 zamanlarında alınan karaciğer dokularında yapılan PCR analizleri sonucunda *Upp2* mRNA düzeylerinin ZT15'te pik yaptığı gösterilmiştir (\* $p<0,05$ ). Bahsedilen çalışmada, UPP2 protein ekspresyonlarında da günlük osilasyon olduğu

gösterilmekle beraber UPP2 proteinin pik zamanı belirtilmemiştir (Eckel-Mahan ve ark., 2012). Bunun dışında literatürde farelerde UPP2 proteininin sirkadiyan ritim profilini gösteren bir veri bulunmamıştır.

Farelerin karaciğer dokularında; DPD protein ekspresyonunda oluşan zamana bağlı değişiklikler incelendiğinde, DPD proteininin en fazla olduğu zaman ZT7 en az olduğu zaman ise ZT1 olarak belirlenmiştir (\*\* $p < 0,01$ ). Porsin ve ark. (2003) tarafından B6D2F1 soyu farelerin karaciğer dokularında yapılan çalışmada, DPD aktivitesi için akrofaz zamanı ZT6 olarak gösterilmiştir. Sprague-Dawley soyu sıçanların karaciğerinde ise DPD proteini, ZT6'da en yüksek düzeyde olmaktadır (Jiang ve ark., 2004). Örnek alma zamanlarındaki farklılıklar, fare soyundaki değişiklik, gen ve protein ekspresyonu arasındaki zamansal gecikme sonuçlardaki farklılığın nedeni olarak düşünülebilir.

Kapesitabinin aktif metaboliti olan 5-FU'nun i.v. yolla uygulanması durumunda, etkinlik ve toksisitesinde uygulama zamanına bağlı değişiklikler olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. 5-FU'nun kronomodüle olarak uygulanmasının, tolere edilebilirlik ve klinik yanıt açısından konvansiyonel tedaviye göre üstün olduğu çok sayıda klinik kronoterapi çalışması ile gösterilmiştir (Lévi ve ark., 1994, 1997, 1999). Bununla beraber, 5-FU'nun toksisitesinin ve etkinliğinin plazma konsantrasyonuyla ilişkili olduğu bilinmektedir (Saif ve ark., 2009). İntravenöz yolla uygulanan 5-FU'nun farmakokinetiğinin, uygulanma zamanına bağlı olarak sirkadiyan ritim izlediği insanlarda (Fleming ve ark., 2015; Harris ve ark., 1990; Kuwahara ve ark., 2010; Metzger ve ark., 1994; Petit ve ark., 1988) ve deney hayvanlarında (Kobuchi ve ark., 2016, 2020) yapılan çalışmalar ile ortaya koyulmuştur. 5-FU'nun sürekli i.v. infüzyon ile sabit hızda verimesi durumunda, plazma 5-FU konsantrasyonları hem kanser hastalarında hem de farelerde dinlenme periyodunun başında zamanında pik yapar (Lévi ve ark., 2007). Çalışmamızda elde edilen sonuçlara bakıldığında oral yolla kapesitabin verilmesiyle elde edilen plazma 5-FU konsantrasyonlarının, 5-FU'nun sürekli i.v. infüzyon ile sabit hızda verimesi durumunda olduğu gibi dinlenme döneminin başında yüksek düzeyde olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak, elde edilen veriler değerlendirildiğinde kapesitabinin farmakokinetiğinde ve metabolize edici enzimlerin protein düzeylerinde ilaç uygulama zamanına bağlı olarak anlamlı değişiklikler görülmüştür. Kapesitabinin, 5'DFUR ve 5-

FU'nun plazma düzeyleri dinlenme periyodunda aktivite periyoduna göre daha yüksektir. 5'DFCR'nin plazma düzeyleri ise tüm gruplarda benzerdir. Karaciğere bakıldığında, kapesitabin ve 5'DFCR düzeylerinde uygulama zamanına bağlı olarak anlamlı bir farklılık görülmezken, karaciğer 5'DFUR ve 5-FU düzeyleri dinlenme periyodunda aktivite periyoduna göre daha yüksektir. Ayrıca çalışmamızda, kapesitabinin 5-FU'ya metabolize edilmesinde görev alan CES1, CES2, CDA, UPP2, DPD enzim düzeylerinde zamana bağlı farklılıklar ortaya konmuştur. Sirkadiyan değişiklikler gösteren CES1 proteini aktivite döneminde yüksek düzeylerdeyken, CES2, CDA, UPP2 aktivite döneminde düşük düzeylerdedir. DPD ise dinlenme fazının sonunda ve aktivite fazının başında yüksek düzeydedir.

Çalışmamız geliştirilebilecek yönleri açısından değerlendirildiğinde, deney grupları artırılarak daha fazla sirkadiyan zamanda farmakokinetik değerlendirme yapılması düşünülebilir. Fakat bu durumda, çalışmaya alınan fare sayılarını da artırmak gerekecektir. Ayrıca gelecek çalışmalarda, matematiksel farmakokinetik modelleme yapılması da planlamaktadır.

Uygulama zamanına bağlı olarak kapesitabinin farmakokinetiğindeki farklılıkları ve kapesitabin metabolizmasında rol alan enzimlerin sirkadiyan ritmini bir arada inceleyen başka bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızın, bahsedilen farkları ortaya koyması nedeniyle klinik kronoterapi uygulamalarına temel oluşturma potansiyeli bulunmaktadır. Bir ön ilaç olan kapesitabinin plazma düzeylerindeki sirkadiyan değişikliklerin, kapesitabinin aktif metaboliti olan 5-FU düzeylerindeki değişikliklerle olan ilişkisinin bilinmesi tedavinin etkinlik ve toksisitesinin değerlendirilmesi açısından öneme sahiptir. Antikanser ilaçlarla ilgili olarak farmakokinetik ve farmakodinamik düzeyde ortaya çıkan uygulama zamana bağlı değişiklikler ve bu değişikliklerin ortaya çıkma mekanizmaları hakkında bilgi birikimini artırmak, klinikte doz kısıtlayıcı yan etkileri ile sıkça karşılaşılan antikanser ilaçların tedavi edici etkilerinin en üst düzeye çıkarılmasını ve yan etkilerinin en aza indirilmesini sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- Aguilar-Roblero, R., Díaz-Muñoz, M., & Fanjul-Moles, M. L. (2015). Mechanisms of circadian systems in animals and their clinical relevance. İçinde *Mechanisms of Circadian Systems in Animals and Their Clinical Relevance*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-08945-4>
- Akgun, Z., Saglam, S., Yucel, S., Gural, Z., Balik, E., Cipe, G., Yildiz, S., Kilickap, S., Okyar, A., & Kaytan-Saglam, E. (2014). Neoadjuvant chronomodulated capecitabine with radiotherapy in rectal cancer: a phase II brunch regimen study. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 74(4), 751–756. <https://doi.org/10.1007/s00280-014-2558-x>
- Anafi, R. C., Lee, Y., Sato, T. K., Venkataraman, A., Ramanathan, C., Kavakli, I. H., Hughes, M. E., Baggs, J. E., Grove, J., Liu, A. C., Kim, J., & Hogenesch, J. B. (2014). Machine Learning Helps Identify CHRONO as a Circadian Clock Component. *PLoS Biology*, 12(4), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001840>
- Ando, H., Yanagihara, H., Sugimoto, K. I., Hayashi, Y., Tsuruoka, S., Takamura, T., Kaneko, S., & Fujimura, A. (2005). Daily rhythms of P-glycoprotein expression in mice. *Chronobiology International*, 22(4), 655–665. <https://doi.org/10.1080/07420520500180231>
- Annayev, Y., Adar, S., Chiou, Y. Y., Lieb, J. D., Sancar, A., & Ye, R. (2014). Gene model 129 (Gm129) encodes a novel transcriptional repressor that modulates circadian gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 289(8), 5013–5024. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.534651>
- Aschoff, J. (1983). Circadian control of body temperature. *Journal of Thermal Biology*, 8(1–2), 143–147. [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(83\)90094-3](https://doi.org/10.1016/0306-4565(83)90094-3)
- Asher, G., Gatfield, D., Stratmann, M., Reinke, H., Dibner, C., Kreppel, F., Mostoslavsky, R., Alt, F. W., & Schibler, U. (2008). SIRT1 Regulates Circadian Clock Gene Expression through PER2 Deacetylation. *Cell*, 134, 317–328. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.050>
- Astiz, M., Heyde, I., & Oster, H. (2019). *Mechanisms of Communication in the*

- Mammalian Circadian Timing System*. <https://doi.org/10.3390/ijms20020343>
- Bajetta, E., Pietrantonio, F., Buzzoni, R., Ferrario, E., Valvo, F., Mariani, L., Dotti, K. F., Biondani, P., Formisano, B., Gevorgyan, A., Grassi, P., & Di Bartolomeo, M. (2014). Chronomodulated capecitabine and adjuvant radiation in intermediate-risk to high-risk rectal cancer: A phase II study. *American Journal of Clinical Oncology: Cancer Clinical Trials*, 37(6), 545–549. <https://doi.org/10.1097/COC.0b013e31827ecd1d>
- Ballesta, A., Dulong, S., Abbara, C., Cohen, B., Okyar, A., Clairambault, J., & Lévi, F. (2011). A combined experimental and mathematical approach for molecular-based optimization of irinotecan circadian delivery. *PLoS Computational Biology*, 7(9), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002143>
- Ballesta, A., Innominato, P. F., Dallmann, R., Rand, D. A., & Lévi, F. A. (2017). Systems Chronotherapeutics. *Pharmacological Reviews*, 69(2), 161–199. <https://doi.org/10.1124/pr.116.013441>
- Baraldo, M. (2008). The influence of circadian rhythms on the kinetics of drugs in humans. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4(2), 175–192. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.2.175>
- Bardal, S., Waechter, J., & Martin, D. (2011). Chapter 2-Pharmacokinetics. İçinde *Applied Pharmacology* (ss. 17–34). Saunders Elsevier.
- Bélanger, P. M., Bruguerolle, B., & Labrecque, G. (1997). Rhythms in Pharmacokinetics: Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion. İçinde *Handbook of Experimental Pharmacology, Physiology and Pharmacology of Biological Rhythms* (ss. 177–204). [https://doi.org/10.1007/978-3-662-09355-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-662-09355-9_8)
- Binkhorst, L., Kloth, J. S. L., de Wit, A. S., de Bruijn, P., Lam, M. H., Chaves, I., Burger, H., van Alphen, R. J., Hamberg, P., van Schaik, R. H. N., Jager, A., Koch, B. C. P., Wiemer, E. A. C., van Gelder, T., van der Horst, G. T. J., & Mathijssen, R. H. J. (2015). Circadian variation in tamoxifen pharmacokinetics in mice and breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment*, 152, 119–128. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3452-x>
- Blesch, K. S., Gieschke, R., Tsukamoto, Y., Reigner, B. G., Burger, H. U., & Steimer, J. (2003). *Clinical pharmacokinetic / pharmacodynamic and physiologically based*

- pharmacokinetic modeling in new drug development: The capecitabine experience.* 195–223.
- Boissier, C., Decousus, H., Perpoint, B., Ollagnier, M., Mismetti, P., Hocquart, J., & Oueneau, P. (1990). Timing optimizes sustained release ketoprofen treatment of osteoarthritis. *Annual Review of Chronopharmacology*, 7, 289–292. [https://doi.org/10.1016/j.\(73\)](https://doi.org/10.1016/j.(73))
- Bronckaers, A., Gago, F., Balzarini, J., & Liekens, S. (2009). The Dual Role of Thymidine Phosphorylase in Cancer Development and Chemotherapy. *Medicinal Research Reviews*, 29(6), 903–953. <https://doi.org/10.1002/med.20159>
- Brown, S. A., & Azzi, A. (2013). Peripheral Circadian Oscillators in Mammals. İçinde A. Kramer & M. Merrow (Ed.), *Circadian Clocks, Handbook of Experimental Pharmacology* (ss. 45–66). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0>
- Buijs, R. M., Scheer, F. A., Kreier, F., Yi, C., Bos, N., Goncharuk, V. D., & Kalsbeek, A. (2006). Organization of circadian functions: interaction with the body. *Progress in Brain Research*, 153(06), 341–360. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)53020-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)53020-1)
- Busino, L., Bassermann, F., Maiolica, A., Lee, C., Nolan, P. M., Godinho, S. I. H., Draetta, G. F., & Pagano, M. (2007). SCFFbx13 Controls the Oscillation of the Circadian Clock by Directing the Degradation of Cryptochrome Proteins. *Scientific Reports*, 316, 900–904.
- Cal-Kayitmazbatir, S., Kulkoyluoglu-Cotul, E., Growe, J., Selby, C. P., Rhoades, S. D., Malik, D., Oner, H., Asimgil, H., Francey, L. J., Sancar, A., Kruger, W. D., Hogenesch, J. B., Weljie, A., Anafi, R. C., & Kavakli, I. H. (2020). CRY1-CBS binding regulates circadian clock function and metabolism. *FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/febs.15360>
- Cameron, M. A., Barnard, A., & Lucas, R. J. (2008). The electroretinogram as a method for studying circadian rhythms in the mammalian retina. *Journal of Genetics*, 87(5), 459–466. <https://doi.org/10.1007/s12041-008-0068-5>
- Carrillo, E., Navarro, A., Ramı, A., & Marchal, J. A. (2015). 5-Fluorouracil derivatives : a patent review (2012 - 2014). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 25(10),

- 1131–1144. <https://doi.org/10.1517/13543776.2015.1056736>
- Claustrat, B., & Leston, J. (2015). Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*, 61(2–3), 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2015.03.002>
- Curtis, A. M., Seo, S., Westgate, E. J., Rudic, R. D., Smyth, E. M., Chakravarti, D., Fitzgerald, G. A., & Mcnamara, P. (2004). Histone Acetyltransferase-dependent Chromatin Remodeling and the Vascular Clock \*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 7091–7097. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311973200>
- Cutsem, B. E. Van, Twelves, C., Cassidy, J., Allman, D., Bajetta, E., Boyer, M., Bugat, R., Findlay, M., Frings, S., Jahn, M., Mckendrick, J., Osterwalder, B., Perez-manga, G., Rosso, R., Rougier, P., Schmiegel, W. H., Seitz, J., Thompson, P., & Vieitez, J. M. (2001). *Fluorouracil Plus Leucovorin in Patients With Metastatic Colorectal Cancer : Results of a Large Phase III Study*. 19(21), 4097–4106.
- Dallmann, R., Brown, S. A., & Gachon, F. (2014). Chronopharmacology: New Insights and Therapeutic Implications. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 54, 1–25. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-135923>.Chronopharmacology
- Dallmann, R., Okyar, A., & Lévi, F. (2016). Dosing-Time Makes the Poison: Circadian Regulation and Pharmacotherapy. *Trends in Molecular Medicine*, 22(5), 430–445. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.03.004>
- Damiola, F., Minh, N. Le, Preitner, N., Fleury-olela, F., & Schibler, U. (2000). *Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus*. 2950–2961. <https://doi.org/10.1101/gad.183500.moral>
- DeBruyne, P. J., Weaver, D. R., & Dallmann, R. (2014). The hepatic circadian clock modulates xenobiotic metabolism in mice. *Journal of Biological Rhythms*, 29(4), 277–287. <https://doi.org/10.1177/0748730414544740>.The
- Di, L. (2018). The Impact of Carboxylesterases in Drug Metabolism and Pharmacokinetics. *Current Drug Metabolism*, 20(2), 91–102. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180821094502>
- 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, 517–549. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135821>
- DiTacchio, L., Le, H. D., Vollmers, C., Hatori, M., Witcher, M., Secombe, J., & Panda, S. (2011). Histone Lysine Demethylase JARID1a Activates CLOCK-BMAL1 and Influences the Circadian Clock. *Science*, 333(6051), 1881–1885. <https://doi.org/10.1126/science.1206022>. Histone
- Dobritzsch, D., Schneider, G., Schnackerz, K. D., & Lindqvist, Y. (2001). Crystal structure of dihydropyrimidine dehydrogenase, a major determinant of the pharmacokinetics of the anti-cancer drug 5-fluorouracil. *EMBO Journal*, 20(4), 650–660. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.4.650>
- Doi, M., Hirayama, J., & Sassone-corsi, P. (2006). Circadian Regulator CLOCK Is a Histone Acetyltransferase. *Cell*, 125, 497–508. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.033>
- Doi, M., Takahashi, Y., Komatsu, R., Yamazaki, F., Yamada, H., Haraguchi, S., Emoto, N., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Kanematsu, A., Ogawa, O., Todo, T., Tsutsui, K., Horst, G. T. J. Van Der, & Okamura, H. (2010). Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient Cry-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. *Nature Medicine*, 16(1), 67–75. <https://doi.org/10.1038/nm.2061>
- Dooley, M., & Goa, K. L. (1999). *Capecitabine*. 58(1), 69–76.
- Eckel-Mahan, K. L., Patel, V. R., Mohny, R. P., Vignola, K. S., Baldi, P., & Sassone-Corsi, P. (2012). Coordination of the transcriptome and metabolome by the circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(14), 5541–5546. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118726109>
- Eckel-Mahan, K. L., & Storm, D. R. (2009). Circadian rhythms and memory: Not so simple as cogs and gears. *EMBO Reports*, 10(6), 584–591. <https://doi.org/10.1038/embo.2009.123>
- 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 CKIε-Regulated Proteasome-Mediated PER2 Degradation. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 25(7), 2795–2807.

<https://doi.org/10.1128/MCB.25.7.2795>

EMA. (2019). *Annex I-Summary of Product Characteristics, Xeloda 150/500 mg film-coated tablets*. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xeloda-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/xeloda-epar-product-information_en.pdf)

Etchegaray, J., Lee, C., & Wade, P. A. (2003). Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature*, 421(January), 177–182. <https://doi.org/10.1038/nature01282.1>.

Ethan, B. D., & Takahashi, J. S. (2013). Molecular Components of Mammalian Circadian Clock. İçinde *Handbook of Experimental Pharmacology, Circadian Clocks* (C. 167, Sayı 11, ss. 3–27). [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(90\)90130-Z](https://doi.org/10.1016/0165-6147(90)90130-Z)

FDA. (2015). *Xeloda Product Label*.

Filipski, E., Lemaigre, G., Liu, X.-H., Méry-Mignard, D., Mahjoubi, M., & Lévi, F. (2004). Circadian rhythm of irinotecan tolerability in mice. *Chronobiology international*, 21(4–5), 613–630.

Fleming, G. F., Schumm, P., Friberg, G., Ratain, M. J., Njiaju, U. O., & Schilsky, R. L. (2015). Circadian variation in plasma 5-fluorouracil concentrations during a 24 hour constant-rate infusion. *BMC Cancer*, 15(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1075-6>

Gachon, F., Olela, F. F., Schaad, O., Descombes, P., & Schibler, U. (2006). The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metabolism*, 4(1), 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.04.015>

Gaddameedhi, S., Selby, C. P., Kaufmann, W. K., Smart, R. C., & Sancar, A. (2011). Control of skin cancer by the circadian rhythm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(46), 18790–18795. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115249108>

Gallego, M., & Virshup, D. M. (2007). Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 139–148. <https://doi.org/10.1038/nrm2106>

Gaspar, L. S., Álvaro, A. R., Carmo-Silva, S., Mendes, A. F., Relógio, A., & Cavadas,

- C. (2019). The importance of determining circadian parameters in pharmacological studies. *British Journal of Pharmacology*, 176, 2827–2847. <https://doi.org/10.1111/bph.14712>
- Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Wilsbacher, L. D., King, D. P., Takahashi, J. S., & Weitz, C. J. (1998). Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism. *Science*, 280, 1564–1569.
- Giacchetti, S., Dugué, P. A., Innominato, P. F., Bjarnason, G. A., Focan, C., Garufi, C., Tumolo, S., Coudert, B., Iacobelli, S., Smaaland, R., Tampellini, M., Adam, R., Moreau, T., & Lévi, F. (2012). Sex moderates circadian chemotherapy effects on survival of patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis. *Annals of Oncology*, 23, 3110–3116. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds148>
- Gorbacheva, V. Y., Kondratov, R. V., Zhang, R., Cherukuri, S., Gudkov, A. V., Takahashi, J. S., & Antoch, M. P. (2005). Circadian sensitivity to the chemotherapeutic agent cyclophosphamide depends on the functional status of the CLOCK/BMAL1 transactivation complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(9), 3407–3412. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409897102>
- Granda, T. G., Filipinski, E., Attino, R. M. D., Vrignaud, P., Anjo, A., Bissery, M. C., & Lévi, F. (2001). Experimental Chronotherapy of Mouse Mammary Adenocarcinoma MA13/C with Docetaxel and Doxorubicin as Single Agents and in Combination. *Cancer Research*, 61, 1996–2001.
- Granda, T. G., Liu, X.-H., Smaaland, R., Cermakian, N., Filipinski, E., Sassone-Corsi, P., & Lévi, F. (2004). Circadian regulation of cell cycle and apoptosis proteins in mouse bone marrow and tumor. *The FASEB Journal*, 19, 304–306. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2665fje>
- Green, C. B., Takahashi, J. S., & Bass, J. (2008). The Meter of Metabolism. *Cell*, 134(5), 728–742. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.08.022>
- Grem, J. L., & Fischer, P. H. (1989). Enhancement of 5-fluorouracil's anticancer activity by dipyrindamole. *Pharmac. Ther.*, 40(d), 349–371.
- Gülçin, I., Bursal, E., Şehitoğlu, M. H., Bilsel, M., & Gören, A. C. (2010). Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8–9), 2227–2238.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.053>

- Guo, X., Goessl, E., Jin, G., Collie-duguid, E. S. R., Cassidy, J., Wang, W., & Brien, V. O. (2008). *Cell Cycle Perturbation and Acquired 5-Fluorouracil Chemoresistance*. 14, 9–14.
- Guo, Y., Lu, P., Farrell, E., Zhang, X., Weller, P., Monshouwer, M., Wang, J., Liao, G., Zhang, Z., Hu, S., Allard, J., Shafer, S., Usuka, J., & Peltz, G. (2007). In silico and in vitro pharmacogenetic analysis in mice. *PNAS*, 104(45), 17735–17740.
- Hannibal, J., & Fahrenkrug, J. (2006). Neuronal Input Pathways to the Brain's Biological Clock and their Functional Significance. *Advances in Anatomy, Embryology and Cell Biology*, 182, 1–75.
- Harris, B. E., Song, R., Diasio, R. B., & Soong, S. J. (1990). Relationship between Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity and Plasma 5-Fluorouracil Levels with Evidence for Circadian Variation of Enzyme Activity and Plasma Drug Levels in Cancer Patients Receiving 5-Fluorouracil by Protracted Continuous Infusion. *Cancer Research*, 50(1), 197–201.
- Hastings, M. H. (1997). The Vertebrate Clock: Localisation, Connection and Entrainment. İçinde P. H. Redfern & B. Lemmer (Ed.), *Physiology and Pharmacology of Biological Rhythms-Handbook of Experimental Pharmacology* (C. 125). Springer Berlin Heidelberg.
- Hill, R. J. W., Innominato, P. F., Lévi, F., & Ballesta, A. (2020). Optimizing circadian drug infusion schedules towards personalized cancer chronotherapy. *PLoS Computational Biology*, 16(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007218>
- 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, 1106–1118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.054>
- Hirayama, J., Sahar, S., Grimaldi, B., Tamaru, T., Takamatsu, K., Nakahata, Y., & Sassone-corsi, P. (2007). CLOCK-mediated acetylation of BMAL1 controls circadian function. *Nature*, 450, 1086–1090. <https://doi.org/10.1038/nature06394>

- Hishikawa, S., Kobayashi, E., Sugimoto, K. I., Miyata, M., & Fujimura, A. (2001). Diurnal variation in the biliary excretion of flomoxef in patients with percutaneous transhepatic biliary drainage. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 52, 65–68. <https://doi.org/10.1046/j.0306-5251.2001.01418.x>
- Hishikawa, S., Sugimoto, K. ichi, Kobayashi, E., Kumagai, Y., & Fujimura, A. (2003). Dosing-time-dependent variation in biliary excretion of flomoxef in rats. *Chronobiology International*, 20(3), 463–471. <https://doi.org/10.1081/CBI-120020421>
- Hoff, B. P. M., Ansari, R., Batist, G., Cox, J., Kocha, W., Kuperminc, M., Maroun, J., Walde, D., Weaver, C., Harrison, E., Burger, H. U., Osterwalder, B., Wong, A. O., & Wong, R. (2001). *Comparison of Oral Capecitabine Versus Intravenous Fluorouracil Plus Leucovorin as First-Line Treatment in 605 Patients With Metastatic Colorectal Cancer : Results of a Randomized Phase III Study*. 19(8), 2282–2292.
- Hosoda, H., Asano, H., Ito, M., Kato, H., Iwamoto, T., Suzuki, A., Masushige, S., & Kida, S. (2009). CBP/p300 is a cell type-specific modulator of CLOCK / BMAL1-mediated transcription. *Molecular Brain*, 18, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-2-34>
- Innominato, P. F., Ballesta, A., Huang, Q., Focan, C., Chollet, P., Karaboué, A., Giacchetti, S., Bouchahda, M., Adam, R., Garufi, C., & Lévi, F. A. (2020). Sex-dependent least toxic timing of irinotecan combined with chronomodulated chemotherapy for metastatic colorectal cancer: Randomized multicenter EORTC 05011 trial. *Cancer Medicine*, 00, 1–12. <https://doi.org/10.1002/cam4.3056>
- Innominato, P. F., Giacchetti, S., Moreau, T., Smaaland, R., Bjarnason, G. A., Garufi, C., Iacobelli, S., Tampellini, M., Carvalho, C., Karaboué, A., & Lévi, F. (2011). Prediction of Survival by Neutropenia According To Delivery Schedule of Oxaliplatin–5-Fluorouracil– Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer in a Randomized International Trial ( EORTC 05963 ). *Chronobiology International*, 28(7), 586–600. <https://doi.org/10.3109/07420528.2011.597532>
- Innominato, P. F., Lévi, F. A., & Bjarnason, G. A. (2010). Chronotherapy and the molecular clock: Clinical implications in oncology. *Advanced Drug Delivery*

- Reviews*, 62(9–10), 979–1001. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.06.002>
- Ishikawa, T., Utoh, M., Sawada, N., Nishida, M., & Fukase, Y. (1998). Tumor Selective Delivery of 5-Fluorouracil by Capecitabine , a New Oral Fluoropyrimidine Carbamate , in Human Cancer Xenografts. *Biochemical Pharmacology*, 55(97), 1091–1097.
- Jiang, H., Lu, J., & Ji, J. (2004). Circadian rhythm of dihydrouracil/uracil ratios in biological fluids: A potential biomarker for dihydropyrimidine dehydrogenase levels. *British Journal of Pharmacology*, 141(4), 616–623. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705651>
- Judson, I. R., Beale, P. J., Trigo, M., Aherne, W., Crompton, T., Bush, E., & Reigner, B. (1999). A human capecitabine excretion balance and pharmacokinetic study after administration of a single oral dose of 14 C-labelled drug. *Investigational New Drugs*, 17, 49–56.
- Kanabrocki, E. L., Sothorn, R. B., Scheving, L. E., Halberg, F., Pauly, J. E., Greco, J. J., Nemchausky, B. A., Debartolo, M., Kaplan, E., McCormick, J. B., Olwin, J. H., Bird, T., Redmond, D. P., Graeber, R. C., Ferrara, A., Hrushesky, W. J. M., Redmond, D. P., Graeber, R. C., Ferrara, A., & Ten-year-replicated, W. J. M. H. (1988). Ten-Year-Replicated Circadian Profiles for 36 Physiological , Serological and Urinary Variables in Healthy Men. *Chronobiology International*, 5(3), 237–284. <https://doi.org/10.3109/07420528809079565>
- Kang, H. S., Angers, M., Ju, Y. B., Wu, X., Gimble, J. M., Wada, T., Xie, W., Collins, J. B., Grissom, S. F., & Jetten, A. M. (2007). Gene expression profiling reveals a regulatory role for ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$  in phase I and phase II metabolism. *Physiological Genomics*, 31(2), 281–294. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00098.2007>
- Katada, S., & Sassone-Corsi, P. (2010). The histone methyltransferase MLL1 permits the oscillation of circadian gene expression. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(12), 1414–1421. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Kavakli, I. H., Baris, I., Tardu, M., Gül, Ş., Öner, H., Çal, S., Bulut, S., Yarpavar, D., Berkel, Ç., Ustaoglu, 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>
- Kettner, N. M., Katchy, C. A., & Fu, L. (2014). Circadian gene variants in cancer. *Annals of Medicine*, 46(4), 208–220.  
<https://doi.org/10.3109/07853890.2014.914808>
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2018). PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D1102–D1109. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>
- King, D. P., Zhao, Y., Sangoram, A. M., Wilsbacher, L. D., Tanaka, M., Antoch, M. P., Steeves, T. D. L., Vitaterna, M. H., Kornhauser, J. M., Lowrey, P. L., Turek, F. W., & Takahashi, J. S. (1997). Positional Cloning of the Mouse Circadian Clock Gene. *Cell*, 89(4), 641–653.
- Ko, C. H., & Takahashi, J. S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*, 15(2), 271–277.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddl207>
- Kobuchi, S., Ito, Y., Nakano, Y., & Sakaeda, T. (2016). Population pharmacokinetic modelling and simulation of 5-fluorouracil incorporating a circadian rhythm in rats. *Xenobiotica*, 46(7), 597–604. <https://doi.org/10.3109/00498254.2015.1100767>
- Kobuchi, S., Matsumura, E., Ito, Y., & Sakaeda, T. (2020). Population Pharmacokinetic Model-Based Evaluation of Circadian Variations in Plasma 5-Fluorouracil Concentrations During Long-Term Infusion in Rats: A Comparison With Oral Anticancer Prodrugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109(7), 2356–2361.  
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.04.005>
- Kobuchi, S., Yazaki, Y., Ito, Y., & Sakaeda, T. (2018). Circadian variations in the pharmacokinetics of capecitabine and its metabolites in rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112(August 2017), 152–158.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.11.021>
- Koopman, M. G., KOOMEN, G. C. M., KREDIET, R. T., MOOR, E. A. M. DE, HOEK, F. J., & ANSZ, L. (1989). Circadian rhythm of glomerular filtration rate in normal individuals. *Clinical Science*, 77, 105–111.

- Krishnaiah, S. Y., Wu, G., Altman, B. J., Growe, J., Seth, D., Coldren, F., Venkataraman, A., Olarerin-george, A. O., Francey, J., Mukherjee, S., Girish, S., Selby, C. P., & Cal, S. (2018). Clock regulation of metabolites reveals coupling between transcription and metabolism. *Cell Metabolism*, 25(4), 961–974. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.019>. Clock
- Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., & Reppert, S. M. (1999). mCRY1 and mCRY2 Are Essential Components of the Negative Limb of the Circadian Clock Feedback Loop. *Cell*, 98, 193–205.
- Kuramoto, Y., Hata, K., Koyanagi, S., Ohdo, S., Shimeno, H., & Soeda, S. (2006). Circadian regulation of mouse topoisomerase I gene expression by glucocorticoid hormones. *Biochemical Pharmacology*, 71, 1155–1161. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.12.034>
- Kuwahara, A., Yamamori, M., Nishiguchi, K., Okuno, T., Chayahara, N., Miki, I., Tamura, T., Kadoyama, K., Inokuma, T., Takemoto, Y., Nakamura, T., Kataoka, K., & Sakaeda, T. (2010). Effect of dose-escalation of 5-fluorouracil on circadian variability of its pharmacokinetics in Japanese patients with Stage III/IVa esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Medical Sciences*, 7(1), 48–54. <https://doi.org/10.7150/ijms.7.48>
- Ladner, R. D. (2001). *The Role of dUTPase and Uracil-DNA Repair in Cancer Chemotherapy*. 856, 361–370.
- Lee, C., Etchegaray, J., Cagampang, F. R. A., Loudon, A. S. I., & Reppert, S. M. (2001). Posttranslational Mechanisms Regulate the Mammalian Circadian Clock. *Cell*, 107, 855–867.
- Lee, J., Lee, Y., Lee, M. J., Park, E., Kang, S. H., Chung, C. H., Lee, K. H., & Kim, K. (2008). Dual Modification of BMAL1 by SUMO2/3 and Ubiquitin Promotes Circadian Activation of the CLOCK / BMAL1 Complex □ †. *Molecular and Cellular Biology*, 28(19), 6056–6065. <https://doi.org/10.1128/MCB.00583-08>
- Lemmer, B., Scheidel, B., & Behne, S. (1991). Chronopharmacokinetics and Chronopharmacodynamics of Cardiovascular Active Drugs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 618, 166–81.

- Lévi, F. (2003). *Circadian Rhythms in 5-Fluorouracil Pharmacology and Therapeutic Applications*. 107–128. [https://doi.org/10.1007/978-1-59259-337-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-59259-337-8_7)
- Lévi, F., Filipinski, E., Iurisci, I., Li, X. M., & Innominato, P. (2007). Cross-talks between Circadian Timing System and Cell Division Cycle Determine Cancer Biology and Therapeutics. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 72, 465–475.
- Lévi, F., Focan, C., Karaboué, A., de la Valette, V., Focan-Henrard, D., Baron, B., Kreutz, F., & Giacchetti, S. (2007). Implications of circadian clocks for the rhythmic delivery of cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(9–10), 1015–1035. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.11.001>
- Levi, F., Louarn, C. Le, & Reinberg, A. (1985). Timing optimizes sustained-release indomethacin treatment of osteoarthritis. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 37(1), 77–84. <https://doi.org/10.1038/clpt.1985.15>
- Lévi, F., & Okyar, A. (2011). Circadian clocks and drug delivery systems: impact and opportunities in chronotherapeutics. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(12), 1535–1541. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.618184>
- Lévi, F., Okyar, A., Dulong, S., Innominato, P. F., & Clairambault, J. (2010). Circadian Timing in Cancer Treatments. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50(1), 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(1), 593–628. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105208>
- Lévi, F., Zidani, R., Brienza, S., Dogliotti, L., Perpoint, B., Rotarski, M., Letourneau, Y., Llory, J. F., Chollet, P., Le Rol, A., & Focan, C. (1999). A multicenter evaluation of intensified, ambulatory, chronomodulated chemotherapy with oxaliplatin, 5-fluorouracil, and leucovorin as initial treatment of patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer*, 85(12), 2532–2540. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19990615\)85:12<2532::AID-CNCR7>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19990615)85:12<2532::AID-CNCR7>3.0.CO;2-1)
- Lévi, F., Zidani, R., & Misset, J. L. (1997). Randomised multicentre trial of chronotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid in metastatic

- colorectal cancer. *Lancet*, 350(9079), 681–686. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)03358-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)03358-8)
- Lévi, F., Zidani, R., Vannetzel, J. M., Perpoint, B., Focan, C., Faggiuolo, R., Chollet, P., Garufi, C., Itzhaki, M., Dogliotti, L., Lacobelli, S., Adam, R., Kunstlinger, F., Gastiaburu, J., Bismuth, H., Jasmin, C., & Misset, J. L. (1994). Chronomodulated versus fixed-infusion - rate delivery of ambulatory chemotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid (leucovorin) in patients with colorectal cancer metastases: A randomized multi-institutional trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 86(21), 1608–1617. <https://doi.org/10.1093/jnci/86.21.1608>
- Li, J., Chen, R., Ji, M., Zou, S., & Zhu, L. (2015). Cisplatin-based chronotherapy for advanced non-small cell lung cancer patients: a randomized controlled study and its pharmacokinetics analysis. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 76, 651–655. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2804-x>
- Li, X. M., Metzger, G., Filipski, E., Boughattas, N., Lemaigre, G., Hecquet, B., Filipski, J., & Levi, F. (1997). Pharmacologic modulation of reduced glutathione circadian rhythms with buthionine sulfoximine: Relationship with cisplatin toxicity in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 143, 281–290. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.8088>
- Li, X. M., Mohammad-Djafari, A., Dumitru, M., Dulong, S., Filipski, E., Siffroi-Fernandez, S., Mteyrek, A., Scaglione, F., Guettier, C., Delaunay, F., & Lévi, F. (2013). A circadian clock transcription model for the personalization of cancer chronotherapy. *Cancer Research*, 73(24), 7176–7188. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1528>
- Li, X. M., Tanaka, K., Sun, J., Filipski, E., Kayitalire, L., Focan, C., & Lévi, F. (2005). Preclinical relevance of dosing time for the therapeutic index of gemcitabine–cisplatin. *British Journal of Cancer*, 92, 1684–1689. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602564>
- Liu, A. C., Lewis, W. G., & Kay, S. A. (2007). Mammalian circadian signaling networks and therapeutic targets. *Nature Chemical Biology*, 3(10), 630–639. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.37>
- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil : Mechanisms

- of Action and Clinical Strategies. *Nature Reviews. Cancer*, 3(5), 330–338.  
<https://doi.org/10.1038/nrc1074>
- Lowrey, P. L., & Takahashi, J. S. (2011). Genetics of Circadian Rhythms in Mammalian Model Organisms. *Advances in Genetics*, 74, 175–230.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387690-4.00006-4>.Genetics
- Lu, R., Dong, Y., & Li, J. Da. (2020). Necdin regulates BMAL1 stability and circadian clock through SGT1-HSP90 chaperone machinery. *Nucleic Acids Research*, 48(14), 7944–7957. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa601>
- Marcheva, B., Ramsey, K. M., Buhr, E. D., Kobayashi, Y., Su, H., Ko, C. H., Ivanova, G., Omura, C., Mo, S., Martha, H., Lopez, J. P., Philipson, L. H., Bradfield, C. A., Seth, D., Jebailey, L., Wang, X., & Takahashi, J. S. (2010). Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*, 466(7306), 627–631. <https://doi.org/10.1038/nature09253>
- Matsunaga, N., Nakamura, N., Yoneda, N., Qin, T., Terazono, H., To, H., Higuchi, S., & Ohdo, S. (2004). Influence of Feeding Schedule on 24-h Rhythm of Hepatotoxicity Induced by Acetaminophen in Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(2), 594–600.  
<https://doi.org/10.1124/jpet.104.069062>
- Mckendrick, J., & Coutsouvelis, J. (2005). *Capecitabine: effective oral fluoropyrimidine chemotherapy*. 1231–1239.
- Meng, Q., Logunova, L., Maywood, E. S., Gallego, M., Lebiecki, J., Brown, T. M., Sládek, M., Semikhodskii, A. S., Glossop, N. R. J., Piggins, D., Chesham, J. E., Bechtold, D. A., Yoo, S., Joseph, S., & Loudon, A. S. I. (2008). Setting clock speed in mammals: the CK1  $\epsilon$  tau mutation in mice accelerates the circadian pacemaker by selectively destabilizing PERIOD proteins. *Neuron*, 58(1), 78–88.
- Mesnard-Ricci, B., & White, C. A. (1998). Chronokinetics of active biliary ampicillin secretion in rats. *Chronobiology International*, 15(4), 309–321.  
<https://doi.org/10.3109/07420529808998692>
- Metzger, G., Massari, C., Etienne, M. -C, Comisso, M., Brienza, S., Tuitou, Y., Milano, G., Bastian, G., et, J. L., & Lévi, F. (1994). Spontaneous or imposed circadian changes in plasma concentrations of 5-fluorouracil coadministered with

- folinic acid and oxaliplatin: Relationship with mucosal toxicity in patients with cancer. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 56(2), 190–201. <https://doi.org/10.1038/clpt.1994.123>
- Mikhail, S. E., Sun, J. F., & Marshall, J. L. (2010). Safety of capecitabine: A review. *Expert Opinion on Drug Safety*, 9(5), 831–841. <https://doi.org/10.1517/14740338.2010.511610>
- Miura, K., Kinouchi, M., Ishida, K., Fujibuchi, W., Naitoh, T., Ogawa, H., Ando, T., Yazaki, N., Watanabe, K., Shibata, C., Sasaki, I., & Biology, C. (2010). 5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs. *Cancers*, 2, 1717–1730. <https://doi.org/10.3390/cancers2031717>
- Miura, N., Ashimori, A., Takeuchi, A., Ohtani, K., Takada, N., Yanagiba, Y., Mita, M., Togawa, M., & Hasegawa, T. (2013). Mechanisms of cadmium-induced chronotoxicity in mice. *The Journal of Toxicological Sciences*, 38(6), 947–957. <https://doi.org/10.2131/jts.38.947>
- Miwa, M., Ura, M., Nishida, M., Sawada, N., Ishikawa, T., Mori, K., Shimma, N., Umeda, I., & Ishitsuka, H. (1998). Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5 fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *European Journal of Cancer*, 34(8), 1274–1281. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(98\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(98)00058-6)
- Moore, J. G., & Englert, E. (1970). Circadian Rhythm of Gastric Acid Secretion in Man. *Nature*, 1261–1262.
- Mrosovsky, N. (1988). Phase response curves for social entrainment. *Journal of Comparative Physiology A*, 162, 35–46.
- Murakami, Y., Higashi, Y., Matsunaga, N., Koyanagi, S., & Ohdo, S. (2008). Circadian Clock-Controlled Intestinal Expression of the Multidrug-Resistance Gene *mdr1a* in Mice. *Gastroenterology*, 135(5), 1636–1644. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.07.073>
- Musiek, E. S., & Fitzgerald, G. A. (2013). Molecular clocks in pharmacology. İçinde *Handbook of experimental pharmacology-Circadin Clocks* (C. 217, Sayı 217, ss. 243–260). NIH Public Access. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0_10)

- Nakahata, Y., Kaluzova, M., Grimaldi, B., Sahar, S., Hirayama, J., Chen, D., Guarente, L. P., & Sassone-Corsi, P. (2008). The NAD<sup>+</sup>-Dependent Deacetylase SIRT1 Modulates CLOCK- Mediated Chromatin Remodeling and Circadian Control. *Cell*, 134(2), 329–340. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M., & Sassone-Corsi, P. (2009). CIRCADIAN CONTROL OF THE NAD<sup>+</sup> SALVAGE PATHWAY BY CLOCK-SIRT1. *Science*, 324(5927), 654–657. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Nakano, A., Tietz, P. S., & Larusso, N. F. (1990). Circadian rhythms of biliary protein and lipid excretion in rats. *American Physiological Society*, 258, G653–G659.
- Nam, H. J., Boo, K., Kim, D., Han, D. H., Choe, H. K., Kim, C. R., Sun, W., Kim, H., Kim, K., Lee, H., Metzger, E., Schuele, R., Yoo, S. H., Takahashi, J. S., Cho, S., Son, G. H., & Baek, S. H. (2014). Phosphorylation of LSD1 by PKC $\alpha$  Is Crucial for Circadian Rhythmicity and Phase Resetting. *Molecular Cell*, 53(5), 791–805. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.028>
- Novak, B., & Tyson, J. J. (2008). Design Principles of Biochemical Oscillators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(12), 981–991. <https://doi.org/10.1038/nrm2530.Design>
- Oda, M., Koyanagi, S., Tsurudome, Y., Kanemitsu, T., & Matsunaga, N. (2014). Renal Circadian Clock Regulates the Dosing-Time Dependency of Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Mice. *Molecular Pharmacology*, 85(May), 715–722.
- Oda, S., Fukami, T., Yokoi, T., & Nakajima, M. (2015). A comprehensive review of UDP-glucuronosyltransferase and esterases for drug development. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 30(1), 30–51. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2014.12.001>
- Ohdo, S., Makinosumi, T., Ishizaki, T., Yukawa, E., Higuchi, S., Nakano, S., & Ogawa, N. (1997). Cell cycle-dependent chronotoxicity of irinotecan hydrochloride in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 283(3), 1383–1388.
- Ohsaki, K., Oishi, K., Kozono, Y., & Nakayama, K. (2008). The Role of beta-TrCP1 and beta-TrCP2 in Circadian Rhythm Generation by Mediating Degradation of

- Clock Protein PER2. *Japanese Biochemical Journal*, 144(5), 609–618.  
<https://doi.org/10.1093/jb/mvn112>
- Okamura, A., Koyanagi, S., Dilxiat, A., Kusunose, N., Chen, J. J., Matsunaga, N., Shibata, S., & Ohdo, S. (2014). Bile acid-regulated peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) activity underlies circadian expression of intestinal peptide absorption transporter PepT1/Slc15a1. *Journal of Biological Chemistry*, 289(36), 25296–25305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.577023>
- Okyar, A., Kumar, S. A., Filipinski, E., Piccolo, E., Ozturk, N., Xandri-Monje, H., Pala, Z., Abraham, K., Gomes, A. R. G. de J., Orman, M. N., Li, X.-M., Dallmann, R., Lévi, F., & Ballesta, A. (2019). Sex-, feeding-, and circadian time-dependency of P-glycoprotein expression and activity - implications for mechanistic pharmacokinetics modeling. *Scientific Reports*, 9(1).  
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-46977-0>
- Okyar, A., Piccolo, E., Ahowesso, C., Filipinski, E., Hossard, V., Guettier, C., la Sorda, R., Tinari, N., Iacobelli, S., & Lévi, F. (2011). Strain- and sex-dependent circadian changes in Abcc2 transporter expression: Implications for irinotecan chronotolerance in mouse ileum. *PLoS ONE*, 6(6), 1–9.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020393>
- Onat, O. E., Kars, M. E., Gül, Ş., Bilguvar, K., Wu, Y., Özhan, A., Aydın, C., Nazlı Başak, A., Allegra Trusso, M., Goracci, A., Fallerini, C., Renieri, A., Casanova, J. L., Itan, Y., Atbaşoğlu, C. E., Saka, M. C., Kavaklı, H., & Özçelik, T. (2020). Human CRY1 variants associate with attention deficit/hyperactivity disorder. *Journal of Clinical Investigation*, 130(7), 3885–3900.  
<https://doi.org/10.1172/JCI135500>
- Onodera, H., Kuruma, I., Ishitsuka, H., & Horii, I. (2000). Pharmacokinetic Study of Capecitabine in Monkeys and Mice; Species Differences in Distribution of the Enzymes Responsible for its Activation to 5-FU. *Xenobiotic Metabolism and Disposition*, 15(5), 439–451.
- Oster, H., Challet, E., Ott, V., Arvat, E., Kloet, E. R. De, Dijk, D., Lightman, S., Vgontzas, A., & Cauter, E. Van. (2017). The Functional and Clinical Significance of the 24-Hour Rhythm of Circulating Glucocorticoids. *Endocrine Reviews*, 38(1),

3–45. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1080>

- Oster, H., Damerow, S., Kiessling, S., Jakubcaková, V., Abraham, D., Tian, J., Hoffmann, M. W., & Eichele, G. (2006). The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. *Cell Metabolism*, 4(August), 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.07.002>
- Ozturk, D. (2019). *mTOR İnhibitörü Everolimusun Faredeki Kronofarmakokinetiği*. İstanbul Ünibersitesi Eczacılık Fakültesi.
- Öztürk, D. (2019). *mTOR İnhibitörü Everolimusun Faredeki Kronofarmakokinetiği*.
- Ozturk, N., Ozturk, D., Kavakli, I. H., & Okyar, A. (2017). Molecular aspects of circadian pharmacology and relevance for cancer chronotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(10). <https://doi.org/10.3390/ijms18102168>
- Pan, X., & Hussain, M. M. (2009). Clock is important for food and circadian regulation of macronutrient absorption in mice. *Journal of Lipid Research*, 50, 1800–1813. <https://doi.org/10.1194/jlr.M900085-JLR200>
- Pan, X., Zhang, Y., Wang, L., & Hussain, M. M. (2010). Diurnal regulation of MTP and plasma triglyceride by CLOCK is mediated by SHP. *Cell Metabolism*, 12(2), 174–186. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839>
- Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., Schultz, P. G., Kay, S. A., Takahashi, J. S., Hogenesch, J. B., & Diego, S. (2002). Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock. *Cell*, 109, 307–320.
- Paschos, G. K., & FitzGerald, G. A. (2010). Circadian clocks and vascular function. *Circulation Research*, 106(5), 833–841. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.211706>
- Patke, A., Murphy, P. J., Onat, O. E., Krieger, A. C., Özçelik, T., Campbell, S. S., & Young, M. W. (2017). Mutation of the Human Circadian Clock Gene CRY1 in Familial Delayed Sleep Phase Disorder. *Cell*, 169(2), 203–215.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.027>
- Petit, E., Milano, G., Levi, F., Thyss, A., Bailleul, F., & Schneider, M. (1988). Circadian Rhythm-varying Plasma Concentration of 5-Fluorouracil during a Five-

- Day Continuous Venous Infusion at a Constant Rate in Cancer Patients. *Cancer Research*, 48(6), 1676–1679.
- Pilancı, K. N., Saglam, S., Okyar, A., Yucel, S., Pala-Kara, Z., Ordu, C., Namal, E., Ciftci, R., Iner-Koksal, U., & Kaytan-Saglam, E. (2016). Chronomodulated oxaliplatin plus Capecitabine (XELOX) as a first line chemotherapy in metastatic colorectal cancer: A Phase II Brunch regimen study. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 78(1), 143–150. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3067-x>
- Porsin, B., Formento, J.-L., Filipinski, E., Etienne, M.-C., Francoual, M., Renee, N., Magne, N., Levi, F., & Milano, G. (2003). Dihydropyrimidine dehydrogenase circadian rhythm in mouse liver: comparison between enzyme activity and gene expression. *European Journal of Cancer*, 39, 822–828.
- Preitner, N., Damiola, F., 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, 251–260.
- Preußner, M., & Heyd, F. (2016). Post-transcriptional control of the mammalian circadian clock: implications for health and disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 468, 983–991. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1820-y>
- Quinney, S. K., Sanghani, S. P., Davis, W. I., Hurley, T. D., Sun, Z., Murry, D. J., & Bosron, W. F. (2005). Hydrolysis of capecitabine to 5'-deoxy-5-fluorocytidine by human carboxylesterases and inhibition by loperamide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 313(3), 1011–1016. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.081265>
- Ramsey, K. M., Yoshino, J., Brace, C. S., Abrassart, D., Kobayashi, Y., Marcheva, B., Hong, H., Chong, J. L., Ethan, D., Lee, C., Takahashi, J. S., Imai, S., & Bass, J. (2009). Circadian Clock Feedback Cycle Through NAMPT-Mediated NAD<sup>+</sup> Biosynthesis. *Science*, 324(5927), 651–654. <https://doi.org/10.1126/science.1171641>
- Reid, K. J., & Zee, P. C. (2009). Circadian rhythm disorders. *Seminars in Neurology*, 29(4), 393–405. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1237120>
- Reigner, B., Blesch, K., & Weidekamm, E. (2001). Clinical pharmacokinetics of

- capecitabine. *Clinical Pharmacokinetics*, 40(2), 85–104.  
<https://doi.org/10.2165/00003088-200140020-00002>
- Reigner, B., Cassidy, J., Jodrell, D., & Goggin, T. (1999). Influence of the antacid Maalox on the pharmacokinetics of capecitabine in cancer patients. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 43, 309–315.
- Reigner, B., Verweij, J., Dirix, L., Cassidy, J., Twelves, C., Aliman, D., Weidekamm, E., Roos, B., Banken, L., Utoh, M., & Osterwalder, B. (1998). Effect of Food on the Pharmacokinetics of Capecitabine and Its Metabolites following Oral Administration in Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 4(April), 941–948.
- Reinberg, A. E. (1992). Concepts in chronopharmacology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 32, 51–66.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.32.1.51>
- Ripperger, A., & Schibler, U. (2006). Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions. *Nature genetics*, 38(3), 369–374. <https://doi.org/10.1038/ng1738>
- Robles, M. S., Boyault, C., Knutti, D., Padmanabhan, K., & Weitz, C. J. (2010). Identification of RACK1 and protein kinase  $\text{Ca}$  as integral components of the mammalian circadian clock. *Science*, 327(5964), 463–466.  
<https://doi.org/10.1126/science.1180067>
- Roenneberg, T., & Merrow, M. (2005). Circadian clocks - The fall and rise of physiology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(12), 965–971.  
<https://doi.org/10.1038/nrm1766>
- Rohman, M. S., Emoto, N., Nonaka, H., Okura, R., Nishimura, M., Yagita, K., Van Der Horst, G. T. J., Matsuo, M., Okamura, H., & Yokoyama, M. (2005). Circadian clock genes directly regulate expression of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger NHE3 in the kidney. *Kidney International*, 67, 1410–1419. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00218.x>
- Roosendaal, J., Jacobs, B. A. W., Pluim, D., Rosing, H., de Vries, N., van Werkhoven, E., Nuijen, B., Beijnen, J. H., Huitema, A. D. R., Schellens, J. H. M., & Marchetti, S. (2020). Phase I pharmacological study of continuous chronomodulated capecitabine treatment. *Pharmaceutical Research*, 37(5).

<https://doi.org/10.1007/s11095-020-02828-6>

- Rustum, B. Y. M., Harstrick, A., Cao, S., Vanhoefer, U., Yin, M., Wilke, H., & Seeber, S. (1997). Thymidylate Synthase Inhibitors in Cancer Therapy: Direct and Indirect Inhibitors. *Journal of Clinical Oncology*, 15(1), 389–400.
- Sahar, S., & Sassone-Corsi, P. (2013). The Epigenetic Language of Circadian Clocks. İçinde *Handbook of Experimental Pharmacology, Circadian Clocks* (ss. 29–44). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-25950-0>
- Saif, M. W., Choma, A., Salamone, S. J., & Chu, E. (2009). Pharmacokinetically guided dose adjustment of 5-fluorouracil: A rational approach to improving therapeutic outcomes. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(22), 1543–1552. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp328>
- Saif, M. W., Syrigos, K. N., Katirtzoglou, N. A., Saif, M. W., Syrigos, K. N., & Katirtzoglou, N. A. (2009). Expert Opinion on Investigational Drugs S-1: a promising new oral fluoropyrimidine derivative S-1: a promising new oral fluoropyrimidine derivative. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(3), 335–348. <https://doi.org/10.1517/13543780902729412>
- Sakai, S., Kobuchi, S., Ito, Y., & Sakaeda, T. (2020). Assessment of pharmacokinetic variations of capecitabine after multiple administration in rats: a physiologically based pharmacokinetic model. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00280-020-04057-5>
- Sancar, A., Lindsey-boltz, L. A., Gaddameedhi, S., Selby, C. P., Ye, R., Chiou, Y., Kemp, M. G., Hu, J., Lee, J. H., & Ozturk, N. (2015). *Circadian Clock, Cancer, and Chemotherapy*.
- Santini, D., Vincenzi, B., Schiavon, G., Di Seri, M., Virzì, V., Spalletta, B., Caricato, M., Coppola, R., & Tonini, G. (2007). Chronomodulated administration of oxaliplatin plus capecitabine (XELOX) as first line chemotherapy in advanced colorectal cancer patients: Phase II study. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 59(5), 613–620. <https://doi.org/10.1007/s00280-006-0302-x>
- Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., Mcnamara, P., Naik, K. A., Fitzgerald, G. A., Kay, S. A., & Hogenesch, J. B. (2004). A Functional Genomics Strategy Reveals Rora as a Component of the Mammalian Circadian

- Clock. *Nueron*, 43, 527–537.
- Scheving, E., & Pauly, E. (1968). Circadian fluctuation in plasma proteins of the rat. *American Journal of Physiology*, 215(5), 1096–1101.
- Schibler, U., & Naef, F. (2005). Cellular oscillators : rhythmic gene expression and metabolism. *Current Opinion in Cell Biology*, 17, 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.01.007>
- Schüller, J., Cassidy, J., Dumont, E., Roos, B., Weidekamm, E., Reigner, B., Durston, S., Banken, L., Utoh, M., & Mori, K. (2000). Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 45(4), 291–297. <https://doi.org/10.1007/s002800050043>
- Selfridge, J. M., Gotoh, T., Schiffhauer, S., Liu, J. J., Stauffer, P. E., Li, A., Capelluto, D. G. S., & Finkielstein, C. V. (2016). Chronotherapy: Intuitive, Sound, Founded...But Not Broadly Applied. *Drugs*, 76(16), 1507–1521. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0646-4>
- Shearman, L. P., Sriram, S., David, R., Maywood, E. S., Hastings, M. H., & Steven, M. (2000). Interacting Molecular Loops in the Mammalian Circadian Clock. *Science*, 288.
- Shiga, T., Fujimura, A., Tateishi, T., Ohashi, K., & Ebihara, A. (1993). Differences of Chronopharmacokinetic Profiles Between Propranolol and Atenolol in Hypertensive Subjects. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 33(8), 756–761. <https://doi.org/10.1002/j.1552-4604.1993.tb05620.x>
- Shindoh, H., Kawashima, A., Shishido, N., & Nakano, K. (2006). Relationship between AUC of 5'-DFUR and toxicity of capecitabine, fluoropyrimidine carbamate analogs, and 5'-DFUR in monkeys, mice, and rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 31(3), 265–285.
- Shindoh, H., Nakano, K., Yoshida, T., & Ishigai, M. (2011). *Comparison of in vitro metabolic conversion of capecitabine to 5-FU in rats , mice , monkeys and humans – toxicological implications*. 36(4), 411–422.
- Shiokawa, R., Lee, X. P., Yamada, M., Fujishiro, M., Sakamaki, H., Hasegawa, C.,

- Ishida, H., Ikeda, K., Fujita, K. ichi, Iwabuchi, S., Onda, H., Kumazawa, T., Sasaki, Y., Sato, K., & Matsuyama, T. (2019). High-throughput method to analyze tegafur and 5-fluorouracil in human tears and plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 33(24), 1906–1914. <https://doi.org/10.1002/rcm.8531>
- Shirogane, T., Jin, J., Ang, X. L., & Harper, J. W. (2005). SCF $\beta$ -TRCP Controls Clock-dependent Transcription via Casein Kinase 1-dependent Degradation of the Mammalian Period-1 ( Per1 ) Protein\*. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(29), 26863–26872. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502862200>
- Sinal, C. J., Yoon, M., & Gonzalez, F. J. (2001). Antagonism of the Actions of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- $\alpha$  by Bile Acids. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 47154–47162. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107000200>
- Smolensky, M. H., Lemmer, B., & Reinberg, A. E. (2007). *Chronobiology and chronotherapy of allergic rhinitis and bronchial asthma* ☆. 59, 852–882. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.08.016>
- Smolensky, M. H., & Peppas, N. A. (2007). Chronobiology, drug delivery, and chronotherapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(9–10), 828–851. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.07.001>
- Takabe, S., Mochizuki, K., & Goda, T. (2008). De-phosphorylation of GR at Ser203 in nuclei associates with GR nuclear translocation and GLUT5 gene expression in Caco-2 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 475, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.03.036>
- 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>
- Tampellini, M., Filipski, E., Liu, X. H., Lemaigre, G., Li, X. M., Vrignaud, P., Frană, E., Bissery, M. C., & Levi, F. (1998). Docetaxel Chronopharmacology in Mice. *Cancer Research*, 58, 3896–3905.
- Thompson, P. W., James, I. T., Wheatcroft, S., Pownall, R., & Barnes, C. G. (1989). Circadian rhythm of serum cytidine deaminase in patients with rheumatoid arthritis during rest and exercise. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 48(6), 502–504.

<https://doi.org/10.1136/ard.48.6.502>

- Toh, K. L., Jones, C. R., He, Y., Eide, E. J., Hinz, W. A., Virshup, D. M., Ptáček, L. J., & Fu, Y. H. (2001). An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*, 291(5506), 1040–1043. <https://doi.org/10.1126/science.1057499>
- Twelves, C., Glynne-jones, R., Cassidy, J., Schu, J., Goggin, T., Roos, B., Banken, L., Utoh, M., Weidekamm, E., & Reigner, B. (1999). Effect of Hepatic Dysfunction due to Liver Metastases on the Pharmacokinetics of Capecitabine and Its Metabolites. *Clinical Cancer Research*, 5(July), 1696–1702.
- Üstünes, L. (2020). Xeloda Roche 150 mg film kaplı tablet. İçinde Rx MediaPharma *İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı*. İzmir.
- Wada, E., Koyanagi, S., Kusunose, N., Akamine, T., Masui, H., Hashimoto, H., Matsunaga, N., & Ohdo, S. (2015). Modulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\alpha$  Activity by Bile Acids Causes Circadian Changes in the Intestinal Expression of Octn1/Slc22a4 in Mice. *Molecular Pharmacology*, 87, 314–322. <https://doi.org/10.1124/mol.114.094979>
- Walko, C. M., & Lindley, C. (2005). Capecitabine: A review. *Clinical Therapeutics*, 27(1), 23–44. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2005.01.005>
- Wang, R., Jiang, X., Bao, P., Qin, M., & Xu, J. (2019). Circadian control of stress granules by oscillating EIF2 $\alpha$ . *Cell Death and Disease*, 10(3). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1471-y>
- Wolff, G., & Esser, K. A. (2012). Scheduled Exercise Phase Shifts the Circadian Clock in Skeletal Muscle. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 44(9), 1663–1670. <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e318255cf4c.Scheduled>
- Wood, P. A., Du-Quinton, J., You, S., & Hrushesky, W. J. M. (2006). Circadian clock coordinates cancer cell cycle progression, thymidylate synthase, and 5-fluorouracil therapeutic index. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(8), 2023–2033. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-06-0177>
- Xeloda. (2021). Product Monograph. Roche Canada, 1–30.
- Xu, Y., Padiath, Q. S., Shapiro, R. E., & Jones, C. R. (2005). Functional consequences

- of a CK1 $\delta$  mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature*, 434(MARCH), 640–644.
- Yamamoto, T., Nakahata, Y., Soma, H., Akashi, M., Mamine, T., & Takumi, T. (2004). Transcriptional oscillation of canonical clock genes in mouse peripheral tissues. *BMC Molecular Biology*, 5(18), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-5-18>
- Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R. I., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., & Tei, H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, 288, 682–685. <https://doi.org/10.1126/science.288.5466.682>
- Yamazaki, S., Yoshikawa, T., Biscoe, E. W., Numano, R., Gallsby, L. M., Soulsby, S., Papadimas, E., Pezuk, P., Susan, E., Tei, H., Sakaki, Y., Block, G. D., & Menaker, M. (2009). Ontogeny of Circadian Organization in the Rat. *Journal of Biological Rhythms*, 24(1), 55–63. <https://doi.org/10.1177/0748730408328438>. Ontogeny
- 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 and Development*, 28(18), 1989–1998. <https://doi.org/10.1101/gad.249417>. 114
- Yoo, S.-H., Mohawk, J. A., Siepka, S. M., Shan, Y., HuhHuh, S. K., Hong, H., Kornblum, I., Kumar, V., Koike, N., & Takahashi, J. S. (2013). Competing E3 Ubiquitin Ligases Determine Circadian Period by Regulated Degradation of CRY in Nucleus and Cytoplasm. *Cell*, 152(5), 1091–1105. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.01.055>. Competing
- 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 of the United States of America*, 101(15), 5339–5346. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308709101>
- Zawilska, J. B., Skene, D. J., & Arendt, J. (2009). Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. *Pharmacological Reports*, 61, 383–410. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70081-7](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70081-7)

- Zhang, E. E., Liu, Y., Dentin, R., Pongsawakul, P. Y., Liu, A. C., Hirota, T., Nusinow, D. A., Sun, X., Landais, S., Kodama, Y., Brenner, D. A., Montminy, M., & Kay, S. A. (2010). Cryptochrome Mediates Circadian Regulation of cAMP Signaling and Hepatic Gluconeogenesis. *Nature Medicine*, 16(10), 1152–1156. <https://doi.org/10.1038/nm.2214>.Cryptochrome
- Zhang, N., Yin, Y., Xu, S.-J., & Chen, W.-S. (2008). 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules*, 13, 1551–1569. <https://doi.org/10.3390/molecules13081551>
- Zhang, R., Lahens, N. F., Ballance, H. I., Hughes, M. E., & Hogenesch, J. B. (2014). A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(45), 16219–16224. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408886111>
- Zhang, Y., Fang, B., Emmett, M. J., Damle, M., Sun, Z., Feng, D., Armour, S. M., Remsberg, J. R., Jager, J., Soccio, R. E., Steger, D. J., & Lazar, M. a. (2015). Discrete Functions of Nuclear Receptor Rev-erba Couple Metabolism To the Clock. *Science*, 348(6242), 1488–1492. <https://doi.org/10.1126/science.aab3021>.Discrete
- Zhang, Y. K. J., Yeager, R. L., & Klaassen, C. D. (2009). Circadian expression profiles of drug-processing genes and transcription factors in mouse liver. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(1), 106–115. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.024174>
- Zisapel, N. (2007). Sleep and sleep disturbances: Biological basis and clinical implications. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1174–1186. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6529-9>
- Zisapel, N. (2018). New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *British Journal of Pharmacology*, 175, 3190–3199. <https://doi.org/10.1111/bph.14116>

**ETİK KURUL KARARI**

## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

### KAPESİTABİNİN FAREDEKİ KRONOFARMAKOKİNETİĞİNİN İNCELENMESİ

#### ORJİNALLİK RAPORU

|                   |                     |            |                  |
|-------------------|---------------------|------------|------------------|
| % <b>6</b>        | % <b>4</b>          | % <b>2</b> | % <b>2</b>       |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR   | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

|          |                                                                                                                                                                                               |             |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>1</b> | <b>nek.istanbul.edu.tr:4444</b><br>İnternet Kaynağı                                                                                                                                           | % <b>1</b>  |
| <b>2</b> | <b>Submitted to Haliç Üniversitesi</b><br>Öğrenci Ödevi                                                                                                                                       | <% <b>1</b> |
| <b>3</b> | <b>www.ilacsorgulama.net</b><br>İnternet Kaynağı                                                                                                                                              | <% <b>1</b> |
| <b>4</b> | <b>Submitted to Istanbul University</b><br>Öğrenci Ödevi                                                                                                                                      | <% <b>1</b> |
| <b>5</b> | <b>Yue Zhao, Min Liu, Xue Ying Chan, Sue Yee Tan et al. "Uncovering the mystery of opposite circadian rhythms between mouse and human leukocytes in humanized mice", Blood, 2017</b><br>Yayın | <% <b>1</b> |
| <b>6</b> | <b>Submitted to The Scientific &amp; Technological Research Council of Turkey (TUBITAK)</b><br>Öğrenci Ödevi                                                                                  | <% <b>1</b> |
| <b>7</b> | <b>Narin Ozturk, Dilek Ozturk Civelek, Serap Sancar, Engin Kaptan, Zeliha Pala Kara, Alper</b>                                                                                                | <% <b>1</b> |

## ÖZGEÇMİŞ

