

← 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)

**mTOR İNHİBİTÖRÜ EVEROLİMUSUN FAREDEKİ
KRONOFARMAKOKİNETİĞİ**

DİLEK ÖZTÜRK

**DANIŞMAN
PROF. DR. ALPER OKYAR**

**FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

DOKTORA TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Farmakoloji Programında Doktora öğrencisi Dilek Öztürk tarafından Prof. Dr. Alper Okyar'ın danışmanlığında hazırlanan "mTOR İnhibitörü Everolimusun Faredeki Kronofarmakokinetiği" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 10/10/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



Jüri Başkanı

Prof. Dr. B. Sönmez UYDEŞ DOĞAN
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı



Jüri-Danışman

Prof. Dr. Alper OKYAR
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı



Jüri

Prof. Dr. V. Melih ALTAN
Bezmialem Vakıf Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı



Jüri

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı



Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Zeliha PALA KARA
İstanbul Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Farmakoloji Anabilim Dalı

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.



Dilek Öztürk

İTHAF



Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamamasında beni destekleyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli danışman hocam Prof. Dr. Alper Okyar’a,

Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Sönmez Uydeş Doğan’a ve doktora ders sürecimde büyük katkıları olan Farmakoloji Anabilim Dalı’ndaki değerli hocalarım ve arkadaşlarıma,

Değerli görüşlerini esirgemeyen, her zaman yol göstericiliklerinden yararlandığım sevgili hocalarım Prof. Dr. Melih Altan ve Prof. Dr. Feyza Arıcıoğlu’na,

Tez çalışmalarım süresince desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Narin Öztürk, Ecz. Kübra Akyel, Uzm. Ecz. Ferdi Öztürk ve değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Zeliha Pala Kara’ya,

Moleküler çalışmalardaki katkıları ve öğrettiği her şey için Dr. Beyza Göncü’ye ve analitik tekniklerdeki her türlü yardımı için Dr. Öğr. Üyesi Işıl Gazioğlu’na,

Deneylerim süresince her türlü desteği sağlayan ve Fakültemiz olanaklarını kullanmamı mümkün kılan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Gülaçtı Topçu’ya ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’ndeki tüm hocalarım ve arkadaşlarıma,

Deneylerimin bir bölümünü gerçekleştirdiğim Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü ve çalışanlarına, hayvanların temini sırasında yardımcı olan Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı sorumlu hekimi ve çalışanlarına,

Her zaman destekleyen, fikirlerini paylaşan, yol arkadaşım Erkan Civelek’e,

Tüm hayatım boyunca destekleri ve sonsuz sevgileri ile her zaman yanımda olan canım annem ve babam Behiye-Sebahattin Öztürk’e, canım ablam ve abim Nezate-Serkan Dadakoğlu’na, canım teyzem Emine Hacıoğlu’na ve hayatıma neşe kattıkları için miniklerim Defne ve İpek’e,

Çok Teşekkür Ederim.

Bu alışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu-TÜBİTAK (Proje No: 216S475), İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: YP-24831) ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: 6.2015/25) tarafından desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

DOKTORA TEZİ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xvi
ÖZET	xx
ABSTRACT.....	xxi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sirkadiyan Zamanlama Sistemi ve Moleküler Saat	4
2.1.1. Sirkadiyan Zamanlama Sistemi	4
2.1.2. Moleküler Saat	6
2.2. Kronofarmakoloji.....	8
2.2.1. Kronofarmakokinetik	8
2.2.1.1. Absorpsiyon	12
2.2.1.2. Dağılım.....	13
2.2.1.3. Metabolizma.....	15
2.2.1.4. Eliminasyon.....	26
2.2.2. Kronofarmakodinamik	27
2.2.3. Kronotoksiste	30
2.3. Everolimus	32
2.3.1. Tanımı	32
2.3.2. Farmakodinamik Özellikleri	32
2.3.3. Farmakokinetik Özellikleri	34
2.3.3.1. Absorpsiyon	34
2.3.3.2. Dağılım.....	35
2.3.3.3. Metabolizma.....	36

2.3.3.4. Eliminasyon.....	37
2.3.3.5. Kararlı Durum Farmakokinetiği.....	37
2.3.3.6. Deney Hayvanlarında Yapılan Diğer Çalışmalar.....	38
2.3.3.7. Farmakokinetik İlaç Etkileşmeleri	40
2.3.4. Everolimusun Endikasyon, Kontrendikasyon ve Yan Etkileri	41
2.3.4.1. Endikasyonları.....	41
2.3.4.2. Kontrendikasyonları.....	44
2.3.4.3. Yan Etkileri	44
2.3.5. mTOR Yolağının Sirkadiyan Ritim ile İlişkisi	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
3.1. Materyal	49
3.1.1. Kimyasallar	49
3.1.2. Ekipman ve cihazlar.....	51
3.1.3. İstatistiksel Programlar	52
3.2. Analitik Metod Geliştirilmesi ve Validasyonu	52
3.2.1. Stok ve Çalışma Standart Çözeltilerinin Hazırlanması.....	52
3.2.2. Mobil Fazın Optimizasyonu.....	52
3.2.3. İnternal Standardın Seçimi.....	52
3.2.4. Ekstraksiyon Metodunun Optimizasyonu	53
3.2.5. Metot Validasyonu	53
3.3. Everolimusun Kronofarmakokinetiği (Tek Doz Uygulama)	54
3.3.1. Deney Hayvanları ve Senkronizasyon	54
3.3.2. Deney Grupları, İlaç Uygulaması ve Deneysel Çalışmalar	55
3.3.3. Plazma ve Karaciğer Örneklerinin Analizi	56
3.3.4. İleum, Timus ve Testis Örneklerinin Analizi.....	57
3.3.5. Farmakokinetik Parametrelerin Hesaplanması ve İstatistiksel Değerlendirme	57
3.4. Zamana Bağlı Subakut Everolimus Uygulamasının P-Glikoprotein mRNA ve Protein Düzeylerine Etkisi ve Everolimus Kronofarmakokinetiği (Tekrarlı Doz Uygulama).....	58
3.4.1. Deney Hayvanları ve Senkronizasyon	58
3.4.2. Deney Grupları, İlaç Uygulaması ve Deneysel Çalışmalar	58
3.4.3. Farelerin Feda Edilmesi ve Dokuların Çıkarılması.....	59

3.4.4. Plazmadan ve Dokulardan Everolimus Tayini ve Everolimus Konsantrasyonlarının Hesaplanması.....	59
3.4.5. mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi	60
3.4.5.1. Karaciğer ve ileum dokularından RNA izolasyonu	60
3.4.5.2. Karaciğer ve ileum dokularından cDNA sentezi	60
3.4.5.3. Karaciğer ve ileum dokularından Abcb1a ve Abcb1b mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi	61
3.4.6. Protein ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi	62
3.4.6.1. Karaciğerden protein izolasyonu.....	62
3.4.6.2. İleumdan protein izolasyonu	62
3.4.6.3. Western Blotting İşlemi	62
3.4.7. İstatistiksel Analiz.....	64
4. BULGULAR.....	65
4.1. Validasyon sonuçları.....	65
4.1.1. Plazma HPLC metodu validasyon sonuçları.....	65
4.1.2. Karaciğerden HPLC metodu validasyon sonuçları.....	66
4.2. Everolimusun Kronofarmakokinetiği (Tek Doz Uygulama)	68
4.2.1. Vücut Sıcaklığı Ölçümleri	68
4.2.2. Everolimusun Plazma Konsantrasyon Verileri ve Farmakokinetik Parametreleri	69
4.2.3. Everolimusun Karaciğer Konsantrasyon Verileri ve Farmakokinetik Parametreleri	81
4.2.3.1. Karaciğer/Plazma Oranları.....	86
4.2.4. Everolimusun İleum Konsantrasyon Verileri ve Farmakokinetik Parametreleri	89
4.2.4.1. İleum/Plazma Oranı	94
4.2.5. Everolimusun Timus Konsantrasyon Verileri ve Farmakokinetik Parametreleri	97
4.2.5.1. Timus/Plazma Oranları	99
4.2.6. Everolimusun Testis Konsantrasyon Verileri ve Farmakokinetik Parametreleri	100
4.2.6.1. Testis/Plazma Oranları	101
4.3. Everolimusun Kronofarmakokinetiği (Tekrarlı Doz Uygulama)	102
4.3.1. Deney hayvanlarının günlük ağırlık değişimi	102

4.3.2. Plazma everolimus kararlı-durum düzeyi	104
4.3.3. Zamana bağlı subakut everolimus uygulamasının P-glikoprotein mRNA ve protein düzeylerine etkisi	104
4.3.3.1. Zamana bağlı subakut everolimus uygulamasının karaciğerde abcb1a/b mRNA ve P-glikoprotein düzeylerine etkisi	104
4.3.3.2. Zamana bağlı subakut everolimus uygulamasının ileumda abcb1a/b mRNA ve P-glikoprotein düzeylerine etkisi.....	107
5. TARTIŞMA	111
KAYNAKLAR	126
ETİK KURUL KARARI	144
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	146
ÖZGEÇMİŞ	147

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1 Antikanser ilaçlarla yapılmış bazı klinik kronofarmakokinetik çalışmalar.....	10
Tablo 2: CYP 450 enzimlerinin mRNA, protein veya aktivitelerinin zamana bağlı değişimi.....	18
Tablo 3: ABC taşıyıcı protein ailesinin mRNA, protein veya aktivitelerinin zamana bağlı değişimi.....	22
Tablo 4: Antikanser ilaçların hedefi olan bazı proteinlerin mRNA, protein veya aktivitelerinin zamana bağlı değişimi	28
Tablo 5: Antikanser ilaçların kronotoksitesine örnek bazı klinik çalışmalar.....	31
Tablo 6: Everolimusun çeşitli türlerdeki farmakokinetik parametre değerleri.....	35
Tablo 7: Everolimusa ait klinik çalışmalardan elde edilen advers ilaç reaksiyonları.....	42
Tablo 8: Plazma ve karaciğerden everolimus tayini için geliştirilen HPLC metodunda kullanılan cihazlar, çalışmaya ait kromatografik koşullar ve çalışmada kullanılan materyaller.	53
Tablo 9: Deney grupları ve kullanılan deney hayvanı sayısı.....	56
Tablo 10: Deney grupları ve kullanılan deney hayvanı sayısı.....	58
Tablo 11: Hazırlanan cDNA reaksiyon karışımı	60
Tablo 12: Primer dizileri ve erime sıcaklığı değerleri.	61
Tablo 13: Jel elektroforezi için kullanılan tamponların içerik ve miktarları	62
Tablo 14: Transfer aşaması için kullanılan tamponların içerik ve miktarları.....	63
Tablo 15: Plazmadan everolimus tayini için geliştirilen HPLC metodunun validasyon verileri.....	65
Tablo 16: Karaciğerden everolimus tayini için geliştirilen HPLC metodunun validasyon verileri.....	67
Tablo 17: Everolimusun plazma farmakokinetik verileri	80
Tablo 18: Everolimusun karaciğer dokusuna ait farmakokinetik verileri	86
Tablo 19: Everolimusun ileum dokusuna ait farmakokinetik verileri	93
Tablo 20: Everolimusun timus dokusuna ait farmakokinetik verileri	98
Tablo 21: Everolimusun testis dokusuna ait farmakokinetik verileri	101

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Sirkadiyan Zamanlama Sistemi	5
Şekil 2: Moleküler Saat.....	7
Şekil 3: Moleküler Saatin İlaçların Farmakolojisine Etkisi.....	9
Şekil 4: Everolimusun yapısal formülü	32
Şekil 5: Dijital termometre ve rektal yoldan sıcaklık ölçmek için prob ile farede sıcaklık ölçümü.	55
Şekil 6: Oasis HLB kartuşları, ekstraksiyon tablası ve vakum manifold cihazı.....	57
Şekil 7: Everolimus plazma standartlarının pik alanı-konsantrasyon kalibrasyon eğrisi.	65
Şekil 8: Fare boş plazma örneklerinin ekstraksiyonu ve HPLC sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram.	66
Şekil 9: Fare plazmasına spike edilen everolimus standardı (5 µg/ml) ve internal standart repaglinide (5 µg/ml) ait kromatogram.	66
Şekil 10: Everolimus karaciğer standartlarının pik alanı-konsantrasyon kalibrasyon eğrisi.....	67
Şekil 11: Boş karaciğer homojenatlarının ekstraksiyonu ve HPLC sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram.	67
Şekil 12: Fare karaciğer homojenatına spike edilen everolimus standardı (5 µg/ml) ve internal standart repaglinide (5 µg/ml) ait kromatogram.....	68
Şekil 13: Vücut sıcaklığının karanlık (aktivite) – aydınlık (dinlenme) periyotlarındaki değişimi.....	69
Şekil 14: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen erkek (A) ve dişi (B) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma konsantrasyon-zaman grafikleri.....	70
Şekil 15: ZT1 ve ZT13 zamanlarında aç bırakılan erkek (A) ve dişi (B) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma konsantrasyon-zaman grafikleri.	71
Şekil 16: ZT1 ve ZT13 zamanlarında aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen karşılaştırmalı plazma konsantrasyon-zaman grafikleri.	72

Şekil 17: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen (A) veya aç bırakılan (B) erkek (C) ve dişi (D) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma AUC ₀₋₂₄ verileri.	73
Şekil 18: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen veya aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma AUC ₀₋₂₄ verileri.	74
Şekil 19: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen (A) veya aç bırakılan (B) erkek (C) ve dişi (D) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma AUC _{total} verileri.	74
Şekil 20: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen veya aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma AUC _{total} verileri.	75
Şekil 21: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen (A) veya aç bırakılan (B) erkek (C) ve dişi (D) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma t _{1/2} verileri.	76
Şekil 22: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen veya aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma t _{1/2} verileri.	76
Şekil 23: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen (A) veya aç bırakılan (B) erkek (C) ve dişi (D) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma total klirens (Cl/F) verileri.	77
Şekil 24: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen veya aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma Cl/F verileri....	78
Şekil 25: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen (A) veya aç bırakılan (B) erkek (C) ve dişi (D) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma dağılım hacmi (Vd/F) verileri.	78
Şekil 26: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen veya aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma Vd/F verileri. .	79
Şekil 27: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen erkek (A) ve dişi (B) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen karaciğer konsantrasyon-zaman grafikleri.	82
Şekil 28: ZT1 ve ZT13 zamanlarında aç bırakılan erkek (A) ve dişi (B) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma konsantrasyon-zaman grafikleri.	82

Şekil 29: ZT1 ve ZT13 zamanlarında aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen karşılaştırmalı karaciğer konsantrasyon-zaman grafikleri.	83
Şekil 30: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen (A) veya aç bırakılan (B) erkek (C) ve dişi (D) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen karaciğer AUC ₀₋₂₄ verileri.....	84
Şekil 31: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen veya aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen karaciğer AUC ₀₋₂₄ verileri.....	85
Şekil 32: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen erkek (A) ve dişi (B) veya açlık koşullarındaki erkek (C) ve dişi (D) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen karaciğer ve plazma konsantrasyonlarından hesaplanan karaciğer/plazma oranları.....	88
Şekil 33: Tüm grupların karşılaştırmalı karaciğer/plazma oranları	89
Şekil 34: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen veya aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen ileum konsantrasyon-zaman grafikleri.	90
Şekil 35: ZT1 ve ZT13 zamanlarında aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen karşılaştırmalı ileum konsantrasyon-zaman grafikleri.	91
Şekil 36: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen (A) veya aç bırakılan (B) erkek (C) ve dişi (D) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen ileum AUC ₀₋₂₄ verileri.	92
Şekil 37: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen veya aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen ileum AUC ₀₋₂₄ verileri.....	93
Şekil 38: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen ve açlık koşullarında, farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen ileum ve plazma konsantrasyonlarından hesaplanan ileum/plazma oranları.	95
Şekil 39: Tüm grupların karşılaştırmalı ileum/plazma oranları.....	96
Şekil 40: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen timus konsantrasyon-zaman grafikleri.	97
Şekil 41: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen timus AUC ₀₋₂₄ verileri.	98

Şekil 42: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen timus ve plazma konsantrasyonlarından hesaplanan timus/plazma oranları.....	99
Şekil 43: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen erkek farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen testis konsantrasyon-zaman grafikleri.....	100
Şekil 44: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen erkek farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen testis AUC ₀₋₂₄ verileri.....	100
Şekil 45: ZT1 ve ZT13 zamanlarında <i>ad libitum</i> beslenen farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen testis ve plazma konsantrasyonlarından hesaplanan testis /plazma oranları.	101
Şekil 46: ZT1 ve ZT13 grubu erkek farelerde everolimus uygulamasının başlangıç gününe kıyasla % vücut ağırlığı değişimleri.....	102
Şekil 47: ZT1 ve ZT13 grubu dişi farelerde everolimus uygulamasının başlangıç gününe kıyasla % vücut ağırlığı değişimleri	103
Şekil 48: ZT1 ve ZT13 zamanlarında dişi ve erkek farelere 14 gün boyunca 5 mg/kg everolimus uygulaması sonrası ölçülen kararlı durum plazma everolimus konsantrasyonlarından elde edilen AUC _{ss}	104
Şekil 49: ZT1 ve ZT13 zamanında everolimus uygulanmış veya kontrol grubu erkek (A) ve dişi (B) farelerde karaciğer Abcb1a mRNA düzeyleri.....	105
Şekil 50: ZT1 ve ZT13 zamanında everolimus uygulanmış veya kontrol grubu erkek (A) ve dişi (B) farelerde karaciğer Abcb1b mRNA düzeyleri.	106
Şekil 51: ZT1 ve ZT13 zamanında everolimus uygulanmış veya kontrol grubu erkek ve dişi farelerde karaciğer P-glikoprotein protein ekspresyonu düzeyleri (n=5-8).	107
Şekil 52: ZT1 ve ZT13 zamanında everolimus uygulanmış veya kontrol grubu erkek (A) ve dişi (B) farelerde ileum Abcb1a mRNA düzeyleri	108
Şekil 53: ZT1 ve ZT13 zamanında everolimus uygulanmış veya kontrol grubu erkek (A) ve dişi (B) farelerde ileum Abcb1b mRNA düzeyleri	109
Şekil 54: ZT1 ve ZT13 zamanında everolimus uygulanmış veya kontrol grubu erkek ve dişi farelerde ileum P-glikoprotein protein ekspresyonu düzeyleri.	110

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- SZS:** Sirkadiyan zamanlama sistemi (CTS: Circadian Timing System)
- SKÇ:** Suprakiazmatik çekirdek (SCN; Suprachiasmatic nucleus)
- RAD001:** Everolimus, SDZ-RAD
- mTOR:** Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (Mammalian target of rapamycin)
- mTORC1:** mTOR-raptor sinyal iletim kompleksi 1 (mTOR Complex-1)
- AKT (PKB):** Protein kinaz B (PI3K sinyalizasyon yolağının bir bileşeni)
- RAPTOR:** Regulatory Associated Protein of mTOR
- ZT:** Zeitgeber Time (Zaman Verici, Ritim Verici)
- Clock:** Circadian locomotor output cycles kaput
- Bmal1 (Arntl):** Brain-muscle-arnt-like 117 protein 1
- Npas2:** Neuronal PAS domain protein 2
- Per:** Period
- Cry:** Kriptokrom (Cryptochrome)
- bHLH-PAS:** Basic helix-loop-helix –PAS transkripsiyon faktör ailesi
- E-box:** Enhancer box
- ROR α :** Retinoid ilişkili yetim reseptöre alfa (Retinoid-related orphan receptor-alpha)
- REV-ERB α :** Nükleer reseptör Rev-Erb alfa (Nuclear receptor Rev-Erb alpha)
- RORE:** Retinoik asit ilişkili yetim reseptöre (Retinoic acid-related orphan receptor) response element
- CK1 ϵ :** Kazein Kinaz 1 ϵ
- CK1 δ :** Kazein kinaz 1 δ
- Alas1:** 5-amino- δ -levulinik asit sentetaz
- mRNA:** Mesajcı ribonükleik asit
- DBP:** Albümin D bölgesi bağlayıcı protein (Albumin D-site-binding protein)
- TEF:** Tirotrop embriyonik faktör (Thyrotroph embryonic factor)
- HLF:** Hepatik lösemi faktörü (Hepatic leukemia factor)
- E4BP4:** E4 promotör bağlayıcı protein 4 (E4 promoter binding protein-4)
- PAR bZIP:** Proline-acidic amino acid-rich basic leucine zipper transkripsiyon faktörü
- ABC:** ATP-binding cassette (ATP-bağlayıcı kaset) süper ailesi

P-gp: P-glikoprotein

MDR1: Multidrug resistance protein 1 (İnsanda ABCB1, MDR1, P-glikoprotein, P-gp)

Mdr1: Multidrug resistance protein 1 (Farede abcb1a ve abcb1b veya mdr1a ve mdr1b, P-gp)

MRP1: Multidrug resistance-associated protein 1 (Çoklu ilaç direnci ilişkili protein 1)

MRP2 (cMOAT): Canalicular multispecific organic anion transporter (Çoklu ilaç direnci ilişkili protein 2)

BCRP: Breast cancer resistance protein (Meme kanseri rezistans proteini)

Bcl-2: B-cell lymphoma 2 (B-hücreli lenfoma 2)

Bax: BCL2-associated X protein

AUC: Konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alan (The area under the concentration-time curve)

C_{maks}: Maksimum kan konsantrasyonu

C_{min}: Minimum kan konsantrasyonu

t_{maks}: Maksimum kan konsantrasyonuna ulaşma zamanı

t_{1/2}: Eliminasyon yarılanma ömrü

Vd/F: Dağılım hacmi

Cl/F: Oral klerens

k_{el}: Eliminasyon hız sabiti

C_{ss}: Kararlı durum konsantrasyonu

CYP450: Sitokrom P450 enzimleri

CAR: Konstitütif androstan reseptörü (Constitutive androstane receptor)

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

Caco-2: İnsan kolon adenokarsinom hücreleri

5-FU: 5-fluorourasil

SEGA: Subependymal dev hücreli astrositoma (Subependymal giant cell astrocytoma)

HER: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörleri 1-4, HER1-4 ailesi

P70S6K veya S6K1: S6 ribozomal protein kinaz

4E-BP: 4E bağlayıcı protein (4E-binding protein)

4EBP1 (PHAS1): Phosphorylated Heat-stable and Acid-Stable protein

eIF4EBP1: Eukaryotic Translation Initiation Factor-4E-Binding Protein-1

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

FKBP-12: FK506 bağlayıcı protein 12

IC50: İstenen etkinin %50'sini inhibe eden konsantrasyon (Inhibitor Concentration %50)

i.v.: İntravenöz

p.o.: Oral yoldan (Per oral)

Vss: Kararlı durum dağılım hacmi

HPLC-UV: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi-ultraviyole dedektör

DNA: Deoksiribonükleik asit

ARNTL: Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1

NR1D1: Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 1, REV-ERB α

NR1D2: Nuclear Receptor Subfamily 1 Group D Member 2, REV-ERB β

NFIL3: Nükleer faktör-interlökin-3

CCG: Saat kontrollü gen (Clock controlled gene)

FD: Farmakodinamik

UGT: UDP-glukuronozil transferaz

GST: Glutation-S-transferaz

SULT: Sülfotransferaz

NAT: N-asetil transferaz

SLC: Solüt taşıyıcılar

POR: P450 oksidoredüktaz

ALAS1: Aminolevulinik asit sentaz

Ahr: Aril hidrokarbon reseptörü

PXR: Pregnan X reseptörü

RT-PZR: Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu

HepG2: İnsan hepatoma hücre hattı

Ces: Karboksilesteraz

DPYD: Dihidropirimidin dehidrojenaz

TS: Timidilat sentaz

GSH: Glutasyon S-transferaz

GFR: Glomerüler filtrasyon hızı

TOP1: Topoizomeraz-1

PBMC: Periferik kan mononükleer hücre

MDCK: Madin-Darby köpek böbrek hücreleri
RHK: Renal hücreli karsinom
NET: Nöroendokrin tümör
WHO: World Health Organisation, Dünya Sağlık Örgütü
TSC: Tuberoz skleroz kompleks
RICTOR: Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RenCa: Renal karsinoma hücreleri
MCF-7: İnsan meme adenokarsinoma hücreleri
HLB: Hidrofilik-lipofilik denge
eIF: Ökaryotik translasyon başlatma faktörleri
eEF: Ökaryotik translasyon uzama faktörleri
PABP1: Poliadenilat bağlayıcı protein 1
m7-GTP: 7-metil guanozin
LOD: Deteksiyon limiti
LOQ: Kantifikasyon limiti
%RSD: Bağlı standart sapma
CT: Cycle of threshold
%CV: % Varyasyon katsayısı
IS: İnternal standart
PVDF: Polviniliden fluorür
TBST: Tween 20 içeren tris tamponlu salin çözeltisi

ÖZET

Öztürk D. mTOR inhibitörü everolimusun faredeki kronofarmakokinetiği. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul. 2019.

Sirkadiyan zamanlama sistemi memelilerde absorpsiyon, dağılım, metabolizma/detoksifikasyon ve eliminasyon gibi ilaç farmakokinetiğiyle ilgili önemli basamakları kontrol etmektedir. Özellikle terapötik indeksi dar, bireyler arası değişkenliği yüksek antikanser ilaçların kronofarmakokinetiğinin bilinmesi önemlidir. Çalışmamızın amacı, uygulama zamanı (ZT1-dinlenme ve ZT13-aktivite), cinsiyet ve açlık/tokluk durumunun everolimusun farmakokinetiği üzerine etkilerini araştırmaktır. Everolimus (5 mg/kg, tek doz), ZT1 ve ZT13 zamanlarında aç bırakılmış veya *ad libitum* beslenen C57BL/6J erkek ve dişi farelere oral yoldan uygulanmış, plazma ve dokulardaki farmakokinetik parametreleri değerlendirilmiştir. Ayrıca, ZT1 ve ZT13 zamanlarında everolimus (5 mg/kg, 14 gün) veya vehikül uygulanan farelerde P-glikoprotein düzeyleri ölçülmüştür. Plazma C_{maks} , AUC_{0-24} ve AUC_{total} tüm gruplarda ZT13'te ZT1'e göre yüksek bulunmuştur. Karaciğerde ise everolimusun düzeyleri, tüm gruplarda ZT1'de ZT13'e göre anlamlı olarak yüksektir ($p<0,05$). Erkek farelerde açlık durumunda everolimusun karaciğere dağılımı artmıştır. İleumda everolimus konsantrasyonları, *ad libitum* farelerde aç bırakılanlara göre ve dişilerde erkeklere göre daha yüksek bulunmuştur. Everolimusun hedef organlarından olan timusta, everolimus düzeyleri ZT1'de ZT13'e ve erkek farelerde dişilere göre anlamlı derecede yüksektir ($p<0,05$). 14 gün everolimus/vehikül uygulanan farelerde ZT13'te karaciğer P-gp ekspresyonu ZT1'e göre yüksek bulunmuş, her grupta everolimus uygulamasına bağlı olarak P-gp hafifçe artmıştır. Kontrol gruplarında ZT13'te ileum P-gp ekspresyonu ZT1'e göre yüksekken, everolimus dişi ve erkek farelerde P-gp ekspresyonunu farklı etkilemiştir. Bulgularımız everolimus farmakokinetiğinin farelerde, uygulama zamanı ve cinsiyete göre değişebildiğini ve besinlerden etkilendiğini göstermektedir. Farelerde everolimusun doku dağılımının ZT1'de ZT13'e göre daha yüksek olması everolimusa bağlı kronotoksisiteyi açıklayabilmektedir. Çalışmamız, insanda everolimusun kronoterapötik yaklaşım ile kullanılmasının daha etkili ve güvenli olabileceğini destekler niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Everolimus, kronofarmakokinetik, antikanser ilaç, sirkadiyan saat, kronoterapi.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu TÜBİTAK (216S475), İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (YÖP-24831) ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi 6.2015/25 nolu projeleri tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Öztürk D. Chronopharmacokinetics of mTOR inhibitor everolimus in mice. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmacology. PhD Thesis. İstanbul. 2019.

Circadian timing system controls drug pharmacokinetics including absorption, distribution, metabolism/detoxification and elimination. Chronopharmacokinetics are especially important for anticancer drugs with narrow therapeutic index and high inter-individual variability. The aim of our study was to investigate effects of dosing-time (ZT1-rest/ZT13-activity), sex and feeding on everolimus pharmacokinetics. Everolimus (5mg/kg, single-dose) was administered orally to C57BL/6J male/female, fasted/fed mice at ZT1 and ZT13, and pharmacokinetic parameters were evaluated. Additionally, P-glycoprotein levels were measured in everolimus (5mg/kg, 14-days)- or vehicle-treated male/female mice at ZT1/ZT13. Plasma C_{max} , AUC_{0-24} and AUC_{total} were higher at ZT13 than ZT1 in all groups. In liver, everolimus levels were significantly higher at ZT1 than ZT13 ($p<0.05$). In males, distribution of everolimus to liver was increased in fasting. Ileum concentrations were higher in fed mice compared to fasted and were higher in females than males. In thymus, one of the target organs of everolimus, concentrations were significantly higher at ZT1 than ZT13 and males compared to females ($p<0.05$). In mice treated with everolimus/vehicle for 14 days, liver P-gp expression was found higher at ZT13 than ZT1, and P-glycoprotein was slightly increased in each group upon everolimus administration. In controls, ileum P-gp expression was higher at ZT13 than ZT1, was affected by everolimus in both sexes differently. Our findings indicate that everolimus pharmacokinetics may vary according to dosing-time, sex, and feeding in mice. Higher everolimus tissue distribution at ZT1 may explain the cause of everolimus chronotoxicity. Our study support that everolimus can be more effective and safer with chronotherapeutical approach.

Key Words: Everolimus, chronopharmacokinetics, anticancer drug, circadian clocks, chronotherapy.

The present work was supported by The Research and Technological Council of Turkey –TÜBİTAK (216S475), the Research Fund of İstanbul University (YOP-24831) and the Research Fund of Bezmialem Vakif University (6.2015/25).

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Memelilerde, çoğu moleküler ve hücresel süreç, fizyolojide ve sonuç olarak davranışlarda gün içi değişikliklere yol açan sirkadiyan ritimler ile düzenlenmektedir. Bu günlük değişimler, homeostazı sürdürmek ve sağlığı korumak için gerekli olan süreçlerin koordinasyonunu sağlamaktadır. Memelilerde protein kodlayan genomun yarısının sirkadiyan ritim gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle, birçok ilacın farmakokinetiği-farmakodinamiği ve sonuç olarak etkinlikleri ve tolere edilebilirlikleri sirkadiyan ritme bağlı değişim gösterir. Sirkadiyan ritimlerin ilaçların farmakokinetiğini, farmakodinamiğini ve toksisitesini nasıl etkilediğini anlamak tedavinin etkinliğini önemli ölçüde artırabilir ve yan/toksik etkileri azaltabilir. Bu nedenle, özellikle kısa yarı ömre sahip, terapötik indeksi dar, bireyler arası değişkenliği yüksek ve hedef proteinlerinin de ritmik süreçleri olan ilaçlar ile yapılan farmakolojik çalışmalarda sirkadiyan değişimleri hesaba katmak ve ilaçların sirkadiyan parametrelerini belirlemek esastır¹⁻⁵.

Sirkadiyan zamanlama sistemi ilaç farmakokinetiğini güçlü bir şekilde etkiler. İlaçların absorpsiyonu, dağılımı, metabolizması ve atılımı ile etkinliğinin ve/veya toksisitesinin, günlük değişimler gösterdiği belirlenmiştir. İlaç farmakokinetiğindeki sirkadiyan değişiklikler; ilaç metabolizmasından sorumlu enzim aktivitesi, ilaç taşıyıcı proteinlerin ekspresyonu, mide asit sekresyonu, bağırsak motilitesi, karaciğer ve böbrek kan akımı, glomerüler filtrasyon hızı gibi fizyolojik süreçlerin ritimleri ile ilişkilidir ve bu ritimler ile düzenlenmektedir^{3,4,6}. Benzer şekilde, ilaçların farmakodinamiği de sirkadiyan değişimler gösterir. Yaklaşık 500 ilacın etkinliğinin ve tolere edilebilirliğinin hem deneysel modellerde hem de hastalarda sirkadiyan ritme bağlı olarak beş kata kadar değişebildiği gösterilmiştir⁷. Ayrıca ilaç etkinliği/toksisitesi üzerinde potansiyel bir etkiye sahip spesifik ilaç hedefleri de (reseptörler, taşıyıcılar, enzimler, hücre içi sinyal sistemleri, transkripsiyon faktörleri) sirkadiyan farklılıklar gösterebilir⁸. Kronofarmakoloji, sirkadiyan ritimlerin ilaç farmakokinetiği, farmakodinamiği ve toksisitesi üzerindeki etkisini araştırmaktadır. Buna göre, kronoterapinin amacı en yüksek etkinliği elde etmek ve toksisiteyi minimum indirmektir. Kronofarmakolojik yaklaşımlar bir hastalığın semptomlarının zamana bağlı olarak tahmin edilebilir şekilde değiştiği, tedavide kullanılan ilacın farmakokinetiğinin bireyler arası ve birey içi yüksek

değişkenlik gösterdiği, ilaç hedefinin sirkadiyan ritim gösterdiği, ilaç plazma konsantrasyonlarının terapötik veya toksik etkiler ile ilişkili ve sirkadiyan faza bağımlı olduğu durumlarda yüksek önem kazanmaktadır^{7,9}. Bununla birlikte, dünya çapında en çok satan ilaçların yarısından fazlasının çekirdek saat genlerinin veya saat kontrolü altındaki genlerin proteinlerini hedef aldığı, ancak bunların çoğunun sirkadiyan ritimlerle ilişkilendirilmediği ve klinik çalışmalarda uygulama zamanının etkisinin dikkate alınmadığı anlaşılmaktadır¹⁰.

Kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan 5-FU, irinotekan, sisplatin, doksorubisin, oksaliplatin, metotreksat ve oral olarak kullanılan kapesitabin, tamoksifen, erlotinib, sunitinib, selisiklib gibi pek çok antikanser ilacının farmakokinetik özelliklerinin ve ilacın organ ve dokulara maruziyetinin uygulama zamanına göre değişiklik gösterdiği bulunmuştur^{6,11}. Kolorektal kanser hastalarına; 5-FU, folik asit ve oksaliplatin kemoterapi rejiminin sabit hızda ve kronomodüle şekilde (en iyi tolere edilebilen saatlerde) uygulandığı randomize bir klinik çalışmada 3-4. kademe mukozit sabit rejimde %89'iken kronomodüle rejimde %18'e gerilemiştir. Aynı çalışmada tedaviye alınan cevap da sabit rejimde %32 iken kronomodüle rejimde %53'e yükselmiştir².

Everolimus, oral yoldan kullanılan bir mTOR inhibitörüdür. Everolimus kanser tedavisinde ve organ reddini önlemek amacıyla immünosüpresan olarak kullanılmaktadır. Everolimus, ilerlemiş böbrek hücre karsinomu, ilerlemiş pankreatik ve gastrointestinal nöroendokrin tümörler ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 negatif meme kanserinde eksemestan ile kombine kullanılmaktadır¹². mTOR bir serin/teonin kinaz olup mTOR aktivitesi de sirkadiyan saat kontrolü altındadır, mTOR inhibitörlerinin antikanser etkileri zamana bağlı değişiklik gösterebilmektedir¹³.

Everolimus tedavisinin optimizasyonunda cinsiyet ve zamana bağlı değişikliklerin ilaç detoksifikasyonu üzerine olan etkilerinin belirlenmesi önem arz etmektedir. İlaç eflüks pompası P-gp ve ilaçları metabolize eden CYP3A4, CYP3A5 ve CYP2C8 enzimleri everolimus farmakokinetiğinden sorumlu parametrelerdir. Everolimusun bireyler arası farmakokinetik değişkenliği yüksektir. Bu değişkenliğin P-gp ve CYP enzimlerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir^{14,15}. Everolimus P-gp'nin substratı ve inhibitörüdür ve diğer P-gp substratları ile etkileşmektedir. Ksenobiyotik taşıyıcısı P-gp memelilerde karaciğer, bağırsak, böbrek ve beyin gibi pek çok organın

epitelyal hücrelerinde eksprese olmakta ve böylece ilaçların biliyer, intestinal ve renal eliminasyonunda ve dokulara dağılımında rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda; P-gp ekspresyonunun gün içi değişim gösterdiği ve bunun zamana bağımlı olarak ilaçların biyoyararlanım ve toksisitesini değiştirebileceği bulunmuştur¹⁶⁻¹⁹.

Çalışma grubumuzca yapılan bir çalışmada, everolimus ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 zaman C57BL/6J soyu erkek (5 - 10 mg/kg/gün) ve dişi (15 - 20 mg/kg/gün) farelere iki farklı dozda oral yoldan 14 gün boyunca uygulanmış, hayvanların lokomotor aktivite ve vücut sıcaklığı ritimleri, ilaca bağlı kilo kayıpları ve klinik gözlemlere bakılarak ilacın **en iyi (ZT13)** ve **en kötü (ZT1)** tolere edildiği zaman belirlenmiştir. Aynı çalışmada, erkek farelerin (5 mg/kg) ve dişi farelerin (15 mg/kg) tolere edebildikleri dozun farklı olduğu bulunmuştur²⁰. Bu çalışmalara dayanarak ZT1 ve ZT13 sirkadiyan zamanlarında dişi (15 mg/kg) ve erkek (5 mg/kg) farelere everolimus uygulanmış ve ilaç uygulama zamanına bağlı olarak everolimusun toksisitesi incelenmiştir. Vücut ağırlığı ve organ ağırlıkları değişimleri, immünolojik ve hematolojik parametreler incelenmiş; dişi ve özellikle erkek farelerde ZT1 zamanında ZT13'e göre daha fazla toksisite gözlenmiştir. Bu toksisite bulguları timus ve testis dokularında daha belirgin olarak izlenmiştir²¹.

Yukarıda verilen literatür bilgisi ve toksisite çalışmamıza dayanarak everolimusun faredede tolere edilebildiği en iyi (ZT13) ve en kötü (ZT1) zamanda farmakokinetiğinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu tez çalışmasında amaçlarımız şu şekildedir: 1) İki farklı sirkadiyan zamanda (ZT1-en kötü ve ZT13-en iyi), açlık ve tokluk durumunda, dişi ve erkek farelere oral yoldan 5 mg/kg olarak uygulanan antikanser ilaç everolimusun, gün içi uygulanma zamanına bağlı olarak farmakokinetik parametrelerindeki değişimini araştırmak. 2) Farmakokinetik verilerden elde edilen sonuçların everolimusun kronotoksitesini ile ilişkisini belirlemek 3) Tekrarlı doz (5 mg/kg/gün; 14 gün) everolimus uygulamasının zamana bağlı olarak P-gp ekspresyonu üzerindeki etkisini belirlemek 4) Tekrarlı doz everolimus uygulaması sonrasında kararlı durum plazma everolimus düzeyinin uygulama zamanına bağlı değişimini belirlemek.

Deney hayvanları üzerinde yapılan bu deneysel çalışmalar ile everolimusun farmakokinetiğinde ilacın uygulama zamanına bağlı olarak görülebilecek farklılıkların ortaya konması planlanmaktadır. Bu prelinik çalışmanın everolimusun kronoterapisini optimize etmede klinik çalışmalara temel oluşturabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sirkadiyan Zamanlama Sistemi ve Moleküler Saat

2.1.1. Sirkadiyan Zamanlama Sistemi

Sirkadiyan zamanlama sistemi, birçok organizmada bulunan ve evrimsel avantaj sağlayan sistemlerdir. Bu biyolojik saatler büyük olasılıkla dünyanın kendi eksenini etrafında dönmesinin neden olduğu çevresel koşullardaki tekrarlayan günlük değişikliklere adapte olmak için gelişmiştir. Endojen sirkadiyan saatler yaklaşık 24 saatlik bir periyotla (Latin: circa = yaklaşık, dies =day) organizmaları, yiyeceklerin mevcudiyeti veya çevresel sıcaklıktaki değişiklikler gibi önemli günlük olaylara organizmanın davranış ve fizyolojisini ayarlayarak hazırlar. Memelilerde pek çok biyolojik fonksiyon sirkadiyan zamanlama sistemi (SZS) tarafından kontrol edilmektedir^{1,2,7}. SZS ayrıntılı olarak Şekil 1’de gösterilmiştir.

SZS, bir organizmadaki tüm osilatörlerin çeşitli fizyolojik süreçlerle birleşmesinden oluşur. SZS’nin santral ve ana saati ventral hipotalamusta yer alan SKÇ’de bulunur. Buradan vücudun diğer organ, doku ve hücrelerine endojen sirkadiyan sinyaller gönderilir. SKÇ’nin harabiyeti, ritmik olmayan hormon salınımı ve ritmik olmayan fizyolojik etkilere yol açar. SKÇ vücudun geri kalanına sirkadiyan ritim bilgisini vücut sıcaklığı, hormonlar ve otonom sinir sistemi gibi fizyolojik süreçler aracılığıyla gönderir ve bu fizyolojik süreçlerin ritimlerini düzenlemesi yoluyla organizma üzerinde bir kontrole sahip olur. Pineal bez tarafından salınan bir hormon olan melatonin, SKÇ'nin multisinaptik çıktısının bir örneğidir. SKÇ için bir faz işareti olarak yaygın şekilde kullanılır ve salgılanmasının SKÇ üzerinde geri bildirim etkisi olduğu gösterilmiştir. Periferde her bir çekirdekli hücre, hücre içi (intraselüler) sirkadiyan ritim üreten, SKÇ ve doku kaynaklı sinyalleri alan bir moleküler saate sahiptir^{1,2,7}.

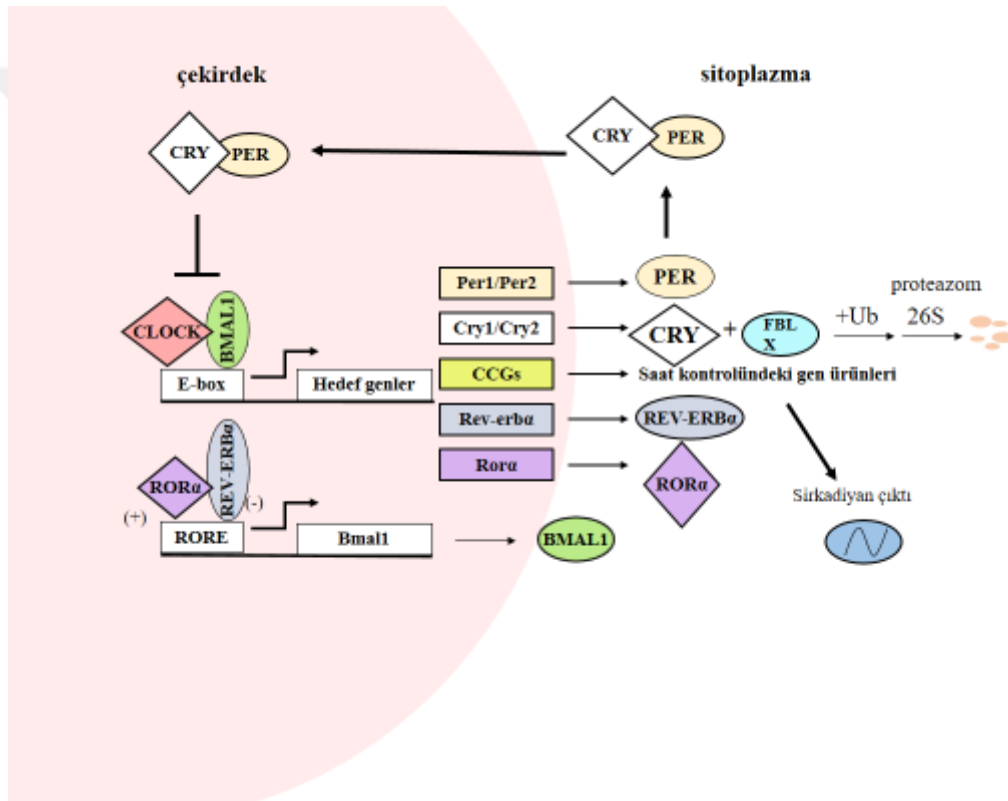
Çevresel değişiklikleri algılamak için organizmanın kendisini dış uyaranlar ile senkronize etmesi gerekir. SZS’yi hem hücresel hem de organizma düzeyinde etkileyen, SZS’yi oluşturan moleküler saatlerin faz ve amplitüdünü düzenleyerek onu 24 saatlik bir ritme sokan “Zeitgeber” ler (Almanca, zaman/ritim verici) bulunmaktadır. Bu zamana kadar en iyi bilinen ve en çok çalışılmış zaman/ritim verici aydınlık-karanlık

birbirine benzemektedir. Bu genlerin çoğunun silinmesi veya mutasyonu, sirkadiyan ritim davranışının bozulmasına yol açar^{1,2,7}. Sirkadiyan ritmi kontrol eden moleküler mekanizmaları keşiflerinden dolayı 2017 yılında Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash ve Michael W. Young Nobel Fizyoloji veya Tıp ödülünü kazanmışlardır.

2.1.2. Moleküler Saat

Memelilerde sirkadiyan saatin mekanizması, temel heliks-loop-heliks (bHLH) - PER-ARNT-SIM (PAS) transkripsiyon faktörleri olan aktivatörler CLOCK (ve paralogu NPAS2) ve heterodimerik ortağı BMAL1'den (ARNTL) oluşur. CLOCK-BMAL1 kompleksi, baskılayıcı proteinleri kodlayan periyod (PER1, PER2 ve PER3) ve kriptokrom (CRY1 ve CRY2) genlerinin E-kutuları içeren düzenleyici elemanlarına bağlanır. Farelerde, CLOCK-BMAL1 aktivasyonu gündüz meydana gelir ve öğleden sonra Per ve Cry genlerinin transkripsiyonuna ve öğleden sonra veya akşam geç saatlerde PER ve CRY proteinlerinin birikmesine neden olur. PER ve CRY proteinleri hem birbirleri ile hem de serin/treonin kinazlar olan kazein kinaz 1δ (CK1δ) ve CK1ε ile etkileşime girerek, gece hücre çekirdeğine göç ederler. Çekirdekte kendi transkripsiyonlarını bastırmak için CLOCK-BMAL1 ile etkileşime geçerler. Per ve Cry'nin yaptığı baskılama ilerledikçe, Per ve Cry genlerinin transkripsiyonu ve PER ve CRY protein seviyeleri düşer. Spesifik E3 ligaz kompleksleri, bu proteinleri ubiquitinasyon ve proteozomlarda parçalanmaları için hedefler. Per ve Cry'nin yaptığı negatif geri bildirim azalınca, CLOCK-BMAL1 ertesi sabah yeni bir transkripsiyon döngüsüne başlayabilir. Ana saat genlerinin, örneğin PER2 ve onu düzenleyen kinaz CK1δ'in insanda uyku bozuklukları ile ilişkili olduğu bulunmuştur. CLOCK-BMAL1 kompleksi ayrıca nükleer reseptörler Rev-Erb alfa ve beta'yı (REV-ERBα ve REV-ERBβ; sırasıyla NR1D1 ve NR1D2 tarafından kodlanır) deaktive eder. REV-ERBα ve REV-ERBβ, RORE'ler (RevDR2 ve retinoik asit-iliskili yetim reseptör (ROR) bağlanma elemanları) için RORα, RORβ ve RORγ (sırasıyla RORA, RORB ve RORC tarafından kodlanan) ile yarışır. REV-ERBα ve REV-ERBβ'nin ritmik ifadesi BMAL1 ve CLOCK'un baskılanmasına yol açar, bu da BMAL1 ve CLOCK genlerinde PER ekspresyon ritimlerinin anti-fazı olan bir ritme neden olur. Birbirine bağlı bu aktivatörlerin ve baskılayıcıların geri besleme döngüleri kanonik bir pozitif geri besleme ve negatif geri besleme gen ağı motifi oluşturur. Üçüncü bir CLOCK-BMAL1-iliskili transkripsiyonel döngü PAR-bZip (prolin ve asidik amino asit bakımından

zengin bazik l6s6n fermuar) fakt6rlerini DBP (Albumin D-b6lgesi baēlayıcı protein), TEF (t6rotrop embriyonik fakt6r) ve HLF (hepatik l6semi fakt6r6) iēerir. Bu proteinler, D-kutuları ve baskılayıcı NFIL3'6 (N6kleer fakt6r, interl6kin-3; ayrıca d6zenlenmiē; E4BP4 (E4 promot6r baēlayıcı protein 4) olarak da bilinir) iēeren ve REV-ERB-ROR halkası tarafından ind6klenen b6lgelerle etkileēime girer. Bu 6ē birbirine geēen transkripsiyonel geri besleme d6ng6s6, promot6rlerdeki cis-elementlerinin (yani E-kutuları, RORE'lar ve D-kutuları) kombinasyonuna ve spesifik hedef genlerin arttırıcılarına baēlı olarak, ēeēitli ekspresyon fazlarına sahip transkripsiyon d6ng6leri 6retebilir^{7,22}. Molek6ler Saat ēekil 2'de g6sterilmiētir.



ēekil 2: Molek6ler Saat

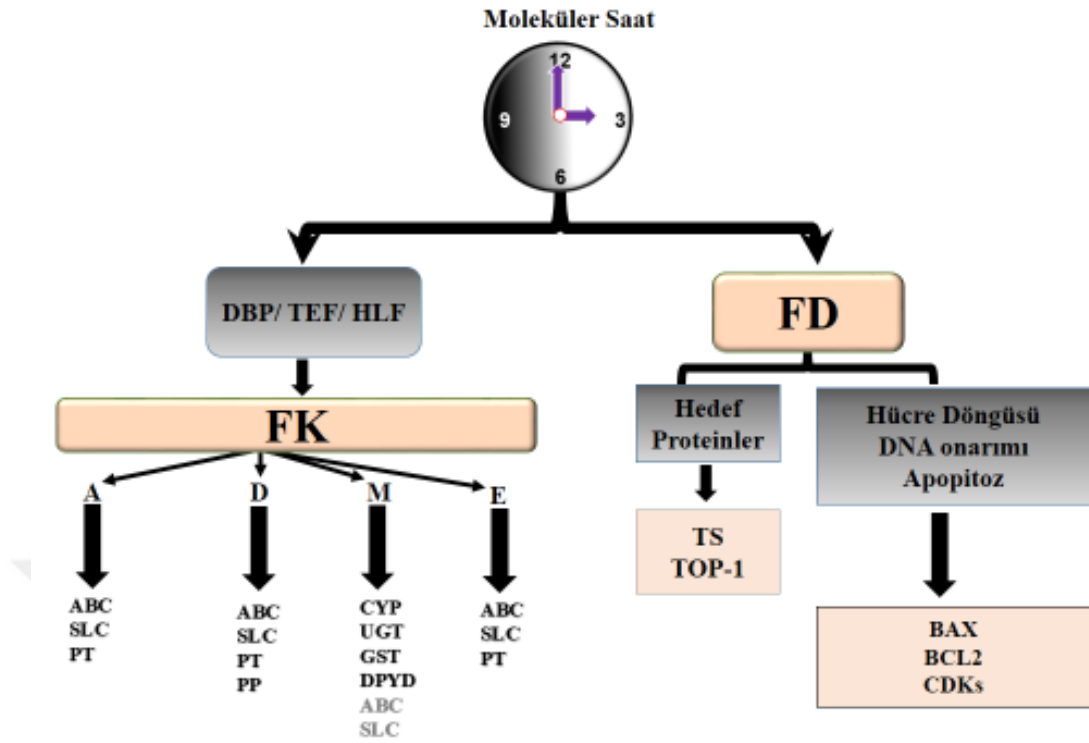
Sirkadiyan osilat6r, birbirine baēlı pozitif ve negatif transkripsiyonel geri besleme d6ng6lerinden oluēur. Pozitif transkripsiyonel geri besleme d6ng6s6nde CLOCK/NPAS4 ve BMAL1 bir dimer oluēturur ve Per ve Cry de dahil olmak 6zere saat kontroll6 genlerinin (CCG'ler) E-kutusunu baēlanır. Daha sonra CRY ve PER ile CKIe negatif transkripsiyonel geri besleme d6ng6s6 olan bir trimerik kompleks oluēturur ve ēekirdeēe girerek BMAL: CLOCK aktivitesini bastırırlar. İkinci bir geri besleme d6ng6s6, yetim resept6rler olan RORα ve REV-ERBα proteinlerinin Bmal1 transkripsiyonu 6zerindeki etkisiyle oluēturulur. RORα ve REV-ERB, Bmal1 promot6r6ndeki tepki elemanları (RORE) 6zerindeki rekabetēi etkileriyle Bmal1 transkripsiyonunu sırasıyla aktive eder ve bastırır^{3,23}.

2.2. Kronofarmakoloji

Kronofarmakoloji, sirkadiyan ritimlerin ilaç farmakokinetiği, farmakodinamiği ve toksisitesi üzerindeki etkisini araştırmaktadır. SZS, ilaçların etkinliği, metabolizma ve detoksifikasyonunu etkileyen birçok faktörü düzenlemektedir. Yapılan çalışmalar ile SZS'nin ilaçların farmakodinamik ve farmakokinetiğini etkileyebilecek fizyolojik süreçler, hedef reseptörler, taşıyıcı proteinler ve enzimler, hücre içi sinyal iletim sistemleri ve transkripsiyon faktörleri üzerinde kontrol edici rolü olduğunu kanıtlanmıştır. Kronofarmakolojik çalışmaların nihai amacı, ilaçların en iyi tolere edilebildiği, etkisinin en yüksek ve toksisitesinin en düşük olduğu zamanı belirleyerek tedaviyi düzenlemektir. Kronofarmakoloji; ilaç etkisinin sirkadiyan değişimini inceleyen kronofarmakodinamik, ilaç plazma/doku düzeylerinin gün içi değişimini inceleyen kronofarmakokinetik alanlarından oluşur (Şekil 3). İlaç yan etki ve toksisitesinin sirkadiyan değişimini inceleyen kronotoksiste de kronofarmakolojiye dahil edilebilmektedir^{3,4,8,24,25}.

2.2.1. Kronofarmakokinetik

SZS'nin ilaçların absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon süreçlerini etkilediği gösterilmiştir. SZS ilaç farmakokinetiğini; hem mide asit sekresyonu ve pH'sı, bağırsak motilitesi, gastrointestinal kan akımı, plazma proteinlerine bağlanma, membran geçirgenliği, karaciğer ve böbrek kan akımı, safra üretimi, sindirim enzimlerinin gastrointestinal kanala sekresyonu, glomerüler filtrasyon hızı, tübüler reabsorpsiyon hızı gibi fizyolojik süreçlerin ritimlerini hem de ilaç metabolize edici enzim ve taşıyıcı proteinlerin aktivitesi ve ekspresyonu gibi moleküler süreçlerin ritimlerini etkileyerek düzenlemektedir. Bu nedenle, ilaç uygulama zamanı ve periferik moleküler saatlerin pek çok organda (bağırsak, karaciğer, böbrek ve ilaç hedef dokusu dahil) senkronizasyonunun ilaç seviyeleri ve biyoyararlanım üzerinde önemli etkileri olabilmektedir. İlaç farmakokinetiğindeki sirkadiyan değişimler sonraki bölümlerde ayrıntılı olarak verilmiş olup, klinik kronofarmakokinetik çalışmalara örnekler Tablo 1'de sunulmuştur.



Şekil 3: Moleküler Saatin İlaçların Farmakolojisine Etkisi

Moleküler saat, antikanser ajanların farmakokinetik (FK) ve farmakodinamiğini (FD) kontrol etmektedir. 24 saat boyunca antikanser ilaç FK'dan sorumlu ana yollar PARbZip transkripsiyon faktörleri (DBP, TEF ve HLF) aracılığıyla moleküler saat tarafından kontrol edilir. Sirkadiyan saatler ayrıca, antikanser ilaçlarının FD'sini etkileyen hücre döngüsü, DNA onarımı ve apoptoz genleri gibi çeşitli ilaç hedeflerini de kontrol etmektedir. ABC: ATP-Bağlayıcı Kaseti ailesi SLC: Solüt Taşıyıcılar, CYP: Sitokrom, UGT: Uridin difosfat (UDP) glukronil transferaz, GST: Glutasyon S-transferaz, DPYD: Dihidropirimidin dehidrojenaz, PT: Pasif taşıma, PP: Plazma proteinlerine bağlanma, TOP-1: topoizomeraz 1, TS: timidilat sentaz, Bax: BCL2- ilişkili X proteini, Bcl-2: B-hücreli lenfoma 2, CDK: Sikline bağımlı kinaz³.

Tablo 1 Antikanser ilaçlarla yapılmış bazı klinik kronofarmakokinetik çalışmalar

Antikanser İlaçlar	Kanser Tipi	Çalışma Tipi	Doz/Dozlama Zamanı	Bulgular	Ref.
İrinotekan+ Oksaliplatin+ 5-FU (setüksimab ile kombine)	Karaciğer metastazlı kolorektal kanser	Farmakokinetik çalışma	Kronomodüle hepatik arter infüzyonu İrinotekan (180 mg/m ²)- 6sa sinüsoidal infüzyon 05:00'te pik, Oksaliplatin (85 mg/m ²)-12sa sinüsoidal infüzyon 16:00'da pik, 5-FU (2800 mg/m ²)-12sa sinüsoidal infüzyon 04:00'da pik	İrinotekan, SN-38, ultrafiltre Pt'nin AUC'si ve lökopeni arasında iyi korelasyon. Ultrafiltre Pt'nin AUC ve C _{maks} 'ı diyare şiddeti ile anlamlı olarak ilişkili.	26
Sisplatin (Gemsitabin ve Dosetaksel ile kombine)	Küçük hücreli- olmayan akciğer kanseri	Randomize kontrollü çalışma, farmakokinetik analizler	Sisplatin 06:00 veya 18:00'de 30-dk i.v. infüzyon	Total ve bağlanmamış Pt CL 18:00 > 06:00	27
Kapesitabin+ Oksaliplatin	Metastatik kolorektal kanseri (tedavi görmemiş hastalarda)	Prospektif tek- merkezli, tek-kollu, faz II çalışması	Oral Kapesitabin (2000 mg/m ²) dozun %50'si 8:00'de ve %50'si 12:00'de	Kapesitabin AUC _{0-4sa} 08:00 > 12:00 Kapesitabin C _{maks} 08:00 > 12:00	28
Tamoksifen	Meme kanseri	Farmakokinetik çapraz çalışma	Oral 20 veya 40 mg günde tek doz 8:00 veya 13:00 veya 20:00	Tamoksifen AUC _{0-8sa} ve C _{maks} 08:00 > 20:00 (%20) Tamoksifen t _{maks} 08:00 < 20:00 Endoksifene sistemik maruziyet	29

				08:00 > 20:00 (%15)	
Sunitinib	Gelişmiş renal hücreli (berrak hücreli tip) karsinom, Pankreas nöroendokrin tümörleri	Prospektif randomize çapraz çalışma	8:00 veya 13:00 veya 18:00	$C_{\text{çukur}} 13:00 \text{ veya } 18:00 > C_{\text{çukur}} 8:00$ (p=0,006)	30
Linifanib	İleri veya metastatik solid tümörler (standart tedaviye dirençli)	Faz I, açık etiketli, randomize, çapraz çalışma	0.25 mg/kg (maks. 17.5 mg) sabah veya akşam	$C_{\text{maks}} \text{ sabah} > \text{akşam}$ (p<0,01)	31

5-FU: 5-fluorourasil; Pt: Platin; i.v.:intravenöz; AUC: Konsantrasyon-zaman eğrisi altında kalan alan; C_{maks} : Maksimum kan konsantrasyonu; C_{min} : Minimum kan konsantrasyonu; $C_{\text{çukur}}$: Bir sonraki dozdan önce ilacın ulaştığı en düşük konsantrasyon; t_{maks} : Maksimum kan konsantrasyonuna ulaşma zamanı.

2.2.1.1. Absorpsiyon

Oral uygulama, ilaç alımının en yaygın yoludur. Oral yoldan alınan bir ilaç önce gastrointestinal sistemden absorbe olur, kan dolaşımına geçtikten sonra portal ven ile karaciğere gelir. Oral yoldan verilen ilaçların emilimi, gastrointestinal kanalın fizyolojik parametreleri; mide pH'sı, mide boşalma hızı, gastrointestinal motilite, vücut pozisyonu, bağırsak mukozası kan akımı ve epitel hücre yüzeyleri üzerinde bulunan spesifik ilaç-alım ve atım pompaları/taşıyıcı proteinleri ve enzimlerinin ekspresyonu ve fonksiyonu gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Mide asit sekresyonu ve pH, mide boşalma zamanı ve gastrointestinal kan akımı gün içerisinde değiştiğinden, birçok çalışmada insanlarda ilaç emiliminde geçici değişiklikler olduğu bildirilmiştir. Lipofilik ilaçların sabah saatlerinde, akşama göre daha hızlı absorbe edildiği bildirilmiştir. Suda çözünen ilaçlarda bu değişiklik daha azdır^{8,9,32}.

Gastrointestinal sisteme giden kan akımındaki günlük değişiklikler, ilaçların emilimindeki zamana bağlı değişime de katkıda bulunabilir. Sağlıklı erkek gönüllülerde yapılan bir çalışmada, hepatik kan akımı indosiyanin yeşili kinetiğinden belirlenmiştir. Günün başında elde edilen tahmini kan akımı zirvesinin, günün ilerleyen diğer üç farklı saatinden önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur³³. Pek çok ilacın (teofilin, terbutalin, simetidin, omeprazol, digoksin, propranolol, nitratlar ve nifedipin) akşam uygulamasında, sabah uygulamasına göre maksimum kan konsantrasyonun ulaşma zamanı (t_{maks}) değerinde gecikme gözlenebilmektedir, bu da absorpsiyonun sirkadiyan ritme bağlı olduğunu göstermektedir. Sirkadiyan ritimler ilaçların biyolojik membranlardan geçişini etkiler. Gastrointestinal absorpsiyon hızı gece-gündüz değişiminden etkilenmektedir. Oral uygulama sonrası izosorbit-5-mononitrat, diazepam, nifedipin, parasetamol, temazepam ve amitriptilin sabah saatlerinde akşam saatlerine göre daha hızlı absorpsiyon göstermiştir. Bu farklılık mide geçiş süresi ve/veya intestinal kan akımındaki gün içi değişim ile açıklanabilir. Sabah erken saatlerde gastrointestinal ve hepatik perfüzyondaki bu artış, ilaç absorpsiyonunda artışa yol açabilmektedir^{9,24,34}.

Mide boşalma zamanındaki günlük değişim ilaç emilimini ve maksimum kan konsantrasyonu (C_{maks}), t_{maks} ve konsantrasyon zaman eğrisi altında kalan alan (AUC) gibi farmakokinetik parametreleri etkileyebilir. Goo ve ark.³⁵ günlük aktivite ve gece dinlenme periyotları ile senkronize edilmiş 16 sağlıklı erkek gönüllüye sabah 8 ve akşam 8 saatlerinde standart bir öğün vermişler ve yemek sonrası mide boşalma

hızlarını ölçmüşlerdir. Akşam yemeği için mide boşaltma süresi sabaha kıyasla önemli ölçüde daha uzun bulunmuştur ($p<0,001$), sıvılarda ise aynıdır. Akşam saatinde yenen yemeğin boşalma süresindeki artış (%53,6), bazı ilaçlar için gösterilen tepe plazma konsantrasyonlarına ulaşmada akşam saatlerinde görülen gecikmeyi açıklayabilir. Sabah saatlerindeki artmış mide boşalma hızı ve motilite lipofilik ilaçların emiliminin sabah saatlerinde artmasına neden olabilir^{9,24,35}. Lemmer ve ark.³⁶ sağlıklı gönüllü ve hipertansif hastalara günün farklı zamanlarında nifedipin preparatlarını uygulayarak, nifedipinin farmakokinetik farklarını incelemişlerdir. Hemen salım yapan nifedipin preparatında sabah saatlerindeki biyoyararlanım %40'a varan oranda düşmüştür. Nifedipin esas olarak bağırsaktan absorbe olduğu için akşam saatlerinde mide boşalmasının gecikmesi t_{maks} 'ı uzatarak bu sonuca katkı sağlamış olabilir. Bu nedenle, sabahın erken saatlerinde akşam saatlerine kıyasla daha yüksek perfüzyon hızı, daha hızlı mide boşalma süresi ile birlikte, sabahın erken saatlerinde daha hızlı bir ilaç emilimine neden olabilir^{9,36}.

İlaçların iyonizasyon durumu da sabah ve akşam uygulamalarında değişebilir. Mide asit sekresyonu ve pH'sı iyonizasyonu etkilemektedir. Mide asiditesi sirkadiyan ritim gösterir, akşam saatlerinde daha fazla sabah saatlerinde daha az asit salgısı olur. pH tamponlayıcı yiyecekler ve nokturnal duodenal-gastrik reflü mide pH'sını değiştirebilmektedir. Artmış mide asiditesi, lipofilik ilaçların emilimini azaltır. Pek çok lipofilik ilaç sabah alındığında daha hızlı absorbe olmaktadır. Hidrofilik ilaçlarda ise böyle bir değişim gözlenmemiştir^{9,24,37,38}.

2.2.1.2. Dağılım

Absorbe olup kan dolaşımına geçen ilaç, kan akımı ile diğer organlara dağılır ve etki bölgesine ulaşır. Bir ilacın dağılım hacmi, hedef bölgedeki konsantrasyonunun ve etkinliğinin kritik bir belirleyicisidir. Bir ilacın kan ve dokular arasındaki dağılımı lipofilit ve diğer fizikokimyasal özellikleri yanında; dokulara ulaşan kan akımı, plazma proteinlerine bağlanma ve plazma proteinlerinin vücuttaki miktarı gibi fizyolojik faktörlere de bağlıdır^{8,39}. Her organ büyüklüğüne ve metabolik aktivitesine göre kardiyak debinin bir kısmını alır. Sabahları sempatik tonusun daha yüksek olması organlara ulaşan kan akımını değiştirmektedir. Kardiyovaküler sistemin sirkadiyan ritmi ekstrasplankik renal bölgenin aldığı kardiyak debinin (%30) ve kan akımı dağılımının sabahları akşam saatlerine göre daha yüksek olmasına neden olmaktadır. Bu durumun

sabah ve akşam saatlerinde plazma/doku ilaç miktarını etkilediği görülmektedir. Bir organın aldığı kan akımı ne kadar yüksek olursa, ilacı kılcal damarların dışına aktarmak için gerekli hız sabiti o kadar yüksektir. İlaçların farmakokinetiğinin bu aşaması, asidik ve bazik ilaçların proteinlere bağlanmasındaki sirkadiyan değişimlerinden etkilenebilir^{9,40}.

Plazma proteinlerine ilacın bağlanmasındaki zamana bağlı değişimin, proteinlere yüksek oranda bağlanan ve dağılım hacmi düşük olan ilaçların dağılımını etkilemesi muhtemeldir. İlacın serbest (aktif) fraksiyonundaki değişikliklerin, bu ilaçların hem etkinlik hem de yan etki profili için önemli etkileri vardır⁸. İlaçların yaygın olarak bağlandığı plazma proteinlerinin miktarındaki sirkadiyan değişim daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Scheving ve ark.⁴¹ sıçanlarda yaptıkları çalışmada; hem total plazma proteinlerinde, hem de ilaçların en çok bağlandığı albümin, $\alpha 1$, $\alpha 2$, β ve γ globülin düzeylerinde sirkadiyan ritim varlığını göstermişlerdir. Sağlıklı erkek gönüllülerde yapılan bir çalışmada ise kortikosteroid bağlayıcı protein transkotrinin de hem prednisolona hem de doğal hormonlara bağlanırken sirkadiyan ritim gösterdiği gösterilmiştir. En düşük bağlama kapasitesi gece 04:00 civarı ve en yüksek bağlanma ise öğleden sonra 04:00 civarı olmuştur. Ayrıca bu durumun yaş ile değiştiği, yaşlılarda pik bağlanma zamanının sabah saatlerine kaydığı saptanmıştır⁴². Patel ve ark.⁴³, gün boyunca 2 saatlik aralıklarla altı sağlıklı gönüllüden toplanan numunelerde valproik asidin plazma proteinlerine bağlanma oranının tayin etmişlerdir. Plazmadaki serbest valproat oranı zamanla önemli ölçüde değişmiş ve sabah erken saatlerde maksimum ve öğleden sonra minimum düzeyde gözlenmiştir. Kemoterapötik bir ajan olan sisplatin ile yapılan bir çalışmada da, sisplatinin plazma proteinlerine bağlanma oranı günün farklı saatlerinde ölçülmüştür. Saat 16:00'da en yüksek bağlanma gözlenmiştir. Öğleden sonra uygulamada nefrotoksisitenin daha az gözlenmesinin, plazma proteinlerine daha fazla bağlanma ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir^{44,45}. Plazma protein seviyelerindeki günlük farklılıklar; özellikle yüksek oranda proteinlere bağlanan (>%80) ve dağılım hacmi (Vd/F) küçük olan ilaçlar için, ilaç proteini bağlanmasını etkileyebilir ve önemli klinik sonuçlara neden olabilir⁹.

İlaç dağılımı ayrıca membranların ilaçlara geçirgenliği ile de alakalıdır. Birçok ilaç, membranlardan geçişi ilaç taşıyıcı proteinler veya kanallar aracılığıyla olmaktadır. Bu taşıyıcıların sirkadiyan ritimleri de dağılımı etkilemektedir^{8,9}. Bu proteinlerin ritmini

gösteren pek çok çalışma mevcuttur^{16,17,19,46}. Bu çalışmaların detaylarına Tablo 3'te değinilmiştir.

2.2.1.3. Metabolizma

Memelilerde, ilaç metabolizması/detoksifikasyon işlemleri, başta karaciğer olmak üzere, bağırsak ve böbrek gibi çeşitli organlarda ilaçların kimyasal değişikliklerini içerir. İlaç metabolizmasındaki ana amaç, ilaçların sudaki çözünürlüğünü artırarak feçes veya idrarla atılmasını kolaylaştırmaktır^{3,47}. Memelilerde ilaç metabolizması üç fazdan oluşur. Faz I metabolizma reaksiyonları, oksidasyon, indirgenme ve hidrolizden sorumlu enzimleri içerir. Sitokrom P450 (CYP450) mikrozomal enzim süper ailesi, karaciğer ve bağırsakta yüksek ekspresyonu nedeniyle çok önemli rol oynar. Faz II metabolize edici veya UDP-glukuronozil transferazlar (UGT'ler), glutatyon-S-transferazlar (GST), sülfotransferazlar (SULT) ve N-asetil transferazlar (NAT) gibi enzimler konjugasyondan sorumludur. Faz III bileşenleri, sırasıyla ilaçların hücreden efluks ve influksundan sorumlu olan ABC taşıyıcıları ve solüt taşıyıcı (SLC) süper ailesinden oluşur. Ek olarak, P450 oksidoredüktaz (POR) ve aminolevulinik asit sentaz (ALAS1) enzimleri Faz I enzimlerinin çoğunun aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynar^{2,48-50}.

Faz I, II ve III detoksifikasyon proteinlerinin sirkadiyan ifadesi, PARbZip transkripsiyon faktörü ailesinin üç üyesi olan DBP, HLF ve TEF proteinleri tarafından düzenlenir (Şekil 3)^{34,51-53}. PARbZip transkripsiyon faktörleri, Faz I ve Faz II ilaç metabolizmasında yer alan sayısız anahtar genin transkripsiyonunu ve bu genlerin D-box içeren promotörlerine ritmik olarak bağlanarak ilaç taşınmasını düzenler^{51,54}. Gachon ve ark.⁵⁵, PARbZip genleri silinmiş (triple-knockout) farelerin, antikanser ilaçların zararlı etkilerine karşı oldukça savunmasız olduklarını göstermiştir. Bu genleri silinmiş fareler, ksenobiyotikleri metabolize etmek için oldukça düşük kapasiteye sahiptir⁵⁵. Ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu için üç önemli organ olan karaciğer, böbrek ve ince bağırsaktaki moleküler saatler, PARbZip transkripsiyon faktörlerinin sirkadiyan ekspresyonunu kontrol etmektedir. Buna karşılık PARbZip proteinleri, yapısal androstan reseptörü (CAR), peroksizom proliferatör aktive edici reseptör-alfa (PPAR- α) ve aril hidrokarbon reseptörü (Ahr) dahil olmak üzere ilaç metabolizmasının kontrolünde rol oynayan üç iyi bilinen nükleer reseptörün sirkadiyan ifadesini yönetir^{17,34,51,52,55}. PARbZip proteinlerinin, pregnan X reseptörünün (PXR) ritmik

ifadesini nasıl yönlendirdiği kesin olarak bilinmemektedir. Kriebs ve ark.⁵⁶, CRY1'in, tüm fare nükleer reseptörlerinin yarısından fazlası ile doğrudan etkileşime girdiğini, PXR'nin CRY1/2 ile doğrudan baskılanmasının bu nükleer reseptörün sirkadiyan modülasyonunu mümkün kıldığını ve ayrıca ritmik olarak kopyalanan CAR dahil olmak üzere diğer nükleer reseptörlerin sirkadiyan saat düzenlemesi için ek bir yol oluşturduğunu ortaya koymuştur. Gorbacheva ve ark.⁵⁷, Bmal1'in boş alleli veya Clock geninde mutasyona sahip farelerin, antikanser bir ilaç olan siklofosfamidin toksik etkisine karşı daha fazla duyarlılık sergilediğini ancak iki Cry geninden yoksun farelerin toksik etkiye daha dirençli olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, sirkadiyan saatin, doğrudan ilaç metabolizmasında yer alan genleri düzenleyerek veya sirkadiyan saat tarafından düzenlenen transkripsiyon faktörleri aracılığıyla ilaçların kronotoksitesine doğrudan dahil olduğunu göstermektedir. PARbZip transkripsiyon faktörleri ayrıca mRNA ve/veya protein seviyesinde ALAS1 ve POR'un ritmik ifadesini de kontrol etmektedir^{51,55}.

Nükleer reseptörler, ksenobiyotik sensörler gibi işlev görür. Ksenobiyotikler tarafından indüklenen ksenobiyotik bağlanma veya aktivasyon sinyallerine cevap olarak, çekirdek içinde birikir ve ilaç metabolizması ve taşınmasında rol alan Faz I, II ve III genlerinin transkripsiyonunu aktive ederler^{49,50,58}. Nükleer reseptörler REV-ERB α/β ve ROR α/γ çekirdek saat fonksiyonunun ana düzenleyicileridir ve birçok başka nükleer reseptör, çekirdek saat bileşenlerinin kontrolü altında ritmik olarak ifade edilir^{17,34,51}. ROR α/γ genleri silinmiş (double knockout) farelerde, gen düzenlemesi üzerindeki ana etkiler, Cyp2b9/10, Cyp4a10 ve Cyp4a14, Sult1e1/Est ve Sult2a9/2a'nın aktivasyonu ve Cyp7b1, Cyp8b1, 3 β -hidroksisteroid dehidrojenaz 4 ve 5'in baskılanmasında gözlenmiştir⁵⁹. Karaciğerdeki 49 nükleer reseptörün farelerde günlük mRNA ekspresyon profilleri, iskelet kası, beyaz ve kahverengi adipoz dokularda Yüksek Verimli Gerçek Zamanlı RT-PZR (Ters Transkriptaz-Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile detaylı bir analizde araştırılmıştır. Çalışmada analiz edilen nükleer reseptörlerin %50'sinden fazlası metabolik olarak aktif bu dokularda, dokuya özgü salınım ile ritmik değişiklikler göstermiştir⁶⁰. İki anahtar nükleer reseptör, CAR ve PPAR- α ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol oynayan CYP450 ve ABC taşıyıcılarının ritmik ifadelerini modüle etmekten sorumludur^{2,17,34,54}. CAR'ın mRNA ifadesinin zamana bağlı değişimi sıçan karaciğerindeki Cyp1a ve Cyp1b mRNA ifadelerinin zamana bağlı değişimi ile uyumludur⁶¹. CAR'ın hedefi olan Cyp2b10'nin

fare karaciğerindeki aktivitesi, geceleri en yüksek ve gündüz en düşüktür⁵⁵. İfadelerinde sirkadiyan ritimler gösteren Cyp2a5, Cyp2b10 ve Cyp3a11, CAR nükleer reseptörünün en iyi bilinen hedefleridir⁶².

Gachon ve ark.⁵⁵ PARbZip kodlamayan farelerde, karaciğer ve böbrekte ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda rol alan enzimleri kodlayan genlerin baskılandığını ortaya koymuştur. Bu genler arasında Faz I (Cyp2b, Cyp2c, Cyp2a ve Cyp3a), Faz II (Ces3, GSTt1 ve GSTa3) ve Faz III (Abcg2) grubu detoksifikasyon enzim ve ilaç taşıyıcıları bulunmaktadır. POR ve ALAS1'in ifadesinin de azaldığı saptanmıştır⁵⁵. Son bulgular PARbZip proteinlerinin bu enzim veya taşıyıcıları kodlayan genlerin, örneğin Cyp3a4⁶³ ve Mdr1a (çoklu ilaç direnci 1a veya Abcb1a)¹⁷, promotör bölgelerine ritmik olarak bağlanarak bu enzimlerin bazılarının ekspresyonunu doğrudan düzenlediğini göstermiştir. PARbZip eksikliği olan farelerin, siklofosamid ve mitoksantron gibi antikanser ilaca bağlı toksisiteye karşı aşırı duyarlı olduğu bulunmuştur. Öte yandan, ritmik olmayan Cyp3a13, ritmik Cyp2b10 ve muhtemelen Cyp2c29, siklofosamidin sirkadiyan tolere edilebilirliğine katkı sağlamaktadır⁵⁵. DBP, insan Cyp3a4'ü, fare homologu Cyp3a11'i ve sıçan Cyp2c6 genlerini transkripsiyonunu, transkripsiyonel başlangıç bölgelerine bağlanarak aktive etmektedir⁶⁴. Lavery ve ark.⁶⁵, DBP'nin, fare karaciğerinde Cyp2a4 ve Cyp2a5'in sirkadiyan düzenlemesini kontrol ettiğini ve Dbp geni olmayan farelerde, her iki genin de önemli ölçüde bozulmuş ekspresyon gösterdiğini saptamıştır. Serum şoku ile senkronize edilen insan hepatoma (HepG2) hücre hattında, DBP aktivitesi ve CYP3A4 transkripsiyonunun gündüz en yüksek olduğu saptanmıştır. Tersine, CYP3A4 baskılayıcı E4BP4 ifadesi geceleri en yüksek bulunmuştur⁶³.

Karaciğerde ve bir miktar bağırsakta olmak üzere Faz I enzimleri ile oksidasyon, redüksiyon veya hidroliz reaksiyonlarına giren antikanser ilaçların çoğunun sirkadiyan tolerabilite gösterdiği bulunmuştur². Cyp1a, Cyp2a, Cyp3a11, Cyp4a14, Cyp2b10, Cyp2e1 dahil olmak üzere birçok CYP450 enziminin aktiviteleri, protein ve mRNA seviyeleri sıçan ve fare karaciğer ve böbrek dokularında, karanlıkta (aktivite fazı) daha yüksek ve aydınlıkta (dinlenme fazı) daha düşüktür². CYP450 enzimlerinin aktivitesi, mRNA ve protein ifadesi ile ilgili kemirgenlerde yapılan *in vivo* sirkadiyan çalışmaları Tablo 2'de verilmektedir³.

Ksenobiyotiklerin atılımında önemli rol oynayan ve ilaçları kandan barsak lümenine taşıyan ana efluks taşıyıcı protein P-gp (P-glikoprotein, MDR1, ABCB1) gibi

Tablo 2: CYP 450 enzimlerinin mRNA, protein veya aktivitelerinin zamana bağlı değişimi

Enzim	Parametre	Metot	Doku	Tür	Soy	Cinsiyet	Yaş	Pik	Çukur	Cosinor	ANOVA	Ref.
Cyp1a1	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Erkek	8H	ZT6	ZT18-22	p<0.05	-	62
Cyp1a1	mRNA	RT- PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Dişi	8H	ZT6	ZT22	p<0.05	-	62
Cyp1a1	mRNA	RT- PZR	Akciğer	Fare	WT	-	-	ZT14	ZT6	-	p<0.05	66
Cyp1a1	Protein	Western blot	Akciğer	Fare	WT	-	-	ZT18	ZT6	-	-	66
Cyp1a1	Aktivite	P450-Glo kiti	Akciğer	Fare	WT	-	-	ZT18	ZT2	-	p<0.05	66
Cyp1a2	mRNA	RT- PZR	Karaciğer	Fare	C57BL/6	Erkek	8H	ZT13	ZT1	-	-	67
Cyp1a2	mRNA	RT- PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Erkek	8H	ZT6	ZT18-22	p<0.05	-	62
Cyp1a2	mRNA	RT- PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Dişi	8H	ZT6	ZT22	p<0.05	-	62
Cyp27a1	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Erkek	8H	ZT10	ZT22	p<0.05	-	62
Cyp27a1	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Dişi	8H	ZT10	ZT22	p<0.05	-	62
Cyp2a4	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Erkek	8H	ZT10	ZT22	p<0.05	-	62
Cyp2b10	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Erkek	8H	ZT14-18	ZT22-2	p<0.05	-	62
Cyp2b10	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Dişi	8H	ZT18	ZT6	p<0.05	-	62
Cyp2c11	mRNA	RT-PZR	Hipokampus	Sıçan	Wistar	Erkek	-	ZT2.58	-	-	p=0.0017	68
Cyp2c11	mRNA	RT-PZR	Orta serebral arter	Sıçan	Wistar	Erkek	-	ZT5.11	-	-	p=0.025	68
Cyp2c11	mRNA	RT-PZR	İnferior vena kava	Sıçan	Wistar	Erkek	-	ZT4.20	-	-	p=0.011	68
Cyp2d10	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	FVB	Dişi	8-12H	ZT20	ZT8	p<0.0413	-	29
Cyp2d22	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	FVB	Dişi	8-12H	ZT20	ZT8	p<0.0413	-	29
Cyp2e1	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Sıçan	Wistar	Erkek	8H	ZT12	ZT21	-	p<0.05	69
Cyp2e1	Protein	Western blot	Karaciğer	Sıçan	Wistar	Erkek	8H	ZT18	ZT3	-	p<0.01	69
Cyp2e1	Aktivite	Hidroksilasyon /HPLC	Karaciğer	Sıçan	Wistar	Erkek	8H	ZT21	ZT3	-	p<0.05	69
Cyp2e1	Protein	Western blot	Böbrek	Sıçan	Wistar	Erkek	8H	ZT21	ZT6	-	p<0.05	69

Cyp2e1	Aktivite	Hidroksilasyon /HPLC	Böbrek	Sıçan	Wistar	Erkek	8H	ZT21	ZT6	-	p<0.05	69
Cyp2e1	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Erkek	8H	ZT10	ZT22	p<0.05	-	62
Cyp2e1	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Dişi	8H	ZT10	ZT22	p<0.05	-	62
Cyp2e1	Aktivite	p-Nitrofenol hidroksilasyonu	Karaciğer	Fare-AD	ICR	Erkek	7H	ZT14-18	ZT2-6	-	p<0.01	70
Cyp2e1	Aktivite	p-Nitrofenol hidroksilasyonu	Karaciğer	Fare-TRF	ICR	Erkek	7H	ZT22-2	ZT14	-	p<0.01	70
Cyp3a11	mRNA	RT-PZR	İnce bağırsak	Fare	FVB	Dişi	8-12H	ZT16	ZT4	p<0.0172	-	29
Cyp3a11	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Erkek	8H	ZT2	ZT14-16	p<0.05	-	62
Cyp3a11	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Dişi	8H	ZT2	ZT14-22	p<0.05	-	62
Cyp3a25	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Erkek	8H	ZT2	ZT14-16	p<0.05	-	62
Cyp3a25	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Dişi	8H	ZT2	ZT14-22	p<0.05	-	62
Cyp4a10	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Erkek	8H	ZT10	ZT22	p<0.05	-	62
Cyp4a10	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Dişi	8H	ZT18	ZT6-10	p<0.05	-	62
Cyp4a14	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Erkek	8H	ZT10	ZT22	p<0.05	-	62
Cyp4a14	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Dişi	8H	ZT10	ZT22	p<0.05	-	62
Cyp4x1	mRNA	RT-PZR	Hipokampus	Sıçan	Wistar	Erkek	-	ZT8.24		-	p=0.0016	68
Cyp4x1	mRNA	RT-PZR	İnferior vena kava	Sıçan	Wistar	Erkek	-	ZT18.58		-	p=0.0003	68
Cyp7a	Aktivite	7 α -hidroksilaz	Karaciğer	Sıçan - AD	Wistar	Erkek	-	ZT14	ZT6	-	p<0.05	71
Cyp7a	Aktivite	7 α -hidroksilaz	Karaciğer	Sıçan - TRF	Wistar	Erkek	-	ZT7	ZT19	-	p<0.05	71
Cyp7a	mRNA	Northern blot	Karaciğer	Sıçan - AD	Wistar	Erkek	-	ZT14	ZT7	-	p<0.01	71
Cyp7a	mRNA	Northern blot	Karaciğer	Sıçan - TRF	Wistar	Erkek	-	ZT7	ZT14	-	p<0.01	71

Cyp7a1	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Sıçan - AD	F344/DuCrj	Erkek	7H	ZT18	ZT6	-	p<0.01	72
Cyp7a1	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Sıçan - TRF	F344/DuCrj	Erkek	7H	ZT6	ZT18	-	p<0.01	72
Cyp7a1	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Erkek	8H	ZT10	ZT22	p<0.05	-	62
Cyp7a1	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Dişi	8H	ZT10	ZT22	p<0.05	-	62
Cyp7b1	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	Kunming	Dişi	8H	ZT6	ZT22	p<0.05	-	62
Cyp8b	Aktivite	12 α -hidroksilaz	Karaciğer	Sıçan-AD	Wistar	Erkek	-	ZT14	ZT6	-	p<0.05	71
Cyp8b	Aktivite	12 α -hidroksilaz	Karaciğer	Sıçan-TRF	Wistar	Erkek	-	ZT7	ZT19	-	p<0.05	71
Cyp8b	mRNA	Northern blot	Karaciğer	Sıçan-AD	Wistar	Erkek	-	ZT7	ZT19	-	p<0.01	71
Cyp8b	mRNA	Northern blot	Karaciğer	Sıçan-TRF	Wistar	Erkek	-	ZT19	ZT14	-	p<0.05	71
P450	Protein	⁷³ 'dan	Karaciğer	Sıçan-AD	F344	-	10H	ZT3	ZT19	-	p<0.01	74
P450	Protein	⁷³ 'dan	Karaciğer	Sıçan-aç	F344	-	10H	ZT19-23	ZT7	-	p<0.01	74
P450	Aktivite	7ACoD	Karaciğer	Sıçan	F344	-	10H	ZT19-23	ZT7	-	p<0.01	74
P450	Aktivite	7ACoD	Karaciğer	Sıçan-AD	F344/DuCrj	Erkek	7H	ZT18	ZT6	-	p<0.01	72
P450	Aktivite	7ACoD	Karaciğer	Sıçan-TRF	F344/DuCrj	Erkek	7H	ZT6	ZT18	-	p<0.01	72

ZT; "Zeitgeber Time", RT-PZR; revers transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu, WT; doğal tip (wild type), KO; geni silinmiş (knock-out), AD, *ad libitum*; TRF; zaman-kısıtlı beslenme (time-restricted feeding), 7ACoD; 7-alkoksikumarin o-dealkilaz, H; hafta, Y; yıl, (-); bahsedilmemiş.

ABC taşıyıcılarının transkripsiyonu SZS'nin kontrolü altındadır. P-gp dolaylı olarak ksenobiyotik metabolizmasına dahil olur ve CYP450 enzimleri ile, özellikle CYP3A4, beraber çalışarak potansiyel olarak zararlı maddelerin detoksifikasyonunu sağlar. Hücresel seviyedeki son çalışmalar, farede total ileum, ileal mukoza ve karaciğerde^{25,75,76}, sıçanda total jejunumda^{46,77,78} ve maymunda karaciğerde⁷⁹ Abcb1a (Mdr1a), Abcb1b (Mdr1b), Abcc1 (Çoklu ilaç direnci ile ilişkili protein 1; Mrp1), Abcc2 (Mrp2), Abcb4 (Mdr2), Abcc2 (Mrp2), Abcb4 (Mdr2), Bcrp1 dahil ABC taşıyıcılarının gen ekspresyonunun sirkadiyan kontrol altında olduğunu göstermektedir. Abcb1a transkripsiyonunun, HLF ile alternatif aktivasyonu ve E4BP4 ile baskılanmasının bir sonucu olarak fare ileumunda ritmik olduğu gösterilmiştir. Saatin abcb1a sirkadiyan transkripsiyonundaki rolü Clock/Clock mutant farelerde de gösterilmiştir, abcb1a ritmi vahşi tipe kıyasla mutant farelerde bozulmuştur¹⁷. Ando ve ark.¹⁶ C57BL/6J farelerde karaciğer ve barsakta abcb1a mRNA ekspresyonunda ZT12-16'da pik yapan 24 saatlik bir ritim saptamışlardır. Ek olarak, P-gp substratı digoksinin intestinal konsantrasyonunun ZT12'de daha düşük olduğu, P-gp aktivitesinin de sirkadiyan bağımlı olduğu saptanmıştır¹⁶. ABC taşıyıcılarının aktivitesi, mRNA ve protein ifadesi ile ilgili deney hayvanlarında yapılan *in vitro* ve *in vivo* sirkadiyan çalışmalar Tablo 3'te özetlenmiştir³.

SLC taşıyıcıları, bağırsaktan ilaçların absorpsiyonu, ksenobiyotiklerin hepatositlere alınması ve böbreklerde ksenobiyotiklerin yeniden emilimi ve atılımından sorumludur. Ksenobiyotiklerin karaciğere alınması, hepatositlerde metabolize edilmeleri nedeniyle özel bir öneme sahiptir. Zhang ve ark.⁷⁵ Oatp1a1, Oatp1a4, Oatp1b2, Oatp2b1, Oat2 ve Oct1'in fare karaciğerinde günlük mRNA ekspresyon ritimlerini göstermişlerdir⁷⁵. Ayrıca sirkadiyan saatin PPAR α aracılığıyla Oct1 proteininin böbreklerde ritmik ekspresyonunu sağladığı gösterilmiştir⁷⁵. Benzer şekilde, Octn1'in günlük intestinal mRNA ifadesi PPAR α tarafından yönetilmektedir⁸⁰.

Karboksilesteraz 1 ve 2 (Ces1 ve Ces2), karaciğer ve gastrointestinal kanaldaki PARbZip proteinleri aracılığıyla SZS ile ritmik olarak kontrol edilir^{2,51}. Ces1 ve Ces2'nin ritmik ifadeleri, ICR farede aydınlıkta irinotekanın SN-38'e daha fazla metabolize olmasından sorumlu olabilir^{2,81}. İrinotekanın sirkadiyan detoksifikasyonu *in vitro* çalışmalarda da gözlenmiştir^{82,83}. İnsan kolon adenokarsinom (Caco-2) hücrelerinde, irinotekanın biyoaktivasyon (CES) ve detoksifikasyonundan (UGT1A)

Tablo 3: ABC taşıyıcı protein ailesinin mRNA, protein veya aktivitelerinin zamana bağlı değişimi

Taşıyıcı	Parametre	Metot	Doku	Tür	Soy	Cinsiyet	Yaş	Pik	Çukur	Cosino	ANOVA	Ref.
Abcb1	mRNA	RT-PZR	İnce bağırsak	Maymun	Sinomolgus	Erkek	4-7Y	ZT3	ZT9	-	NS	79
Abcb1	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Maymun	Sinomolgus	Erkek	4-7Y	ZT21	ZT15	-	NS	79
Abcb1a	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	C57BL/6	Erkek	10H	ZT12-16	ZT0	-	p<0,01	16
Abcb1a	mRNA	RT-PZR	Jejunum	Fare	C57BL/6	Erkek	10H	ZT12	ZT0	-	p<0,01	16
Abcb1a	mRNA	RT-PZR	Böbrek	Fare	C57BL/6	Erkek	10H	ZT12	ZT0	-	NS	16
Abcb1a	mRNA	RT-PZR	İleum	Fare	B6D2F1	Dişi	10H	ZT15	ZT3	-	NS	19
Abcb1a	mRNA	RT-PZR	Jejunum (proksimal)	Sıçan - AD	Wistar	Erkek	8H	ZT12	ZT0	-	p<0,05	77
Abcb1a	mRNA	RT-PZR	Jejunum (proksimal)	Sıçan - TRF	Wistar	Erkek	8H	ZT0	ZT12	-	p<0,01	77
Abcb1a	Aktivite	Digoksin kons./intestinal perfüzyon	Jejunum (proksimal)	Sıçan - AD	Wistar	Erkek	8H	ZT18	ZT6	-	p<0,05	77
Abcb1a	Aktivite	Digoksin AUC/intestinal perfüzyon	Jejunum (proksimal)	Sıçan - AD	Wistar	Erkek	8H	ZT18	ZT6	-	p<0,01	77
Abcb1a	Aktivite	Digoksin kons.	Jejunum (proksimal)	Sıçan - TRF	Wistar	Erkek	8H	ZT6	ZT18	-	p<0,05	77
Abcb1a	Aktivite	Digoksin AUC	Jejunum (proksimal)	Sıçan - TRF	Wistar	Erkek	8H	ZT6	ZT18	-	p<0,05	77
Abcb1a	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	C57BL/6	-	8H	ZT13	ZT1	p=0,016	p=0,029	84
Abcb1a/1b	mRNA	RT-PZR	Jejunal mukoza	Sıçan	SD	Erkek	-	ZT6	ZT18	p<0,05	p<0,0001	46
Abcb1b	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	C57BL/6	Erkek	10H	ZT16	ZT0	-	NS	16
Abcb1b	mRNA	RT-PZR	Jejunum	Fare	C57BL/6	Erkek	10H	ZT20	ZT0	-	NS	16
Abcb1b	mRNA	RT-PZR	Böbrek	Fare	C57BL/6	Erkek	10H	ZT20	ZT0	-	NS	16
Abcb1b	mRNA	RT-PZR	İleum	Fare	B6D2F1	Dişi	10H	ZT15	ZT3	-	p=0,03	19

P-gp	Protein	Western blot	Karaciğer	Fare	C57BL/6	-	8H	ZT20	ZT0	NS	-	84
P-gp	Protein	Western blot	Karaciğer	Fare	C57BL/6	Erkek	10H	ZT8	ZT20	-	NS	16
P-gp	Protein	Western blot	Böbrek	Fare	C57BL/6	Erkek	10H	ZT0	ZT16	-	NS	16
P-gp	Protein	Western blot	Jejunum	Fare	C57BL/6	Erkek	10H	ZT8	ZT0	-	p=0,04	16
P-gp	Aktivite	Digoksin birikimi	Jejunum	Fare	C57BL/6	Erkek	10H	ZT12	ZT0	-	p<0,05	16
P-gp	Protein	Western blot	Jejunum	Maymun	Sinomolgus	Erkek	4-7Y	ZT21	ZT9	-	NS	79
P-gp	Aktivite	Kinidin kons.	Beyin homojenat	Sıçan	Wistar	Erkek	-	ZT8	ZT20	-	p<0,05	85
P-gp	Aktivite	BOS'ta serbest kinidin	Mikrodiyaliz	Sıçan	Wistar	Erkek	-	ZT8	ZT20	-	p<0,05	85
P-gp	Aktivite	Talinolol intestinal perfüzyon	Jejunum	Sıçan -aç	Wistar	Erkek	-	ZT13-15	ZT1-3	-	p<0,05	86
P-gp	Aktivite	Talinolol intestinal perfüzyon	Ileum	Sıçan -aç	Wistar	Erkek	-	ZT13-15	ZT1-3	-	p<0,05	86
P-gp	Aktivite	Losartan intestinal perfüzyon	Jejunum	Sıçan -aç	Wistar	Erkek	-	ZT13-15	ZT1-3	-	p<0,05	86
P-gp	Aktivite	Losartan intestinal perfüzyon	Ileum	Sıçan -aç	Wistar	Erkek	-	ZT13-15	ZT1-3	-	p<0,05	86
P-gp	Aktivite	[18F]MC225 PET	Tüm Beyin	Sıçan	SD	Erkek	14-16H	ZT3-9	ZT15	-	p<0,001	87
P-gp	Aktivite	[18F]MC225 PET	Korteks	Sıçan	SD	Erkek	14-16H	ZT3-9	ZT15	-	p<0,001	87
P-gp	Aktivite	[18F]MC225 PET	Striatum	Sıçan	SD	Erkek	14-16H	ZT3	ZT15	-	p<0,01	87
P-gp	Aktivite	[18F]MC225 PET	Hippokampus	Sıçan	SD	Erkek	14-16H	ZT3	ZT15	-	p<0,01	87
P-gp	Aktivite	[18F]MC225 PET	Serebellum	Sıçan	SD	Erkek	14-16H	ZT3-9	ZT15	-	p<0,01	87
P-gp	Aktivite	[18F]MC225 PET	Pons	Sıçan	SD	Erkek	14-16H	ZT3-9	ZT15	-	p<0,01	87
Abcb4	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	C57BL/6	Erkek	10H	ZT8	ZT20	-	p=0,06	16
Abcb4	mRNA	RT-PZR	Jejunum	Fare	C57BL/6	Erkek	10H	ZT4	ZT16	-	NS	16

Abcb4	mRNA	RT-PZR	Böbrek	Fare	C57BL/6	Erkek	10H	ZT0	ZT12	-	NS	16
Abcc2	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	C57BL/6	Erkek	10H	ZT12	ZT0	-	p<0,01	16
Abcc2	mRNA	RT-PZR	Jejunum	Fare	C57BL/6	Erkek	10H	ZT8	ZT20	-	p<0,01	16
Abcc2	mRNA	RT-PZR	Böbrek	Fare	C57BL/6	Erkek	10H	ZT12	ZT0	-	p=0,02	16
Abcc2	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	C57BL/6	-	8H	ZT7	ZT19	p=0,03 2	p=0,04 5	84
Abcc2	Protein	Western blot	Karaciğer	Fare	C57BL/6	-	8H	ZT16	ZT4	p<0,05		84
Abcc2	mRNA	RT-PZR	İleum mukoza	Fare	B6D2F1	Erkek	-	ZT12	ZT0	p= 0,0023	p= 0,04	88
Abcc2	mRNA	RT-PZR	İleum mukoza	Fare	B6D2F1	Dişi	-	ZT9	ZT0	p= 0,0023	p= 0,008	88
Abcc2	mRNA	RT-PZR	İleum mukoza	Fare	B6CBAF1	Erkek	-	ZT12	ZT0	p= 0,0002 6	p= 0,004	88
Abcc2	mRNA	RT-PZR	İleum mukoza	Fare	B6CBAF1	Dişi	-	ZT9	ZT0	p= 0,0001 2	p= 0,004	88
Abcc2	mRNA	RT-PZR	İleum seroza	Fare	B6D2F1	Erkek	-	ZT4	ZT20	NS	NS	88
Abcc2	Protein	IHC	İleum mukoza	Fare	B6D2F1	Erkek	-	ZT12	ZT15	-	p<0,00 1	88
Abcc2	Protein	IHC	İleum mukoza	Fare	B6D2F1	Dişi	-	ZT12	ZT3	-	p<0,00 1	88
Abcc2	Protein	IHC	İleum mukoza	Fare	B6CBAF1	Erkek	-	ZT15	ZT12	-	p<0,00 1	88
Abcc2	Protein	IHC	İleum mukoza	Fare	B6CBAF1	Dişi	-	ZT0	ZT15	-	p<0,00 1	88
Abcc2	mRNA	RT-PZR	Jejunal mukoza	Sıçan	SD	Erkek	-	ZT12	ZT3	p<0,05	p= 0,001	46
MRP-2	Protein	Western blot	Jejunum	Maymun	Sinomolgus	Erkek	4-7Y	ZT21	ZT9	-	NS	79
Abcg2	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	KO	-	8H	ZT7	ZT19	p=0,02 3	p=0,04 9	84
Abcg2	mRNA	RT-PZR	Jejunal mukoza	Sıçan	SD	Erkek	-	ZT3	ZT15	p<0,05	p= 0,04	46

Abcg2 izoform B	mRNA	RT-PZR	Karaciğer	Fare	ICR	-	-	ZT6	ZT18	-	p<0,05	76
Abcg2 izoform B	mRNA	RT-PZR	Böbrek	Fare	ICR	-	-	ZT10	ZT18	-	p<0,05	76
Abcg2 izoform B	mRNA	RT-PZR	İnce bağırsak	Fare	ICR	-	-	ZT6	ZT22	-	p<0,05	76
ABCG2	Protein	Western blot	Jejunum	Maymun	Sinomolgus	Erkek	4-7Y	ZT15- 21	ZT9	-	NS	79

ZT; “Zeitgeber Time”, RT-PZR; revers transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu, KO; geni silinmiş (knock-out), AD; *ad libitum*, TRF; zaman-kısıtlı beslenme (time-restricted feeding), AUC; eğri altında kalan alan (area under the curve), BOS; beyin-omurilik sıvısı, PET; pozitron emisyon tomografisi, IHC; immünohistokimya, SD; Sprague Dawley, H; hafta, Y; yıl, NS; anlamlı değil (not significant), (-); bahsedilmemiş.

sorumlu enzimlerin saat genleri tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir. İrinotekanın CES ile biyolojik olarak aktive edilmesi, detoksifikasyon enzimi UGT1A'nın en düşük olduğu zamanda en yüksektir, bu da sitotoksitesinin artmasına neden olmaktadır. İlacın uygulama zamanına bağlı olarak; aktif metabolit SN38'e biyotransformasyon ve irinotekan kaynaklı apoptoz yaklaşık 4 kat artmıştır^{82,83}. Dihidropirimidin dehidrojenaz (DPYD), 5-fluorourasil (5-FU) ve kapesitabinin detoksifikasyonundan sorumlu olan sirkadiyan kontrol altında başka bir Faz I enzimidir⁶. Erkek B6D2F1 farelerin karaciğerinde transkripsiyonu ve aktivitesinin SZS ile kontrol edildiği gösterilmiştir. DPYD aktivitesi, hayvanların dinlenme periyodunun ortalarında pik yapmaktadır⁸⁹. Sağlıklı gönüllülerin ve gastrointestinal veya nazofarengeal kanserli hastaların mononükleer hücrelerinde DPYD mRNA ekspresyon ve aktivite ritmi, farelere benzer şekilde, gece pik yapmaktadır⁹⁰⁻⁹². Ayrıca sağlıklı bireylerin oral mukoza biyopsilerinde de DPYD aktivitesi gece yarısı en yüksek bulunmuştur⁹³. 5-FU'nun hedef proteini timidilat sentaz (TS) ise oral mukozada DPYD'ye ters bir şekilde 13:00'te pik yapmaktadır; bu durumun gece uygulandığında 5-FU toleransının artmasını sağladığı gösterilmiştir². Faz II detoksifikasyon enzimlerinden GST'nin sirkadiyan ritmi, platin komplekslerinin toksisitesini etkilemektedir⁹⁴. GST, glutatyonun (GSH) ksenobiyotiklere konjugasyonunu katalize eder⁹⁵. Karaciğerin ve jejunumun GSH içeriği, fareler ve sıçanlarda karanlık fazın ikinci yarısında, gün ortasına kıyasla neredeyse üç kat daha yüksektir ve GSH sentezinin butiyonin sülfoksimit ile baskılanması, farelerde sisplatin ve oksaliplatin kronotoleransını büyük ölçüde etkilemektedir^{96,97}.

2.2.1.4. Eliminasyon

Böbrek çoğu ilacın atılmasından sorumlu organ olan ana organdır. Metabolize olan ilaçların idrarla atılımı, böbrek fonksiyonlarının durumuna bağlıdır⁸. Glomerüler filtrasyon hızı, renal kan akımı ve idrar çıkışı gibi böbrek parametrelerinde diürenal değişimler tanımlanmış ve idrarla atılan ilaçlar da bu diürenal değişimlerden etkilendiği gösterilmiştir^{55,98-100}. Farelerde sirkadiyan saatin, epitelyal sodyum taşıyıcılarını da içeren pek çok renal iyon kanalı ve taşıyıcı proteinlerinin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir^{101,102}. İdrar pH'sının sirkadiyan kontrolü de ilaç atılımında değişikliklere sebep olabilir; çoğu ilaç yüksek pH'da daha fazla eliminasyona uğramaktadır¹⁰³.

Glomerüler filtrasyon, tübüler sekresyon ve tübüler reabsorpsiyon, ilaçların böbrek tarafından atılmasını kontrol eden üç aşamadır. İnülinin, glomerüler filtrasyon

hızı (GFR) için bir belirteç olarak kullanıldığı çalışmalarda, GFR'nin aktif periyotta (kemirgenler için karanlık ve insanlar için aydınlık) pik yaptığı saptanmıştır¹⁰⁴. Renal kan akımı, kan basıncı ve renin-anjiyotensin sistemindeki sirkadiyan değişim, GFR'nin sirkadiyan ritmini kontrol eder¹⁰⁵. Yüksek oranda proteinlere bağlanan ilaçlar için, proteinlere bağlanmadaki sirkadiyan değişim, ilaçların böbrek atılımındaki sirkadiyan değişikliklerini de etkileyebilir³².

Tübüler sekresyon, endojen bileşiklerin ve ilaçların, P-glikoprotein ve diğer ABC taşıyıcıları, organik anyon taşıyıcılar, organik katyon taşıyıcılar ve solut taşıyıcı ailelerin proteinleri dahil olmak üzere spesifik taşıyıcılar yoluyla elimine edildiği aktif bir taşıma işlemidir³². Bu proteinlerin ekspresyonu ve aktivitesindeki sirkadiyan ritimler, böbrek sekresyonu yoluyla ilaçların atılımını etkileyebilir. Zuber ve ark.¹⁰², çeşitli bileşiklerin ve ilaçların taşınmasında rol oynayan solut taşıyıcı proteinlerin, aktif beslenme periyodunun başlangıcında ifadelerinin pik yaptığını ve sirkadiyan ritim gösterdiklerini saptamıştır. White ve ark.¹⁰⁶, esas olarak tübüler sekresyonla atılan bir ilaç olan ampisilinin, atılımında sirkadiyan değişim gösterdiğini ortaya koymuşlardır.

Tübüler reabsorpsiyon, su ve çözünmüş maddelerin vücuda geri kazanıldığı işlemidir. Birçok ilaç da aktif veya pasif difüzyon ile tekrar emilir. Aktif difüzyona spesifik taşıyıcılar aracılık etmektedir. Bununla birlikte, bir ilacın pasif yeniden emilimi ilacın lipofilitesi, pKa'sı, idrar pH'sı ve idrar akış hızı bağlıdır³². Sirkadiyan değişim hem idrar pH'sında hem de idrar akış hızında gözlenirken, aktif dönemde idrar pH'sı daha bazik ve idrar akış hızı da daha yüksektir¹⁰².

Böbrekte ayrıca sodyum iyonu ve su dengesini kontrol eden genleri ve taşıyıcıları içeren pek çok genin mRNA ifadelerinde sirkadiyan değişimleri gözlenmektedir^{102,106,107}. Bu genlerin ekspresyonundaki sirkadiyan ritim Clock mutant ve DBP, TEF ve HLF üçlü mutant kemirgenlerde bozulmuştur¹⁰². Bu da böbrek fonksiyonlarının düzenlenmesi ve koordine edilmesinde moleküler saatin belirgin bir rolü olduğunu göstermektedir³².

2.2.2. Kronofarmakodinamik

SZS, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü, anjiyogenez, DNA onarımı ve apoptoz gibi kanser ile ilgili süreçlerde rol oynayan reseptör, enzim ve transkripsiyon faktörlerini ritmik düzenlenmesini sağlayarak antikanser ilaçların farmakodinamiğini etkilemektedir. SZS'nin etkilediği bazı antikanser ilaç hedefleri Tablo 4'te sunulmuştur.

Tablo 4: Antikanser ilaçların hedefi olan bazı proteinlerin mRNA, protein veya aktivitelerinin zamana bağlı değişimi

Hedef	Parametre	Metot	Doku	Tür	Soy	Cinsiyet	Pik	Çukur	Cosinor	ANOVA	Ref.
BCL2	Protein	Western blot	Kemik iliği	Fare	C3H/HeN	Erkek	ZT3	ZT15	p= 0,024	-	108
BCL2	Protein	Western blot	Kemik iliği	MA13/C tümörlü fare	C3H/HeN	Erkek	ZT7	ZT23	p= 0,001	-	108
BCL2	Protein	Western blot	Kemik iliği	Fare	B6D2F1	Erkek	ZT4-7	ZT1	p= 0,025	-	108
c-Myc	mRNA	Northern blot	Karaciğer	Fare	129/C57BL6	-	ZT14	ZT10	-	-	109
Cdk-4	mRNA	Northern blot	Karaciğer	Fare	129/C57BL6	-	ZT18	ZT10	-	-	109
Cyclin D1	mRNA	Northern blot	Karaciğer	Fare	129/C57BL6	-	ZT14	ZT22	-	-	109
Cyclin A (G2)	Protein	IHC	Oral mukoza	İnsan	-	Erkek	ZT20	ZT4	p<0,001	-	110
Cyclin B1 (M)	Protein	IHC	Oral mukoza	İnsan	-	Erkek	ZT20	ZT12	p=0,016	-	110
Cyclin E (G1/S)	Protein	IHC	Oral mukoza	İnsan	-	Erkek	ZT16	ZT4	p <0,001	-	110
p53 (G1)	Protein	IHC	Oral mukoza	İnsan	-	Erkek	ZT12	ZT0	p= 0,016	-	110
TS	Aktivite	Tritiyum salım deneyi	Oral mukoza	İnsan	-	Erkek	ZT16	ZT4	p= 0,008	NS	110
TS	Aktivite	Tritiyum salım deneyi	Kemik iliği	Fare	CD2F1	Dişi	ZT18	ZT2	p<0,001	p<0,001	111
TS	Aktivite	Tritiyum salım deneyi	İnce bağırsak	Fare	CD2F1	Dişi	ZT6	ZT18	p<0,001	p<0,001	111
TS	Aktivite	Tritiyum salım deneyi	Tümör	Fare	CD2F1	Dişi	ZT6	ZT14	p=0,003	p<0,001	111
TS	mRNA	PZR	Tümör	Fare	CD2F1	Dişi	ZT2	ZT14	NS	NS	111

TS	Protein	Western blot	Tümör	Fare	CD2F1	Dişi	ZT22	ZT14	p<0,001	p= 0,008	111
Wee-1	Protein	Western blot	Tümör	Fare	CD2F1	Dişi	ZT14	ZT18	p=0,011	p= 0,047	111
Top-1	mRNA	RT- PZR	Karaciğer	Fare	ICR	Erkek	ZT21	ZT9	-	-	112
Top-1	mRNA	RT- PZR	Tümör	Fare	ICR	Erkek	ZT21	ZT9	-	-	112
Top-1	Aktivite	SCP DNA'nın relaksasyonu	Sarkoma 180 tümörü	Tümörlü fare	ICR	Erkek	ZT5	ZT13	-	p<0,05	112

ZT, Zeitgeber Time; BCL2, B-hücreli lenfoma 2 (B-cell lymphoma 2); c-Myc, Cellular myelocytomatosis oncogene Cdk-4, siklin bağımlı kinaz-4; PZR, polimeraz zincir reaksiyonu; IHC, İmmünohistokimya; Top-1, Topoizomeraz-1 enzimi; TS, Timidilat sentaz; MA13/C, Meme adenokarsinoma; NS, “anlamli değil”; SCP, Supercoiled (aşırı sargılı) plazmit; (-), “belirtilmemiş”.

Bu ritimler ilaçların doz uygulama zamanına bağlı olarak ilacın etkisini ve toksisitesini değiştirebilmektedir³.

Kemoterapötik ajanların çoğu, hücre bölünmesi sırasında hem tümör hem de sağlıklı hücreler (kemik iliği, oral mukoza, bağırsak ve cilt) için toksisite göstermektedir. Ayrıca, antikanser ajanların çoğu hücre bölünme döngüsünün belirli aşamalarında sitotoksik etkilerini gösterir. Örneğin, S fazındaki hücreler (DNA sentezi sırasında) 5-FU ve irinotekana daha hassastır. S fazındaki ve G2/M fazındaki hücrelerin oranı karanlıkta yaklaşık %50 artar. Aksine farelerde, kemik iliği hücreleri ışık döneminde baskın olarak G0/G1 fazındadır. Farelerde 5-FU, irinotekan, dosetaksel ve gempitabinin en iyi tolere edilebildiği zaman, erken aydınlık fazda antiapoptotik B hücreli lenfoma-2 (BCL2) ekspresyonunun yüksek ve proapoptotik BCL2 ilişkili X proteini (BAX) ekspresyonunun düşük olduğu zamana karşılık gelmektedir³.

İn vitro çalışmalar ayrıca, hedef proteinlerin ekspresyonlarının sirkadiyan değişiminin de ilacın etkisini değiştirebildiğini göstermiştir. Topoizomeraz 1 (TOP1) enzimi, kolorektal kansere karşı kullanılan antikanser ajan irinotekanın moleküler hedefidir. Bu enzimin irinotekan tarafından inhibe edilmesi, DNA kırılmalarına ve apoptoza yol açar. Dulong ve ark.⁸³, TOP1 enziminin senkronize edilmiş kolorektal kanser hücre kültürlerinde mRNA ve protein seviyesinde sirkadiyan ritim gösterdiğini bildirmiştir. İrinotekanın zamana bağlı uygulanması, apoptoza sürüklenen hücre miktarında zamana bağlı dört kata kadar fark oluşturmuştur^{82,83}. Everolimusun moleküler hedefi olan mTOR (Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi) ile ilgili yapılan çalışmalara Bölüm 2.3.5'te yer verilmiştir.

2.2.3. Kronotoksiste

Birçok antikanser ajan azalmış bağışıklık fonksiyonu ve mielosupresyon, gastrointestinal reaksiyonlar, karaciğer ve böbrek fonksiyon bozukluğu gibi ciddi toksisiteler ve yan etkiler göstermektedir. Her ne kadar kronoterapi yaklaşımı tüm advers etkilerin önlenmesini sağlayamasa da, etkileri hafifleterek hastanın tedaviye uyuncunu artırabilir³. Kemirgenlerde yapılan çalışmalarda; metotreksat⁸¹, siklofosfamid⁵⁷, dosetaksel ve doksorubisin^{108,113,114}, vinorelbin¹¹⁵, gempitabin ve sisplatin^{116,117}, 5-FU^{111,118} ve L-alanosin¹¹⁹, irinotekan^{19,120}, oksaliplatin¹²¹, selisiklib¹⁸ ve etoposidin¹²² de içinde olduğu 40'tan fazla antikanser ilacın tolere edilebilirliğinin dozlama zamanına bağlı olarak 10 kat kadar değişebildiği gösterilmiştir³. Ayrıca bu alanda yapılan insan çalışmalarına örnekler de Tablo 5'te sunulmuştur³.

Tablo 5: Antikanser ilaçların kronotoksitesine örnek bazı klinik çalışmalar

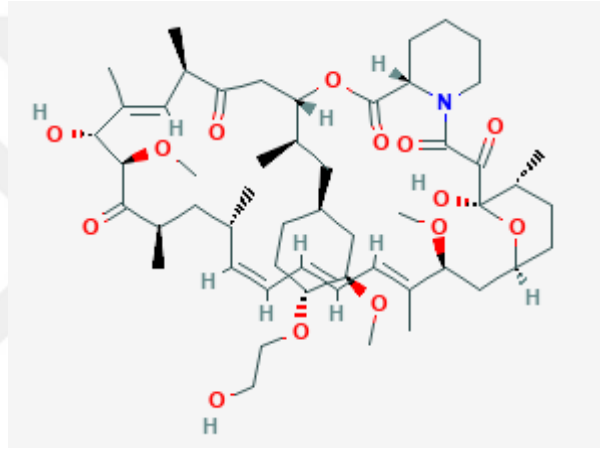
Antikanser İlaçlar	Kanser Tipi	Çalışma Tipi	Doz/Dozlama Zamanı	Etki/ Advers Etki/ Toksisite	Ref.
Sisplatin (gemsitabin ve dosetaksel ile kombine)	Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri	Randomize kontrollü çalışma	Sisplatin; 06:00 veya 18:00'de 30-dk i.v. infüzyon.	Lökopeni, nötropeni ve bulantı semptomları 18:00'de daha düşük	27
5-FU, LV ve oksaliplatin	Metastatik kolon ve rektum kanseri	Üç adet Faz III çalışmasının meta analizi	KronoFLO= 5-FU-LV; 22:15'ten 09:45'e, ve oksaliplatin; 10:15'ten 21:45'e.	Erkeklerde toplam sağkalım KronoFLO ile konvansiyonel tedaviye göre daha yüksek (p = 0.009).	123
Kapesitabin (radyoterapi ile kombine)	Rektum kanseri	Prospektif tek merkezli, tek kollu, faz II çalışması	Oral kapesitabin (1650 mg/m ²) %50 doz 8:00'de ve %50 doz 12:00'de	Hiçbir 4. derece toksisite ve 3. derece el-ayak sendromu gözlenmemiştir.	124
Everolimus (eksemestan ve tamoksifen ile kombine)	Metastatik meme kanseri	-	Oral sabah veya akşam uygulaması	Everolimusun sabah uygulanması metabolik değişiklikleri ve bitkinliği azaltmıştır. Sabah uygulaması sonrası pnömoni gözlenmemiştir.	125
Radyoterapi	Kemik metastazı	Kohort çalışması	Uygulama zamanları; 08:00- 11:00, 11:01 - 14:00 veya 14:01- 17:00	11:01-14:00 arası uygulamada daha yüksek etkinlik gözlenmiştir.	126

i.v.; intravenöz, 5-FU; 5-fluorourasil, LV;lökovorin.

2.3. Everolimus

2.3.1. Tanımı

Everolimus, rapamisinin memeli hedefinin bir inhibitörüdür (mTOR). Rapamisinin eter türevi olan everolimus, immunosüpresan ve antineoplastik bir ajandır. Everolimusun kimyasal adı (1R, 9S, 12S, 15R, 16E, 18R, 19R, 21R, 23S, 24E, 26E, 28E, 30S, 32S, 35R) -1,18-dihidroksi-12 - {(1 R) -2 - [(1 S, 3R, 4R) -4- (2-hidroksietoksi) -3-metoksisikloheksil] -1-metiletil} -19,30-dimetoksi-15,17,21,23,29,35-heksametil-11,36-dioksa-4-aza-trisiklo [30.3.1.04,9] hekzatriakonta-16,24,26,28-tetraen-2,3,10, 14,20-pentaen'dur. Moleküler formülü $C_{53}H_{83}NO_{14}$ ve ağırlığı 958,2 g/mol'dür. Yapısal formülü Şekil 4'te verilmiştir¹²⁷.



Şekil 4: Everolimusun yapısal formülü

2.3.2. Farmakodinamik Özellikleri

Everolimus, mTOR sinyal iletim yolunu hedef alan bir rapamisin türevidir. mTOR, bir besin sensörü olarak işlev gören ve protein sentezini düzenleyerek hücre metabolizmayı kontrol eden, böylece hücre büyümesini ve çoğalmasını uyararak bir serin-treonin kinazdır. mTOR aktivitesinin bir çok kanser türünde arttığı bilinmektedir. Everolimus, hücre içinde immünofilin FK506'ya (takrolimus) bağlanan protein 12 Da izoformuna (FKBP12) bağlanarak bir kompleks oluşturur ve bu kompleks mTOR'un FKBP-rapamisin-bağlanan bölgesine (mTOR kompleks 1'in parçası) bağlanarak mTOR kompleksi-1 (mTORC1) aktivitesini ve aşağı yönde sinyali inhibe etmektedir. Başka bir multiprotein kompleksi olan mTOR kompleksi 2, mTOR rapamisin veya rapamisin ile ilişkili bileşikler tarafından inhibe edilemeyecek bir formda bulunmaktadır. Everolimusun, FK506'nın FKBP12'ye bağlanmasının %50'sini (IC_{50}) inhibe ettiği dozu

5,3 nM'dur. Rapamisin ve everolimus, hücre içi proteine, FKBP-12'ye benzer afinitelerle bağlanır (sırasıyla 3,3 nM ve 5,3 nM)^{12,128,129}.

mTORC1 sinyal yolağının inhibisyonu, hücre büyümesinin düzenlenmesinde görev alan translasyonel aktivatör S6 ribozomal protein kinaz (S6K1) aktivitesini azaltmak suretiyle; hücre döngüsü, anjiyogenez ve glikoliz ile alakalı olan proteinleri düzenleyen translasyonel baskılayıcı ökaryotik başlangıç faktörü 4E bağlayıcı protein 1'in (4E-BP1) aktivitesini azaltarak proteinlerin translasyonu ve sentezini engeller. Everolimus, tümörün anjiyojenik süreçlerini potansiyalize eden vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) düzeylerini azaltır. Everolimus, tümör hücreleri, endotelial hücreler, fibroblastlar ve vasküler düz kas hücrelerinin büyümesi ve proliferasyonunun potent bir inhibitörüdür. Solid tümörlerde *in vitro* ve *in vivo* glikolizi azalttığı gösterilmiştir^{12,128}.

Pankreatik tümör taşıyan sıçanlara plaseboya karşılık everolimus uygulandığında, 4E-BP1 fosforilasyonunun azaldığı ve S6K1'in tümör, deri ve periferik kan mononükleer hücre (PBMC) ekstraktlarında aktivitesinin azaldığı bulunmuştur. 4E-BP1 ve S6K1 aşağı yönde mTOR efektörleridir. Everolimusun yaptığı bu değişikliklerin hücrelerin G1 fazında birikimine ve büyümenin yavaşlamasına yol açtığı gösterilmiştir. Everolimus tedavisinin antitümör aktivitesi, CA20948 pankreas tümör taşıyan sıçanlarda PBMC, tümör ve deride uzun süreli S6K1 inaktivasyonuna bağlı olduğu gösterilmiştir^{12,15,128}.

Everolimus ayrıca antianjiyogenik aktivite göstermektedir. Bir çalışmada, everolimusa duyarlı ve dirençli hücre hatlarından köken alan tümörlerde, everolimus uygulamasına bağlı olarak tümör damarlanmasının, plazma ve tümör VEGF seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. Bir başka çalışmada, radyasyon uygulanmış umbilikal ven endotel hücrelerinde everolimus uygulamasına bağlı olarak apoptozun arttığı; farelerde everolimus uygulaması sonrasında ise radyasyon uygulanmasından bağımsız olarak tümör damarlanmasının azaldığı bulunmuştur^{12,128,129}.

Afinitor® (5 ve 10 mg tablet) malign tümörlerde ve Votubia® (2,5, 5 ve 10 mg tablet; 2, 3 ve 5 mg dağılıbilir tablet) benign tümörlerde Avrupa ve Türkiye'de onaylanmıştır. Everolimus aynı zamanda immünosüpresif bir ajandır. Avrupa ve Türkiye'de, kalp ve böbrek nakli alıcılarında, organ reddinin önlenmesi için Certican® (0,25 ve 0,75 mg tablet) adı altında onaylanmıştır. Everolimus kemirgenlerde transplant

reddinin önlenmesinde kullanıldığında, 5-10 ng/mL tam kan çukur seviyesi ile maksimum etkinlik elde edilmiştir¹³⁰. Kemirgenlerde gösterilen tam kan çukur düzeyleri insan çalışmaları ile benzerdir. Hastalarda günlük dozun, kan seviyeleri 3 ng/ml'nin üzerinde olacak şekilde ayarlandığında organ reddi riskini azaltabileceği, 15 ng/ml'nin altında olacak şekilde ayarlandığında ise advers etkileri engelleyebileceği ileri sürülmüştür¹³¹.

2.3.3. Farmakokinetik Özellikleri

2.3.3.1. Absorpsiyon

Yapılan çalışmalarda oral (p.o.) ve intravenöz (i.v.) yoldan uygulanan everolimus uygulamasının sonucunda, tek doz radyoaktif işaretli everolimusun oral emilimi farede %12, sıçanda %39-43, maymunda %18 ve insanlarda %11 olarak saptanmıştır. Oral biyoyararlanım farede %5, sıçanda %14-26 ve maymunda %6 olarak belirlenmiştir¹²⁹.

0,9 mg/kg ³H-işaretli everolimusun CD-1 soyu erkek farelere tek doz olarak i.v. veya oral yolla verildiği bir çalışmada everolimusun oral biyoyararlanımı değerlendirilmiştir. Farede oral biyoyararlanımın %5 civarı olduğu ve uygulanan dozun yaklaşık %12'sinin absorbe olduğu bulunmuştur. C_{maks} 'a ulaşma süresi oral uygulama ile 0,5 ve i.v. uygulama ile 1 saat olarak bulunmuştur. CD-1 erkek farelere 0,9 mg/kg everolimusun tek doz i.v. bolus enjeksiyon olarak verildiği bir başka çalışmada farmakokinetik parametreler hesaplanmıştır. Everolimusun AUC değeri 18,7 µg.sa/ml olarak bulunmuştur. Yarılanma ömrü, klirens ve dağılım hacmi değerleri ise sırasıyla 9,83 saat; 0,79 ml/dk/kg ve 0,37 L/kg'dir¹²⁹.

İlerlemiş solid tümörlü hastalarda günlük 5 ve 10 mg oral everolimus uygulamasından sonra, doruk everolimus konsantrasyonuna açlık durumunda ya da yağ içermeyen bir öğün ile, 1 saatte ulaşılmaktadır. C_{maks} , 5 ve 10 mg'lık doz aralığında, uygulanan doz ile orantılıdır. Sağlıklı gönüllülerde, yüksek yağlı öğünler 10 mg everolimus uygulamasından sonra sistemik maruziyeti (AUC) %22 oranında ve C_{maks} değerini %54 oranında azaltmıştır. Düşük yağlı öğünler AUC'yi %32 ve C_{maks} değerini %42 azaltmıştır. Ancak besinler emilim sonrası faz konsantrasyonu-zaman profili üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmamıştır^{12,15,127}.

Everolimusun farklı türlerde belirlenen farmakokinetik parametrelere ait bulguları karşılaştırmalı olarak Tablo 6'da sunulmuştur^{15,129}.

Tablo 6: Everolimusun çeşitli türlerdeki farmakokinetik parametre değerleri

	Fare	Sıçan	Maymun	İnsan
Doz (mg/kg)	0,9	1,5	5	0,038
$t_{1/2}$ (saat)	4-6	61-47	18	33
t_{maks} (saat)	1	1,6-2,2	1,2	1,5
Oral biyoyararlanım	%5	%14-26	%6	%30 (yüksek varyasyon)
Proteine bağlanma	%99 (%0,1 serbest)	%93 (%7,6 serbest)	%85 (%16 serbest)	%75 (%25 serbest)
Eliminasyon: feçes	%95-99	%68-89	%65-75	%79
Eritrositlere dağılım	%2	%60	-	%80
V_{ss} (L/kg)	0,42	44-53	-	-

$t_{1/2}$: plazma yarılanma ömrü; t_{maks} : maksimum plazma konsantrasyonunun görüldüğü zaman; V_{ss} : karaklı durum dağılım hacmi

2.3.3.2. Dağılım

Maymun (%16 serbest), sıçan (%7,6 serbest) ve insanlar (%25 serbest) arasında plazma proteinlerine bağlanma oranı benzer bulunmuştur. Farede ise proteinlere daha yüksek oranda bağlanmaktadır (%0,1 serbest). Sıçanda doku dağılımı, radyoaktif işaretli everolimusun i.v. verilmesinden 5 dakika sonra radyoaktivite ölçülerek belirlenmiştir. Radyoaktivite karaciğerde ve böbreklerde en yüksek bulunmuştur. Çoğu dokuda işaretli everolimusun yarı ömrü beyin (10 gün), testis (13 gün) ve epididim (5 gün) hariç 1,4 ile 1,9 gün arasında saptanmıştır. Oral dozu takiben 2 saat sonra kalp, karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, tiroid bezi ve adrenal bezlerde en fazla miktarda işaretli everolimus bulunmuştur¹²⁹.

Everolimusun *in vitro* dağılımı, plazma proteinlerine bağlanma oranı ve stabilitesini belirlemek amacıyla CD-1 farelerden alınmış tam kana farklı konsantrasyonlarda everolimus uygulanmıştır. Plazma proteinlerine bağlanma eritrosit ayırma yöntemi ile tayin edilmiştir. %0,1 ila %60 plazma dilüsyonlarında, 5-5000 ng/mL konsantrasyon aralığında ³H-işaretli everolimus uygulanmıştır. 5-5000 ng/mL konsantrasyon aralığında ³H-işaretli everolimusun çoğunluğu, plazma fraksiyonunda (%98±4) bulunmuştur. 10 ng/mL'de plazmada bağlı fraksiyon %99,9'dur. Bu durum everolimusun farede plazma proteinlerine diğer türlere göre çok yüksek oranda bağlandığını göstermektedir. Bu oran sıçan ve insanda yaklaşık %75 ve maymundaki yaklaşık %84'tür¹²⁹.

Everolimusun fare (CD-1), maymun ve insan plazmasındaki stabilitesi bu türlerden alınan plazmaya ^3H -işaretli 100 ng/ml everolimusun eklenmesi ile saptanmıştır. Everolimusun plazma yarılanma ömrü farede 19,7, maymunda 1,9 ve insanda 4 saat olarak bulunmuştur. Fareye göre maymun ve insanda plazmadaki stabilitesi daha azdır, yarılanma ömrü kısadır. Sıçanlardan alınan plazma ile yapılan bir çalışmada everolimus 5-5000 ng/ml konsantrasyon aralığında uygulanmış ve eritrosit ayırma yöntemi ile dağılım tayin edilmiştir. Everolimusun kandaki dağılımının konsantrasyona bağlı değiştiği saptanmıştır. Bu oran 5 ng/ml'de %33,6 ve 5000 ng/mL'de %85,5'dir. Plazmaya bağlı olduğu fraksiyon ise %92,4'tür. Konsantrasyona bağlı olarak everolimusun total kandaki dağılımında gözlenen bu değişiklik maymun ve insanda da gözlenmiş ancak farede gözlenmemiştir¹²⁹.

Erkek Wistar sıçanlara everolimusun i.v. infüzyon veya bolus şeklinde uygulandığı bir çalışmada beyine dağılımı araştırılmıştır. ^3H -işaretli everolimusun beyine dağılımı nonlineer ve doza-bağımlı bulunmuştur. 0,1-1 mg/kg doz aralığında beyin/kan dağılım oranı düşüktür ve yaklaşık 0,3 bulunmuştur. 30 mg/kg dozda ise bu oran yükselmiş ve 3'e kadar çıkmıştır. Everolimus metabolitlerinin, everolimus kadar beyine penetre olamadığı bulunmuştur¹²⁹.

İnsanda 5 ila 5000 ng/mL aralığında konsantrasyona bağlı olan everolimusun kan-plazma oranı %17 ile %73 arasındadır. 10 mg/gün everolimus uygulanan kanser hastalarında, plazmada bulunan everolimus oranı, kan konsantrasyonunun yaklaşık %20'si olmuştur. Plazma proteinine bağlanma oranı sağlıklı gönüllülerde ve orta şiddette karaciğer yetmezliği olanlarda yaklaşık %74'tür. İlerlemiş solid tümörleri olan hastalarda dağılım hacmi, sanal merkezi kompartman için 191 L ve sanal periferik kompartman için 517 L olarak saptanmıştır^{12,15,127}.

2.3.3.3. Metabolizma

Everolimusun uygulandığında fare, sıçan ve insanda radyoaktivitenin %31 ile %63'i ve maymunda ise %12'si kanda bulunur. Everolimusun insanda altı, maymun, sıçan ve farede beş temel metaboliti belirlenmiştir. Bunlar üç tane monohidroksile metabolit, iki hidrolitik açık halkalı ürün ve everolimusun fosfatidilkolin konjugatıdır. Rapamisin de bir metabolit olarak ortaya çıkabilir, ancak klinik farmakokinetik çalışmalarda toplam AUC'ye oranla az miktarda (~%5) bulunmuştur. Bu metabolitler toksisite çalışmalarında kullanılan hayvan türlerinde de tanımlanmıştır ve aktiviteleri ana bileşenden 60-500 kat daha düşüktür. Bu nedenle, everolimusun genel farmakolojik

aktivitesine en büyük katkıyı ana ilacın yaptığı düşünülmektedir. Everolimus ve metabolitler kan beyin bariyerine ve plasentaya nüfuz edebilir ve sıçanlarda süte geçebilir. RAD metabolizmasında rol oynayan ana enzim CYP3A4'tür. Everolimus P-gp'nin substratıdır. CYP3A4 ve P-gp inhibitörleri ketokonazol ve itrakonazolün everolimus biyotransformasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir^{12,15,127,129}.

Everolimusun faredeki biyotransformasyonunu değerlendirmek için CD-1 erkek farelere 0,9 mg/kg dozunda i.v. ve oral yoldan ³H-işaretli everolimus uygulanmıştır. Fareler metabolik kafeslerde tutularak feçes ve idrar toplanmıştır. Oral uygulama sonrası kandaki majör komponentin ana ilaç (%63) olduğu saptanmıştır. Biyotransformasyon ile everolimusun hidroliz/dehidrasyon ve hidroksilasyon formları oluşmuştur. Everolimusun metabolizması sinomolgus maymunlarda da değerlendirilmiştir. Orogastrik tüp ile 5 mg/kg ³H-işaretli everolimus uygulanmıştır. Metabolizma hidroliz/dehidrasyon ve hidroksilasyon formları ile olmuştur. Halka açma hidrolizi ve hidroksile formlar yoluyla metabolizma, insanda *in vivo* metabolizma yoluyla saptananlar ile benzer bulunmuştur¹²⁹.

2.3.3.4. Eliminasyon

Radyoaktivitenin büyük bir kısmı fare (%95-99), sıçan (%68-89), maymun (%66-75) ve insanlarda (%79) feçeste elimine edilmiştir. İdrardan atılımı düşüktür (~%7). Safra kanalı kanüle edilmiş sıçanlarda yaklaşık %71 biliyer atılım gözlenmiştir. Farelere 0,9 mg/kg dozunda i.v. ve oral yoldan ³H-işaretli everolimus uygulamasından sonra, hem i.v. hem de oral uygulamada radyoaktivitenin 48 saat sonunda %96 oranında atıldığı saptanmıştır. Atılımın neredeyse tamamı her iki uygulama yolunda da feçes ile olmuştur (>%95)¹²⁹.

Everolimusun ilerlemiş solid tümörleri olan hastalara 10 mg dozunda verildikten sonra ortalama oral klerens (Cl/F) değeri 24,5 L/saattir. Everolimusun ortalama eliminasyon yarılanma ömrü insanda yaklaşık olarak 30 saattir. Organ nakli hastalarında siklosporin ile birlikte tek doz radyoaktif işaretli everolimus uygulaması sonrasında, radyoaktivitenin %80'i feçes ile %5'i idrar ile atılmıştır. Ana ilaç feces ya da idrarda belirlenmemiştir^{12,15,127}.

2.3.3.5. Kararlı Durum Farmakokinetiği

İlerlemiş solid tümörleri olan hastalarda günlük 5-10 mg doz aralığında everolimus uygulaması ile kararlı durum AUC değerine ulaşılmıştır. Kararlı durum

koşullarına, günlük doz rejimi ile 2 haftada ulaşılmaktadır. C_{maks} , 5 ve 10 mg günlük doz aralığında dozla orantılıdır. t_{maks} değerine doz uygulamasından 1 ila 2 saat sonra ulaşılmıştır. Kararlı durumda AUC ve doz öncesi çukur konsantrasyon arasında anlamlı bir korelasyon gözlenmiştir^{12,15}.

2.3.3.6. Deney Hayvanlarında Yapılan Diğer Çalışmalar

O'Reilly ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada everolimusun fare ve sıçandaki farmakokinetiği karşılaştırılmıştır. Everolimusun hem farelerde hem de sıçanlarda kan hücrelerine dağılımı, plazma proteinlerine bağlanması, kan ve dokularda (beyin dahil) farmakokinetik parametreleri belirlenmiştir. Eritrositlere dağılım, plazma proteinlerine bağlanma, plazma/kan yarılanma ömrü, oral biyoyararlanım, dağılım hacmi, doku/tümör penetrasyonu ve eliminasyon dahil olmak üzere everolimusun farmakokinetik özellikleri fareler ve sıçanlar arasında farklılık göstermiştir. Farede, ^3H -işaretli everolimusun kan hücreleri ve plazma arasındaki dağılımı, 5-5000 ng/mL aralığında konsantrasyondan bağımsız bulunmuştur. Everolimusun çoğu, 98 ± 4 oranı ile plazmada saptanmıştır, eritrositlerde sadece 2 oranında bulunmuştur¹³². Sıçanlar ve insanlarda ise bu oran sırasıyla 60 ve 80 'dir¹³³. ^3H -işaretli everolimusun plazma protein bağlanma oranı, fare plazmasında $99,9$ iken bu oran sıçan ve insanda fareye göre daha düşük gözlenmiş ve sırasıyla 92 ve 75 olarak bulunmuştur^{132,133}.

Everolimusun Balb/c çıplak farelere oral yoldan bir defa 5 mg/kg dozunda uygulanması ile C_{maks} (~ 4530 ng/mL) değerine 1 saatte ulaşılmıştır. Everolimus 24 saate kadar (C_{24} ; ~ 115 ng/mL) kanda saptanmıştır. Yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) $\sim 4,3$ saat ve $\sim AUC_{0-24}$ ~ 29800 ng.sa/mL olarak saptanmıştır. Everolimus, gastrointestinal sistem (0,5 saat) ve deri (6 saat) dışında tüm dokularda C_{maks} 'a 1 saatte ulaşmıştır. C_{maks} değerleri ~ 3961 ng/g (gastrointestinal sistem) ve ~ 69 ng/g (beyin) arasında değişmiştir. Everolimus, 24 saate kadar tüm dokularda saptanmıştır. Dokulardaki yarılanma ömrü $\sim 4,0$ saat (gastrointestinal sistem) ile $\sim 9,6$ saat (deri) arasındadır. KB-31 insan tümörü bulunan BALB/c çıplak farelere, everolimus 5 mg/kg dozunda p.o. bir defa uygulanmış ve 72 saate kadar plazma ve tümör, deri, kas dokuları elde edilmiştir. Plazma ve kas dokusunda C_{maks} 'a (sırasıyla ~ 2513 ng/mL ve ~ 144 ng/g) 1 saatte, ancak tümör ve deride 2 saatte (sırasıyla ~ 102 ng/mL ve ~ 71 ng/g) ulaşılmıştır. Everolimus, uygulamadan 72 saat sonraya kadar tüm dokularda saptanmıştır. Tümörden eliminasyonu ($t_{1/2}$; ~ 16 sa), plazma, deri veya kasa göre daha yavaş bulunmuştur (sırasıyla $\sim 7,5$, ~ 9 ve ~ 10 sa). Everolimus tümör seviyeleri sıçanlarda farelere göre dört

ile sekiz kat daha yüksek bulunmuştur. Sıçan tümörlerinin fare tümörlerine kıyasla, tümör ilaç alımında farklılıklara katkıda bulunabilecek olan 2 kat daha büyük plazma içeriğine ve geçirgenliğe sahip olduğu saptanmıştır. Günlük uygulamadan sonra her iki türde de bağlanmamış (serbest) everolimus, benzer C_{maks} ve AUC değerleri ile maksimum antitümör etkileri göstermiştir. Hem fare hem sıçanda, everolimusun beyin penetrasyonunun zayıf ancak doza-bağımlı olduğu gösterilmiştir. Ancak beyine penetre olduktan sonra yavaş ayrıldığı beyin dokusunda yarılanma ömrünün uzun olduğu ve yavaş metabolize olduğu sıçanlarda gösterilmiştir¹³².

Chu ve ark.'ın yaptığı çalışmada hem *mdr1a*-/*1b*- genleri silinmiş (knockout) farelerde hem de P-gp inhibitörü de olan antitümöral ilaç lapatinib ile kombine olarak normal farelerde everolimus farmakokinetiği araştırılmıştır. *mdr1a*-/*1b*- geni silinmiş farelere ve Fvb (normal) farelere everolimus 0,25 mg/kg uygulanmış, plazma everolimus AUC'si geni silinmiş farelerde 1,3 kat artmıştır. Everolimus plazma AUC'si 2 gün lapatinib uygulanan farelerde ise verilmeyenlere göre 2,6 kat artmıştır. Lapatinib uygulanan hayvanlarda P-gp'nin duodenumdaki ekspresyonu %38,5 daha az bulunmuştur¹³⁴.

Minocha ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada tirozin kinaz inhibitörü olan vandetanibin P-gp ve meme kanseri rezistans proteini (BCRP1) transfekte edilmiş Madin-Darby köpek böbrek (MDCK) hücrelerine ve FVB farelerde beyine geçirgenliğine everolimusun etkisi incelenmiştir. Everolimus, MDCK- BCRP1 hücrelerinde vandetanibin hücre içine girişini artırmıştır. Aynı çalışmada MDCK-MDR1 hücrelerinde everolimus P-gp'nin substratı olan ³H-işaretili digoksinin hücre içine girişini, P-gp aracılı eflusu inhibe ederek artırmıştır. FVB farelerde everolimus vandetanibin beyine geçişini 3-4 kat artırmıştır¹³⁵.

Pawaskar ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada everolimus ve sorafenib tek veya kombine halde tek doz veya çoklu doz olarak normal veya tümör taşıyan farelere uygulanmıştır. BALB/c, CB17-SCID ve tümör taşıyan CB17-SCID farelerine uygulanan everolimusun zamana karşı plazma ve doku konsantrasyonları elde edilmiştir. Oral uygulamadan sonra everolimusun doruk konsantrasyona plazma ve çoğu dokuda 1 saatte, adipoz doku ve deride ise 6 saatte ulaştığı bildirilmiştir. 24 saate kadar tüm dokularda everolimus saptanmıştır. Everolimusun tek başına ve kombinasyon halinde verildiği çalışmalarda ilacın AUC'si karşılaştırıldığında, sorafenib ile

kombinasyonun everolimus farmakokinetiğine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmamıştır¹³⁶.

Tang ve ark. ABCB1, ABCG2 ve CYP3A'nın everolimusun kan ve beyine maruziyetindeki rolünü netleştirmek için normal ve Abcb1a/1b^{-/-}, Abcg2^{-/-}, Abcb1a/1b; Abcg2^{-/-} ve Cyp3a^{-/-} geni silinmiş fare modelleri kullanmışlardır. Everolimus uygulamasının ardından, Abcb1a/1b^{-/-} ve Abcb1a/1b; Abcg2^{-/-} farelerde beyin konsantrasyonları ve beyin-karaciğer oranları önemli ölçüde artarken, ancak Abcg2^{-/-} farelerde değişiklik görülmemiştir. Plazma kompartmanında bulunan everolimus oranı, tüm geni silinmiş suşlarda yüksek oranda artmıştır. Everolimus normal hayvanlarda plazmada hızlı şekilde parçalanmamış ancak geni silinmiş farelerde olmamıştır. Normal farelere göre geni silinmiş hayvanlarda Ces1c 80 kat daha fazla bulunmuştur ve Ces1c'nin everolimusun plazmada kalış süresinin (stabilitesinin) artırdığı saptanmıştır. Everolimus ayrıca fare plazmasında irinotekanın (karboksilesterazlar ile metabolize olur) hidrolizini inhibe etmiştir¹³⁷.

2.3.3.7. Farmakokinetik İlaç Etkileşmeleri

Sağlıklı gönüllülerde, yalnızca everolimus tedavisine kıyasla, belirtilen ilaçlar ile birlikte uygulandığında everolimus maruziyetinde belirgin artışlar olmuştur: Ketokonazol (güçlü bir CYP3A4 ve P-gp inhibitörü) - C_{maks} ve AUC, sırasıyla 3.9 ve 15.0 kat artmıştır. Eritromisin (orta derecede bir CYP3A4 inhibitörü ve bir Pgp inhibitörü) - C_{maks} ve AUC, sırasıyla 2.0 ve 4.4 kat artmıştır. Verapamil (orta derecede bir CYP3A4 inhibitörü ve bir Pgp inhibitörü) - C_{maks} ve AUC, sırasıyla 2.3 ve 3.5 kat artmıştır^{12,127}.

Sağlıklı gönüllülerde everolimusun CYP3A4'ün güçlü bir indükleyicisi olan rifampin ile birlikte uygulanması, everolimus AUC ve C_{maks}'ı tek başına everolimus tedavisine kıyasla sırasıyla %63 ve %58 azaltmıştır. St. John's Wort everolimus maruziyetini tahmin edilemez bir şekilde azaltabilmektedir ve birlikte kullanılmasından kaçınılması gerekir^{12,127}.

Sağlıklı gönüllüler üzerinde yapılan bir araştırma, oral midazolam (CYP3A4 substratı) everolimus ile birlikte uygulandığında, midazolam C_{maks}'ı %25 ve AUC'si %30 artmıştır. Everolimus ve eksemestanın birlikte uygulanması, eksemestanın C_{min} değerini %45 ve C_{2sa}'yı %64 arttırmıştır. Bununla birlikte, kombinasyonu alan hormon reseptörü pozitif, HER2 negatif ileri meme kanseri olan hastalarda eksemestan ile

ilişkili advers olaylarda bir artış gözlenmemiştir. Everolimus ve depo oktreotidin birlikte uygulanması, oktreotid C_{min} değerini yaklaşık %50 arttırmıştır^{12,127}.

2.3.4. Everolimusun Endikasyon, Kontrendikasyon ve Yan Etkileri

2.3.4.1. Endikasyonları

Afinitor® tabletin endikasyonları aşağıda sıralanmıştır¹²:

- Hastalığı VEGF hedefli tedavi sırasında veya sonrasında progresyon gösteren metastatik renal hücreli karsinomu (RHK) olan hastaların tedavisinde,
- Cerrahi ya da diğer tedavi yaklaşımlarına uygun bulunmayan, son 12 ay içinde Solid Tümörlerde Tepki Değerlendirme Kriterleri'ne (RECIST) göre progresyon gösteren, metastatik ya da lokal ileri evrede olan, daha önce somatostatin analogu kullanmış ve sonrasında progresyon gösteren iyi diferansiye pankreatik nöroendokrin tümörü (NET) olan hastalarda,
- Cerrahi ya da diğer tedavi yaklaşımlarına uygun bulunmayan, son 12 ay içinde RECIST kriterlerine göre progresyon gösteren metastatik ya da lokal ileri evrede olan, daha önce somatostatin analogu ve bir seri sistemik kemoterapi kullanmış ve sonrasında progresyon gösteren orta diferansiye (Ki-67: %3-20) pankreatik NET olan hastalarda endikedir.
- Rezekte edilemeyen metastatik veya lokal ilerlemiş hastalığı olan, gastrointestinal veya akciğer kökenli progresif iyi derecede diferensiasyon gösteren, fonksiyonel olmayan, WHO performans skoru 0-1 olan, fonksiyonel olmayan NET bulunan erişkin hastalarda en az bir basamak tedavi sonrasında kullanımı endikedir.
- Daha önce relaps/metastatik meme kanseri için sadece bir seri kemoterapi ve bir seri non-steroidal aromataz inhibitörü kullanmış ve sonrasında progresyon göstermiş, HER 2/neu negatif, postmenopozal, semptomatik visseral hastalığı olmayan, hormon reseptörü kuvvetli pozitif ($\geq$ %40), hastalarda sadece eksemestanla birlikte progresyona kadar kullanımı endikedir.

Tablo 7: Everolimusa ait klinik çalışmalardan elde edilen advers ilaç reaksiyonları

Hastalık/Organ Sınıfı	Çok Yaygın	Yaygın	Yaygın Olmayan
Enfeksiyonlar ve enfestasyonlar	Enfeksiyonlar (Virüs, bakteri ve mantar enfeksiyonları), alt solunum yolu ve akciğer enfeksiyonları (pnömoni dahil), üst solunum yolu enfeksiyonu, idrar yolu enfeksiyonu	Sepsis, yara enfeksiyonu	
İyi huylu, kötü huylu ve spesifiye edilmemiş neoplazmlar		Malign veya belirtilmemiş tümörler, malign veya belirtilmemiş deri neoplazmları	Lenfomalar / Transplantasyon sonrası lenfoproliferatif bozukluklar
Kan ve lenf sistemi hastalıkları	Anemi/eritrositopeni, lökopeni, trombositopeni	Pansitopeni, trombotik mikroanjiyopatiler (trombotik trombositopenik purpura, hemolitik üremik sendrom dahil)	
Endokrin hastalıkları			Erkeklerde hipogonadizm (testosteron düzeylerinde azalma, FSH ve LH düzeylerinde artma)
Metabolizma ve beslenme hastalıkları	Hiperlipidemi (kolesterol ve trigliserit artışı), yeni başlangıçlı diyabet, hipokalemi		
Psikiyatrik hastalıkları	Uykusuzluk, anksiyete		
Sinir sistemi hastalıkları	Baş ağrısı		

Kardiyak hastalıklar	Perikardiyal efüzyon	Taşikardi	
Vasküler hastalıklar	Hipertansiyon, venöz tromboembolik olaylar	Burun kanaması, lenfosel, renal greft trombozu	
Solunum bozuklukları ve mediastinal hastalıklar	Plevral efüzyon, öksürük, dispne		İnterstisyel akciğer hastalığı
Gastrointestinal hastalıklar	İshal, bulantı, kusma, karın ağrısı	Pankreatit, stomatit/ağızda ülserasyon, orofaringeal ağrı	
Hepato-bilier hastalıklar			Enfeksiyöz olmayan hepatit, sarılık
Deri ve deri altı dokusu hastalıkları		Anjiyoödem, akne, döküntü	
Kas-iskelet bozuklukları, bağ doku ve kemik hastalıkları		Miyalji, artralji	
Böbrek ve idrar yolu hastalıkları		Proteinüri, renal tübüler nekroz	
Üreme sistemi ve meme hastalıkları		Eretil fonksiyon bozukluğu	
Genel bozukluklar ve uygulama bölgesine ilişkin hastalıklar	Ağrı, ateş, periferik ödem, yara iyileşmesinde bozulma	İnsizyonel fitik	
Laboratuvar bulguları		Hepatik enzim anormallikleri	

Certican® tabletin endikasyonları aşağıda sıralanmıştır¹³⁸:

- Böbrek ve kalp transplantasyonunda, allojenik böbrek veya kalp nakledilen ve düşük-orta dereceli immünolojik riski bulunan erişkin hastalarda organ reddine karşı korunma amacıyla kullanılır. Böbrek ve kalp transplantasyonunda, siklosporin ve kortikosteroidlerle birlikte kullanılmalıdır.
- Karaciğer transplantasyonunda, karaciğer nakli olan hastalarda organ reddinin profilaksisi için endikedir. Karaciğer naklinde, takrolimus ve kortikosteroidlerle kombinasyon halinde kullanılmalıdır.

Votubia® tablet endikasyonları aşağıda sıralanmıştır¹³⁹:

- Cerrahi tedaviye uygun olmayan ancak tedavi ihtiyacı olan Tuberoz Skleroz Kompleksle (TSC) ilintili subependimal dev hücreli astrositom (SEGA) hastalarının tedavisinde endikedir.

Votubia® dağılıbilir tablet endikasyonları aşağıda sıralanmıştır¹⁴⁰:

- TSC ile ilişkili refrakter nöbetlerde, sekonder jeneralizasyonun eşlik ettiği veya etmediği refrakter parsiyel başlangıçlı nöbetleri TSC ile ilişkili olan 2 yaş ve üzeri hastalarda ek tedavi olarak endikedir.
- Cerrahi tedaviye uygun olmayan ancak tedavi ihtiyacı olan TSC ile ilintili SEGA hastalarının tedavisinde endikedir.

2.3.4.2. Kontrendikasyonları

Everolimus içeren tüm preparatlar, everolimus ve diğer rapamisin türevlerine karşı bilinen aşırı duyarlılığı olan hastalarda kontrendikedir^{12,138-140}.

2.3.4.3. Yan Etkileri

Everolimusun klinik çalışmaların sonuçlarına göre derlenen advers etkileri sıklıklarına göre Tablo 7'de sunulmuştur^{12,138-140}.

2.3.5. mTOR Yolağının Sirkadiyan Ritim ile İlişkisi

SKÇ, retina tarafından alınan ışık sinyalleriyle düzenlenir. SKÇ'ye iletilen ışık sinyallerinin, çekirdek saat genlerinin transkripsiyonunu ve translasyonunu düzenleyerek saati sıfırladığı bilinmektedir. SKÇ'deki mTORC1'in aktivitesinin faz bağımlı şekilde fotik sinyallerle düzenlendiği gösterilmiştir. Karanlık fazdaki ışık sinyalleri, SKÇ'de mTOR aşağı akış hedefleri, S6K1 ve 4EBP1'in fosforilasyonunu

indükler¹⁴¹. Ayrıca, ışığın indüklediği mTORC1 aktivasyonunun, SKÇ'de artan PER1 ve PER2 protein ekspresyonu ile sonuçlandığı ve mTORC1'in rapamisin ile inhibe edilmesinin, fare lokomotor aktivitesinde ışık kaynaklı faz kaymasında bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir^{142,143}. SKÇ'deki mTORC1 aktivitesi, saat geni Per1 ekspresyonunun ritimleriyle ilişkili sirkadiyan ritimler göstermektedir. Bu veriler gün içindeki mTORC1 aktivitesinin SKÇ saati tarafından kontrol edildiğini göstermektedir¹⁴⁴. SKÇ ayrıca 4EBP1 ekspresyonunun sirkadiyan ritimlerini mTORC1'e bağımlı bir şekilde kontrol etmektedir. Bu düzenlemenin fizyolojik önemi, 4EBP1 geni silinmiş (knockout) fareler kullanılarak gösterilmiştir. Bu farelerin, ışık/karanlık döngüsü değişimine daha hızlı adapte oldukları ve sürekli ışığa maruziyetin neden olduğu desenkronizasyona dirençli oldukları göstermiştir. Cao ve ark.¹⁴⁵ mTORC1/4EBP1 tarafından yapılan translasyon kontrolünün, SKÇ'deki ana saatin adaptasyonu için gerekli olduğunu ileri sürmüştür.

Periferik saatler de mTOR sinyaliyle bağlantılıdır. mTORC1'in karaciğerdeki ve diğer bazı çevresel organlardaki aktivitesi, hem beslenme hem de açlık koşulları altında sirkadiyan ritim gösterir. Bu ritimler, periyodik beslenmenin basit bir sonucu değildir, bazı periferik saatlerin rolü ile oluşmaktadır¹⁴⁶. mTORC1 aktivitesindeki bu ritimler, çekirdek saat genleri Bmal1 ve Cry1/2 bulunmayan farelerde korunmuştur¹⁴⁷. Transkripsiyon faktörü BMAL1, çeşitli dokularda mTORC1 aktivitesini negatif olarak düzenler. Bu düzenleme kısmen, Deptor ekspresyonunun transkripsiyonel kontrolü yoluyla oluşabildiği düşünülmektedir. mTORC1 aktivitesinin BMAL1'e bağımlı regülasyonu özerk hücreler seviyesinde gerçekleşir; BMAL1 eksikliği olan hücrelerde, mTORC1 sinyalinin ve hücre proliferasyonunun arttığı gösterilmiştir. mTORC1'in düzenlenmesinin BMAL1'in saatten bağımsız bir işlevi olduğu düşünülmektedir¹⁴⁸. Artan mTORC1 aktivitesi, Bmal1 eksikliği olan farelerde erken yaşlanma fenotipine katkıda bulunur ve mTORC1 aktivitesinin rapamisin ile farmakolojik olarak baskılanması, bu farelerin ömrünü arttırır. Bu verilerle uyumlu olarak kardiyomiyosit spesifik Clock veya Bmal1 bozulması, mTORC1 sinyalinin aktivasyonunun artmasına neden olur¹⁴⁹. BMAL1 ayrıca, RICTOR ifadesinin kontrolü yoluyla mTORC2-protein kinaz B (AKT) yolunu da düzenler¹⁵⁰.

BMAL1 ve mTORC1 yolu arasındaki bir başka önemli bağlantı Lipton ve ark. tarafından bildirilmiştir¹⁵¹. BMAL1'in, kapak bağlayıcı kompleksi - ökaryotik translasyon başlatma (eIF) ve uzama faktörleri (eEF) ve poliadenilat bağlayıcı protein

1 (PABP1) bileşenleri ile kompleks oluşturduğu gösterilmiştir¹⁵¹. Kompleks, 7-metil guanozine (m7-GTP) bağlanır ve çoğu mRNA'nın 5' ucunda "kapak" benzeri bir yapı oluşturur. Bu kapak bağlayıcı kompleksler, fare karaciğerinde ve beyinde bulunmuştur. S6K1, Ser42 bölgesinden BMAL1'i fosforile eder ve bu fosforilasyon, BMAL1'in başlığa bağımlı translasyonda yer alan faktörlerle birleşmesi için gereklidir. S6K1, mTORC1 hedeflerinden biridir, bu nedenle BMAL1, mTOR'a bağımlı bir şekilde "kapak"-bağımlı translasyonu düzenler¹⁵¹. BMAL1 transkripsiyonel bir faktör iken, translasyonu düzenleme kabiliyeti transkripsiyonel aktivitesinden bağımsızdır¹⁴⁶.

mTorC2/Rictor'un periferik ve merkezi saat gen ekspresyonunun düzenlenmesindeki rolü de araştırılmıştır. Karaciğerde azalmış mTorC2'ye sahip fareler (Rictor eksikliği nedeniyle), karaciğerdeki çekirdek sirkadiyan saat genlerinin ekspresyonunda önemli bir fark göstermemiştir. Vücut sıcaklığı ve lokomotor aktivitedeki ritimler de bu farelerde etkilenmemiştir¹⁵². Öte yandan, Rictor'un adipositlerde geni silinmiş olan farelerde, adipositlerde birkaç çekirdek saat geninin ifadesini bozulmuştur. Ayrıca kan basıncı ve lokomotor aktivite ritimleri bu farelerde değişmiştir¹⁵³.

Yeni bir çalışmada, PER2'nin, sitozolde mTORC1'i inhibe ettiği göstermiştir. Wu ve ark.¹⁵⁴; PER2'nin, sitozolde mTORC1 kompleksinin ana bileşenleri olan mTOR düzenleyici ilişkili protein (RAPTOR) ve mTOR ile güçlü bir şekilde etkileşime girdiğini bulmuşlardır. Diğer analizler PER2'nin, RAPTOR, TSC1 ve mTOR'u birleştiren, mTORC1 kompleksinin aktivitesinin baskılayan bir iskele proteini olduğunu ortaya koymuştur. Daha sonra Wu ve ark., PER2'nin protein sentezi için gerekli olduğunu ve otofajinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermek için Per2^{-/-} fareleri kullanmışlardır. Aç kalmanın fare karaciğerinde PER2 seviyelerinde önemli bir artışa yol açtığını, buna mTORC1'in inhibisyonunun eşlik ettiğini ve glukagon enjeksiyonunun bu etkileri taklit ettiğini saptamışlardır. Glukagon enjekte edilen Per2^{-/-} farelerde ise, hepatik mTORC1 aktivitesinin baskılanması ortadan kaldırılmıştır. Bu bulgular, glukagonun mTORC1 üzerindeki inhibitör etkileri için PER2'nin gerekli olduğunu göstermektedir^{154,155}.

Okazaki ve ark., fare renal karsinoma (RenCa) tümörlü farelerde everolimusun uygulama zamanına bağlı olarak antitümör etkinin iyileştirilip iyileştirilemeyeceğini araştırmışlardır. Bu çalışmada aktif fosforile mTOR ve total mTOR proteininin (ama

mRNA'sının değil) 24 saatlik ritim sergilediği saptanmıştır. mRNA'da gözlenmeyen ancak proteinde oluşan ritmin ubiquitinasyon faktörü olan Fbxw7 (F-box with 7 tandem WD40) aracılığıyla olduğu saptanmıştır. mTOR inhibitörü everolimusun mTOR'un yüksek olduğu periyotlar boyunca uygulanması, tümör taşıyan farelerde sağkalımı arttırmıştır. mTOR hem RenCa kanser hücrelerinde hem de fare karaciğerinde gece, yani farelerin aktif periyodunda daha yüksektir. Saat 19:00'da uygulanan (aktif periyot) everolimus ile sağ kalımın yükseldiği saptanmıştır. Bu çalışmada everolimus i.v. yoldan iki farklı zamanda (7:00 ve 19:00) uygulanarak kan düzeyi tayin edilmiştir, kan düzeyinde farklılık gözlenmemiştir¹³.

Zhang ve ark., everolimusun etkinliğinin, ER+ meme kanseri hücre dizisi MCF-7'de uygulama zamanlamasına göre değişip değişmediğini araştırmıştır. Serum şokunun ardından MCF-7 hücrelerinde 24 saatlik mTOR ritmi gözlenmiştir ancak sirkadiyan saat genlerinin osilasyonları bozulmuştur. Everolimusun farklı zamanda uygulanması serum şoku ile senkronize edilmiş MCF-7 hücrelerinde G0/G1 faz blokajında farklı etkinlik göstermiştir. Serum şok senkronizasyonunun, MCF-7 hücrelerinde G1 progresyon proteinlerinin sentezini veya fosforilasyonunu ritmik olarak düzenleyerek mTOR aktivitesinde sirkadiyan ritmi indüklediğini, bunun sonucu olarak da farklı zamanlarda uygulanan everolimusun G1 blokaj etkinliğinin değiştiği gösterilmiştir^{156,157}.

Çalışma grubumuzca yapılan telemetri çalışmasında, everolimus ZT1, ZT7, ZT13 ve ZT19 olmak üzere dört farklı sirkadiyan zamanda C57BL/6J erkek ve dişi farelere iki farklı dozda (erkek farelere 5 - 10 mg/kg/gün; dişi farelere 15 - 20 mg/kg/gün) oral yoldan 14 gün boyunca (subakut) uygulanmış, ilacın sağlıklı hayvanların dinlenme-aktivite (lokomotor aktivite) ve vücut sıcaklığı ritimleri üzerine etkisi *in vivo* gerçek zamanlı olarak incelenmiş, genel toksisite göstergesi olarak ilaca bağlı kilo kayıplarına ve klinik gözlemlere bakılarak ilacın en iyi (ZT13) ve en kötü (ZT1) tolere edildiği sirkadiyan zaman belirlenmiştir. Aynı çalışmada, erkek farelerin (5 mg/kg) ve dişi farelerin (15 mg/kg) tolere edebildikleri dozun farklı olduğu bulunmuştur²⁰. Bu çalışmaların akabinde ZT1 ve ZT13 sirkadiyan zamanlarında dişi (15 mg/kg) ve erkek (5 mg/kg) farelere everolimus uygulanmış ve ilaç uygulama zamanına bağlı olarak everolimusun kronotoksitesi yine farelerde incelenmiştir. 28 gün uygulama sonucunda mortalite erkekte %6 (1/16) ve dişide %0 (ölüm yok) olarak saptanmıştır. Vücut ağırlığı ve organ ağırlıkları değişimleri, immünolojik ve hematolojik parametreler incelenmiştir. Her iki cinsiyette de (ancak özellikle erkeklerde) ZT1

zamanında kontrolüne göre ağırlık kayıpları daha fazla olmuştur. Dişi ve özellikle erkek farelerde ZT1 zamanında ZT13'e göre daha fazla toksisite gözlenmiştir. Hem dişi hem de erkek farede timus ağırlığında azalma ve timik medüller atrofi ZT1 zamanına göre ZT13'te daha düşük bulunmuştur. Everolimus uygulamasından sonra erkek farelerde; toplam lökosit, toplam lenfosit, yardımcı T hücreleri ve B lenfosit sayılarında, ZT13'te önemli olmayan değişiklikler gözlenirken ZT1'de sırasıyla %56.9 ($p<0.01$), %45.5 ($p<0.01$), %43.1 ($p<0.05$) ve %48.7 ($p<0.01$) azalma gözlenmiştir. Bu çalışma ile everolimusun kronoterapisinin tolerabiliteyi artırabileceği ve immün sistem toksisitesini azaltabileceği gösterilmiştir¹⁵⁸.

Everolimusun sirkadiyan farmakokinetiğini incelemek amacıyla, günde iki defa everolimus alan kalp nakli hastaları ile çalışılmıştır. 28 hastadan aktif (09:00 - 21:00) ve dinlenme dönemlerinde (21:00 - 09:00) 0, 1, 2, 4, 6, 8 ve 12 saatlerinde kan örnekleri alınmıştır. AUC_{0-4sa} , C_{maks} , $C_{maks/min}$ konsantrasyonu ve pik-dip dalgalanması dinlenme periyodunda aktif periyoda göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Yarılanma ömrü, dinlenme döneminde aktif süreye göre anlamlı derecede uzundur. AUC_{0-12sa} ise benzer bulunmuştur. Everolimusun farmakokinetiği dinlenme döneminde gecikmiş absorpsiyon ve metabolik aktivitede azalma gibi sirkadiyan değişiklikler gösterse de; bu değişiklikler AUC_{0-12sa} 'i etkilememiştir¹⁵⁹.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar

Everolimus	ApexBio Technology, ABD
Repaglinid	Prof. Dr. Durişehvar Ünal tarafından çalışmamızda kullanılmak üzere hediye edilmiştir.
Takrolimus	Prof. Dr. Durişehvar Ünal tarafından çalışmamızda kullanılmak üzere hediye edilmiştir.
Siklosporin	Prof. Dr. Durişehvar Ünal tarafından çalışmamızda kullanılmak üzere hediye edilmiştir.
Darifenasin	Prof. Dr. Durişehvar Ünal tarafından çalışmamızda kullanılmak üzere hediye edilmiştir.
Metanol (HPLC grade)	Merck, Almanya
Asetonitril (HPLC grade)	Merck, Almanya
Amonyum asetat	Merck, Almanya
Orto-fosforik asit	Merck, Almanya
Çinko sülfat hepta hidrat	Merck, Almanya
Distile su (HPLC grade)	Human Power I Scholor UV, JJS, ABD
Serum fizyolojik	Eczacıbaşı Baxter, Türkiye
(İzotonik sodyum klorür solüsyonu %0,9)	
Propilen glikol	Tekkim, Türkiye
İzofluran	Adeka, Türkiye
(İsoflurane USP, inhalasyon için solüsyon 100 ml)	
NucleoSpin RNA kiti	Macherey Nagel, Almanya
ProtoScript II First Strand cDNA Sentez Kiti	New England Biolabs, ABD
Sensifast SYBR No-Rox Kit	Bioline, ABD
Agaroz	Research Products International, ABD

Boyalı DNA marker	Invitrogen, ABD
RIPA hücre parçalama tamponu	Santa Cruz, ABD
Laemmli örnek hazırlama tampon	Biorad, ABD
Betamerkaptoetanol	Merck, Almanya
Proteaz inhibitör karışımı	CST, ABD
%10'luk TGX Stain-Free Fast Cast	Biorad, ABD
PVDF 0,45 µm membran	Millipore, ABD
Yağsız süt tozu	Applichem, Almanya
Sodyum dodesil sülfat	Merck, Almanya
Tris HCl	Sigma, ABD
Sodyum Klorür	Merck, Almanya
Glisin	Affymetrix, ABD
Tween 20	Affymetrix, ABD
Hidroklorik asit	Merck, Almanya
Boyalı protein marker	GangNam-Stain, Kore
Coomassie Brilliant Blue G-250	Sigma, ABD
APS	Alfa Aesar, ABD
TEMED	Alfa Aesar, ABD
Akrilamid	Affymetrix, ABD
Bisakrilamid	Affymetrix, ABD
İzopropanol	Merck, Almanya
Anti-P-gp antikoru	Millipore, ABD
Anti-Lamin B1 antikoru	CTS, ABD
Anti-mouse IgG antikoru	CTS, ABD
Anti-rabbit IgG antikoru	CTS, ABD
ECL substratı (Lumiglo)	CTS, ABD

3.1.2. Ekipman ve cihazlar

LC 20 Ayırma Modülü	Shimadzu, Japonya
LC-20AT pompa	Shimadzu, Japonya
SIL AT-HT otoörnekleyici	Shimadzu, Japonya
SPD-20A UV/VIS Dedektör	Shimadzu, Japonya
Luna C8 kolon; 5 µm, 150 ×4.6 mm	Phenomenex, ABD
C8 ön kolon kartuşu; 4x 3 mm (id)	Phenomenex, ABD
Oasis HLB kartuş (1cc/30 mg)	Waters, ABD
Vakum Pompası	KNF (Almanya)
Ekstraksiyon tablası	Varian (ABD)
Vorteks	Benchmark, USA
Otomatik pipetler	Thermo, ABD
108 dijital termometre	Testo, Almanya
Rektal termometre probu (fare)	Harvard Apparatus, ABD
Paslanmaz çelik gavaj	Fine Science Tools, ABD
CFX Connect™ RT PZR Sistemi	Biorad, ABD
NanoDrop 8000 Spektrofotometre	Thermo, ABD
Yatay Elektroforez Sistemi	Biorad, ABD
Qubit 2.0 Fluorometre	Thermo, ABD
Dikey Elektroforez	Biorad, ABD
Jel Transfer Aparatı	Biorad, ABD
Elektroforez Güç Kaynağı	Biorad, ABD
Chemidoc Jel Görüntüleme Cihazı	Biorad, ABD
Ultrasonik Homojenizatör	Sonopuls HD 2200, Almanya
Cerrahi aletler	Bahadır A.Ş., Samsun-Türkiye
Santrifüj	Hermle Z326K, Almanya

Santrifüj	Nüve NF800, Türkiye
Mekanik Homojenizatör	Art-Miccra-D1, Almanya
Buzdolabı (+4 °C)	Arçelik, Türkiye
Buzdolabı (-20 °C)	Arçelik, Türkiye
Derin dondurucu (-80 °C)	Esco, Singapur

3.1.3. İstatistiksel Programlar

Graphpad Prism 8.00	GraphPad Software, ABD
IBM SPSS Statistics 22	IBM, ABD

3.2. Analitik Metod Geliştirilmesi ve Validasyonu

Everolimusun biyolojik materyalden tayini için yeni bir analitik tayin metodu geliştirilmiştir. Bu metotta, mobil faz bileşimi ve pH'sı, kullanılan kolon, ekstraksiyon metodu ve internal standart, literatürdeki analitik metotlara göre yenilik arz etmektedir.

3.2.1. Stok ve Çalışma Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

10 mg everolimus 10 ml metanol ile çözülerek 1000 µg/ml konsantrasyonunda stok everolimus çözeltisi hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 50, 20, 10, 5, 2, 1 µl/ml konsantrasyonunda çalışma çözeltileri elde edilmiş ve 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1 µl/ml plazma ve karaciğer standartları elde etmek için sırası ile 20 µl boş plazma veya karaciğere eklenmiştir (toplam plazma ve karaciğer homojenat hacmi 200 µl).

3.2.2. Mobil Fazın Optimizasyonu

Optimizasyona farklı oranlarda asetonitril:su kullanılarak başlanmıştır. En iyi 60:40 (v/v) oranında asetonitril:distile su karışımından sonuç alınmıştır. Everolimus ve internal standart (İS) piklerinin düzgün çıkmaması nedeniyle pH ayarı yapabilmek amacıyla distile su yerine amonyum asetat tamponu (10 µM) kullanılmıştır. pH, orto-fosforik asit ile ayarlanmıştır. 3,5-6 arasında denemeler yapılarak optimum pH değeri 4 olarak bulunmuştur.

3.2.3. Internal Standartın Seçimi

Everolimusun yapısına yakın maddeler denenmiştir. Bunlar; takrolimus, siklosporin, darifenasin ve son olarak repagliniddir. Kullanılan internal standartların bazıları kullanılan analitik metod ile hiç dedekte edilemezken, bazı internal standartların

kromatogramları istenen kalitede olmamış ve madde pikleri simetrik çıkmamıştır. En iyi sonuç repaglinid ile alınmış ve deneylere rapaglinid ile devam edilmiştir.

3.2.4. Ekstraksiyon Metodunun Optimizasyonu

Tek başına katı faz ekstraksiyon ve tek başına sıvı-sıvı ekstraksiyon denenmiştir. Ancak örnek kirliliği nedeniyle kombine bir metot denenmiş ve bu şekilde optimizasyon sağlanmıştır. Farklı protein çöktürme işlemleri uygulanmıştır. 0,25 M çinko sülfat (1:9 su:metanolde, v/v) uygulanmış ve sonuç olarak bu çöktürme metodu seçilmiştir. Çöktürme işlemi ile metanol fazına geçen everolimus ve İS, HLB tipi (hydrophilic-lipophilic balance) Oasis (Waters, ABD) kartuşlardan geçirilerek, metanol ile elüe edilmiştir. Bu şekilde proteinden ve diğer kirliliklerden arındırılmış berrak çözelti numunesi kolona verilecek duruma gelmiştir. Kromatografik koşullar Tablo 8’de sunulmuştur.

Tablo 8: Plazma ve karaciğerden everolimus tayini için geliştirilen HPLC metodunda kullanılan cihazlar, çalışmaya ait kromatografik koşullar ve çalışmada kullanılan materyaller.

Parametreler	Kromatografik Koşullar
Mobil faz	Asetonitril: 0,01 M Amonyum asetat tamponu (60:40, v:v) pH:4
Akış hızı	1 ml/dak (plazma) ve 0,6 ml/dak (karaciğer)
Numune örnekleyici sıcaklığı	Oda sıcaklığı
Kolon sıcaklığı	50 °C
Dalga boyu	278 nm
Ekstraksiyon metodu	0,25 M çinko sülfat ile çöktürme + katı faz ekstraksiyon
İnternal standart	5 µg/ml (plazma) ve 10 µg/ml (karaciğer) Repaglinid
Enjeksiyon hacmi	40 µl

3.2.5. Metot Validasyonu

Doğrusallık, doğruluk, hassasiyet, özgüllük, deteksiyon limiti (LOD), kantifikasyon limiti (LOQ) ve sağlamlık değerleri hesaplanmıştır. Doğrusallık 5-0.1 µg/ml konsantrasyonda plazma ve karaciğer standartları hazırlanarak test edilmiştir. Bu konsantrasyonlarda altı tekrarlı çalışılarak sistem test edilmiştir. R2 değeri, regresyon denklemi ve bağıl standart sapma (%RSD) hesaplanmıştır.

Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik tekrarlı analizlerle test edilmiştir. 5, 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1 µl/ml konsantrasyonlarındaki everolimus kullanılarak günler arası tekrarlanabilirlik deneyi iki farklı günde; gün içi tekrarlanabilirlik ise aynı gün çalışılarak gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım, farklı zamanda çalışılan üç farklı konsantrasyonun standart eğriden % kaç oranında doğru saptandığının hesaplanması ile bulunmuştur. 5, 1, 0.5 µg/ml konsantrasyonlarda geri kazanım plazma ve karaciğer örnekleri çalışılmıştır. LOD ve LOQ, $LOD=3.3 \times \sigma/S$ ve $LOQ=10 \times \sigma/S$ denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır. σ , cevabın standart sapmasıdır ve S, kalibrasyon eğrisinin eğimidir.

3.3. Everolimusun Kronofarmakokinetiği (Tek Doz Uygulama)

3.3.1. Deney Hayvanları ve Senkronizasyon

Çalışmamızda 10-12 haftalık 13-21 g'lık dişi ve 16-26 g'lık erkek C57BL/6J soyu fareler kullanılmıştır. C57BL/6J fareler, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Biriminden temin edilmiş ve İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanı Bakım ve Barındırma Ünitesinde (EDEHAB) barındırılmış ve deneyler gerçekleştirilmiştir. Fareler 4-5 tanesi bir arada olmak üzere uygun büyüklükteki polikarbonat kafeslerde, standart sıcaklık ($22 \pm 2^\circ C$), aydınlatma (12 saat aydınlık/12 saat karanlık) ve uygun nem koşullarında (55 ± 2) barındırılmıştır. Deneylerden önce hayvanlara su ve yem kısıtlaması uygulanmamıştır. Deney günleri ise sadece açlık çalışmasındaki hayvanlara yem kısıtlaması uygulanmış ancak su kısıtlaması yapılmamıştır. Işık, floresan lambalar ile sağlanmış her bir kafes düzeyindeki ışık şiddeti 100-150 lüks olacak şekilde ayarlanmıştır. Karanlıkta uygulanacak işlemler, loş kırmızı ışık (7 lüks) altında gerçekleştirilmiştir.

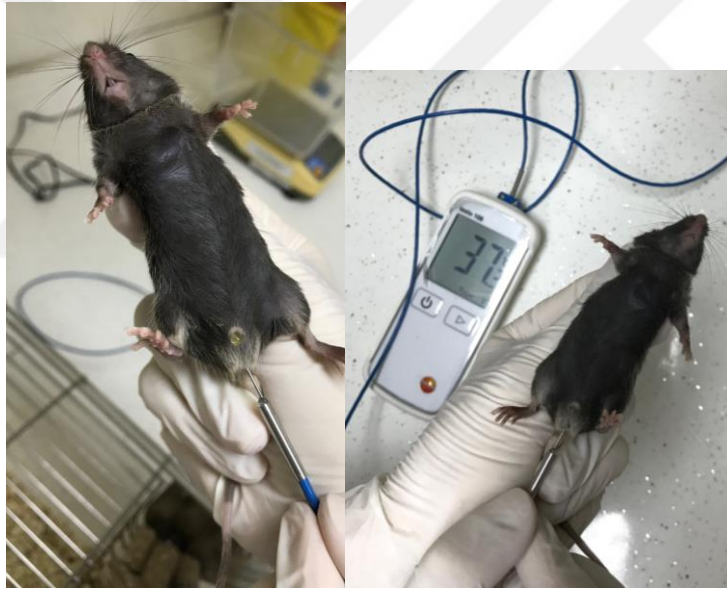
ZT13'te (ışığın verilmesini takip eden 13. saat veya karanlık başlangıcından 1 saat sonraki zaman) ilaç uygulanacak farelerin yeni ışık düzenine adaptasyonlarının sağlanması için 3 haftalık senkronizasyon süresi gerekmektedir. Hayvanların deney boyunca aynı senkronizasyon şemasına uyularak ışık alması sağlanmıştır. Senkronizasyon, hayvanların sirkadiyan saatlerini, ilaç uygulama zamanına göre (ZT1; ışık başlangıcından 1 saat sonraki zaman ve ZT13; ışık başlangıcından 12 saat veya karanlık başlangıcından 1 saat sonraki zaman) senkronize etmek amacıyla gerçekleştirilir.

Işık düzeni:

ZT1 grubu fareler için: 07:00 – 19:00 aydınlık ve 19:00 – 07:00 karanlık

ZT13 grubu fareler için: 07:00 – 19:00 karanlık ve 19:00 – 07:00 aydınlık

Senkronizasyon deney gününden önce 1 gün boyunca günde 4 defa (7:00, 13:00, 19:00 ve 01:00 saatlerinde) rektal yoldan sıcaklık ölçümü (Testo 108 Termometre, Harvard Apparatus) yapılarak kontrol edilmiştir (Şekil 5). Vücut sıcaklığının karanlık (aktivite) – aydınlık (dinlenme) periyotlarındaki değişimi belirlenmiştir. Vücut sıcaklıklarının zamana bağlı değişimi tek-yönlü ANOVA ve Fourier analizleri ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Fourier analizi ile günün değişik zamanlarında yapılan ölçümler analiz edilerek, değişimin ritmik olup-olmadığı değerlendirilmiştir. Bu analizler sırası ile Graphpad Prism versiyon 8.00 (ABD) ve IBM SPSS Statistics v.22 (ABD) programları ile yapılmıştır.



Şekil 5: Dijital termometre ve rektal yoldan sıcaklık ölçmek için prob ile farede sıcaklık ölçümü.

3.3.2. Deney Grupları, İlaç Uygulaması ve Deneysel Çalışmalar

Ayrıntılı deney grupları Tablo 9’da sunulmuştur. Everolimus, erkek ve dişi farelere 5 mg/kg dozda ve ağız yolundan (gavaj ile) uygulanmıştır. Everolimus, propilen glikol: distile su (50:50, v/v) içinde çözündürülmüştür. Everolimusun her bir deney hayvanına 5 mg/kg dozda açlık ve tokluk (*ad libitum*) koşullarında oral yoldan gavaj ile uygulanması sonrasında; 0.5, 1, 2, 4, 12 ve 24. saatlerde kalpten kan alınarak fareler feda edilmiş; karaciğer, ileum, timus ve testis dokuları çıkarılmıştır. EDTA’lı tüplere alınan total kan 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edilerek plazmasına ayrıldı. Dokular ve

plazma analiz gününe kadar -80 °C’de saklanmıştır. Dokular tartıldıktan sonra 1:1 oranında serum fizyolojik eklenerek mekanik homojenizatör (Art-Miccra-D1, Almanya) ile homojenize edilmiş ve homojenat -20 °C’de saklanmıştır. Plazma ve doku homojenatları valide edilmiş HPLC-UV yöntemi ile tayin edilmiş ve farmakokinetik hesaplamalar yapılmıştır.

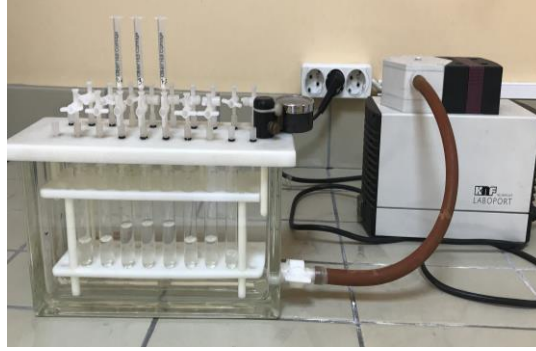
Tablo 9: Deney grupları ve kullanılan deney hayvanı sayısı.

Deney Grupları	Kısaltma	Hayvan Adedi*
ZT1/erkek/ <i>ad libitum</i>	1M <i>ad</i>	5*6=30
ZT13/erkek/ <i>ad libitum</i>	13M <i>ad</i>	5*6=30
ZT1/dişi/ <i>ad libitum</i>	1F <i>ad</i>	5*6=30
ZT13/dişi/ <i>ad libitum</i>	13F <i>ad</i>	5*6=30
ZT1/erkek/açlık	1M açlık	5*6=30
ZT13/erkek/açlık	13M açlık	5*6=30
ZT1/dişi/açlık	1F açlık	5*6=30
ZT13/dişi/açlık	13F açlık	5*6=30
Toplam Hayvan Sayısı		240

*n=5 ve 6 zaman noktası (0.5, 1, 2, 4, 12 ve 24. saatler)

3.3.3. Plazma ve Karaciğer Örneklerinin Analizi

200 µl plazma veya karaciğer örneği 1,5 ml’lik deney tüpüne alınmıştır. 20 µl IS örneklerine eklenmiş ve 20 sn vortekslenmiştir. Plazma ve karaciğer için sırası ile 400 µl ve 500 µl 0,25 M çinko sülfat (1:9su:metanol: v/v) eklenmiştir. Sırası ile 1 dk ve 4 dk vortekslenildikten sonra 4000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz, plazma ve karaciğer için sırası ile 400 µl ve 500 µl distile su bulunan temiz bir deney tüpüne alınmıştır. Oasis HLB kartuşlar sırası ile 1 ml metanol ve 1 ml distile su ile vakum manifold yardımı ile şartlandıktan sonra, santrifüj sonrası elde edilen örnek kartuşdan geçirilmiştir. Karaciğer örneklerinde, bu aşamadan sonra 500 µl distile su geçirilerek kartuş yıkanmıştır. Vakum manifolduna temiz tüp yerleştirilerek örnekler 250 µl metanol ile elüe edilmiştir (Şekil 6). Elüe edilen örnek mikroinsert içeren viallere alınarak 40 µl olarak kolona enjekte edilmiştir.



Şekil 6: Oasis HLB kartuşları, ekstraksiyon tablası ve vakum manifold cihazı. Vakum manifold sağ taraftadır ve eksi 0,4 Bar'lık bir basınç sağlayarak sıvı geçişini temin eder. Sol tarafta cam ekstraksiyon tablası ve üzerinde HLB tipi ekstraksiyon kartuşları görülmektedir.

3.3.4. İleum, Timus ve Testis Örneklerinin Analizi

İleum, timus ve testis örnekleri boyutları küçük olması sebebi ile karaciğer gibi analiz edilmemiştir. Doku örneklerinin tamamı kullanılmıştır. Doku örneklerini içeren deney tüpüne 100 µl IS eklenmiş ve 1 dk boyunca vortekslenmiştir. Bu karışıma 100 µl 0,25 M çinko sülfat (1:9su:metanol: v/v) eklenmiştir. Kısa vorteksten sonra ultrasonik homojenizatör (Sonopuls, Almanya) ile doku parçalanmıştır. Homojenizasyondan sonra örnek 1 dk daha vortekslenmiş, ardından 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Proteinlerin çöktürülmesinden sonra süpernatant temiz bir deney tüpüne alınmış ve 0,45 µm naylon filtrelerden süzülerek, mikroinsert içeren viallere alınmış ve 40 µl olarak kolona enjekte edilmiştir.

3.3.5. Farmakokinetik Parametrelerin Hesaplanması ve İstatistiksel Değerlendirme

Plazma ve karaciğer standart kromatogramlardan elde edilen pik alanları kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisinden standartlara ait $y=ax+b$ denklemleri elde edilmiştir. Plazma örneklerinden elde edilen kromatogramlardan integre edilen pik alanları, plazma $y=ax+b$ denklemine yerleştirilerek konsantrasyonları hesaplanmıştır. Karaciğer örneklerinden elde edilen kromatogramlardan integre edilen pik alanları ise, karaciğer $y=ax+b$ denklemine yerleştirilerek konsantrasyonlar hesaplanmıştır. İleum, timus ve testis örnekleri, plazma $y=ax+b$ denklemi kullanılarak hesaplanmıştır. Everolimusun 0-24 saat için tüm plazma ve dokulara ait konsantrasyonu-zaman eğrisi, Microsoft Excel ve Graphpad Prism versiyon 8.00 (ABD) programları kullanılarak elde edilmiştir. 0-24. saat arasında her zaman noktasındaki ortalama konsantrasyonlardan elde edilen plazma konsantrasyonu-zaman eğrisi kullanılarak, AUC_{0-24sa} lineer trapezoidal yöntemine (yamuklar yöntemi) göre hesaplanmıştır. C_{maks} ve t_{maks})

parametreleri plazma konsantrasyonu-zaman eğrisine bakılarak saptanmıştır. Eliminasyon hız sabiti (k_{el}), son dört zaman noktasının üssel grafiği çizilerek bulunmuştur. $t_{1/2}$, $0.693/k_{el}$ denklemi ile hesaplanmıştır. Klirens (Cl/F), Doz/AUC_{total} denklemi ile, Vd/F ise $(Cl/F)/k_{el}$ denklemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Gruplar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığı Graphpad Prism versiyon 8.00 programı ile Student t-test, tek yönlü, çift-yönlü ve üç-yönlü varyans analizlerini (ANOVA, Analysis of Variance) takiben Tukey veya Sidak post-hoc testler ile değerlendirilmiş ve $p < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.4. Zamana Bağlı Subakut Everolimus Uygulamasının P-Glikoprotein mRNA ve Protein Düzeylerine Etkisi ve Everolimus Kronofarmakokinetiği (Tekrarlı Doz Uygulama)

3.4.1. Deney Hayvanları ve Senkronizasyon

Çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi. 58 adet 20-30 g ağırlığında dişi ve erkek C57BL/6J soyu fareler kullanıldı. Fareler standart ısı ($22 \pm 2^\circ C$), aydınlatma (12 saat aydınlık/12 saat karanlık) ve nem koşullarında barındırıldı. Karanlıkta yapılan işlemler, loş kırmızı ışık (7 lüks) altında yapıldı.

Işık düzeni:

ZT1 grubu fareler için: 07:00 – 19:00 aydınlık ve 19:00 – 07:00 karanlık

ZT13 grubu fareler için: 04:00 – 16:00 aydınlık ve 16:00 – 04:00 karanlık

3.4.2. Deney Grupları, İlaç Uygulaması ve Deneysel Çalışmalar

Deney grupları Tablo 10'da sunulmuştur:

Tablo 10: Deney grupları ve kullanılan deney hayvanı sayısı.

Deney Grupları	Kısaltma	Hayvan Adedi*
ZT1 erkek kontrol	1MC	7
ZT1 erkek everolimus	1ME	8
ZT13 erkek kontrol	13MC	7
ZT13 erkek everolimus	13ME	8
ZT1 dişi kontrol	1FC	7
ZT1 dişi everolimus	1FE	7
ZT1 dişi kontrol	13FC	7
ZT1 dişi everolimus	13FE	7

Everolimus *ad libitum* beslenen farelere 5 mg/kg dozda ve oral yoldan gavaj ile uygulandı. Everolimus propilen glikol:distile su (1:1, v/v) karışımı içerisinde çözündürüldü. Kontrol grubuna ilaç içermeyen propilen glikol:distile su (1:1, v/v) karışımı uygulandı. Everolimus 14 gün süre ile her gün bir gruba ZT1 ve diğer gruba ZT13 saatlerinde uygulandı. Klinik belirtiler, vücut ağırlığı değişiklikleri ve besin tüketimi her gün kontrol edildi ve değişimler kayıt altına alındı.

ZT1 grubu farelere her gün saat 08:00'de uygulama yapıldı.

ZT13 grubu farelere her gün saat 17:00'de uygulama yapıldı.

3.4.3. Farelerin Feda Edilmesi ve Dokuların Çıkarılması

14 günün sonunda (15. gün) fareler kalpten kan alınarak feda edildi. Total kandan 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek plazma ayrıldı ve -20 °C'de saklandı. Karaciğer üç parça halinde izole edildi ve ayrı ayrı tartılarak -80 °C'de saklandı. İleum çıkarılarak soğuk PBS ile yıkandı. Feçesten temizlenen ileum dokusunun içi açılarak mukoza sıyrıldı ve izole edilmiş mukoza -80 °C'de saklandı.

3.4.4. Plazmadan ve Dokulardan Everolimus Tayini ve Everolimus Konsantrasyonlarının Hesaplanması

14 gün everolimus uygulanan farelerde kararlı düzey everolimus tayini bölüm 3.3.3'te belirtilen şekilde yapılmıştır. Kısaca; 200 µl plazma 1,5 ml'lik deney tüpüne alınmıştır. 20 µl IS örneklere eklenmiş ve 20 sn vortekslenmiştir. 400 µl 0,25 M çinko sülfat (1:9su:metanol: v/v) eklenmiş, 1 dk vortekslenildikten sonra 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz, 400 µl distile su bulunan temiz bir deney tüpüne alınmıştır. Oasis HLB kartuşlardan geçirilmiştir. Vakum manifolduna temiz tüp yerleştirilerek örnekler 250 µl metanol ile elüe edilmiş, mikroinsert içeren viallere alınarak 40 µl olarak kolona enjekte edilmiştir. Kararlı durum konsantrasyonu (C_{ss}), bölüm 3.3.5'te belirtildiği gibi örneklerin kromatogramlarından integre edilen pik alanları, plazma $y=ax+b$ denkleminde yerleştirilerek hesaplanmıştır. AUC_{ss} değeri, C_{ss} 'nin doz aralığıyla (24 saat) çarpılması ile hesaplanmıştır.

3.4.5. mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

3.4.5.1. Karaciğer ve ileum dokularından RNA izolasyonu

-80 °C’de saklanan karaciğer dokuları çözünmesine izin verilmeden havan içerisinde sıvı azot ile parçalandı ve NucleoSpin RNA kiti (Macherey Nagel, Almanya) ile RNA izolasyonu yapıldı. Sıvı azot ile parçalanmış dokular boş eppendorf tüplere alınarak 350 µl hücre parçalama tamponu ve 3,5 µl betamerskaptoetanol eklendi ve 30 sn vorteks yapıldı. Karışım NucleoSpin (Macherey Nagel, Almanya) filterelere alındı ve 11.000 devirde 1 dk santrifüj edildi. Filtre atıldı, alta geçen kısım 350 µl %70 etanol ile karıştırıldı. NucleoSpin kartuşlarına yüklendi ve 11.000 devirde 30 sn santrifüj edildi. Kartuşun üzerine 350 µl membranı tuzdan arındıran tampon eklendi ve 11.000 g’de 1 dk santrifüj edildi. 10 µl sulandırılmış DNase ve 90 µl reaksiyon tamponu karıştırıldı. Filtrenin üzerine bu karışımdan 95 µl eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk inkübe edildi. Yıkama tamponu I’dan 200 µl eklendi ve 11.000 devirde 30 sn santrifüj edildi. Yıkama tamponu II’dan 600 µl eklendi ve 11.000 devirde 30 sn santrifüj edildi. Yıkama tamponu II’dan 250 µl eklendi ve 11.000 devirde 2 dk santrifüj edildi. 60 µl RNase içermeyen distile su eklenerek 11.000 devirde 1 dk santrifüj edildi. Tüpte toplanan çözelti total RNA’yı oluşturdu. Elde edilen RNA’nın miktarı ve saflığı NanoDrop 8000 (Thermo, ABD) spektrofotometre cihazıyla ölçüm yapılarak ng/ml olarak belirlendi.

3.4.5.2. Karaciğer ve ileum dokularından cDNA sentezi

İzole edilen total RNA’lardan komplementer DNA’larının (cDNA) sentezi için ProtoScript II First Strand cDNA Sentez Kiti (New England Biolabs, ABD) kullanıldı. cDNA sentezi için 1-6 µl total RNA kullanılarak cDNA reaksiyonu için Tablo 11’deki karışım hazırlandı.

Tablo 11: Hazırlanan cDNA reaksiyon karışımı

İçerik	Miktar
ProtoScript II Reaksiyon karışımı (2X)	10 µl
10X RT Random Primer	2µl
Ters Transkriptaz Enzim Karışımı	2 µl
ddH ₂ O	0-5 µl
RNA	1-6 µl
Toplam Hacim	20 µl

n=1 için gösterilmiştir.

Total RNA'ların üzerine hazırlanmış olan reaksiyon karışımı eklendikten sonra örnekler 25°C'de 5 dk, 42°C'de 60 dk, 85°C'de 5dk ve 4°C'de 5dk olacak şekilde programlanan thermal cyler PZR cihazına yerleştirildi. Reaksiyon süresinin sonunda elde edilen cDNA örnekleri gen ekspresyonlarını belirleme aşaması için yapılacak qRT-PZR işlemine geçilene kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.4.5.3. Karaciğer ve ileum dokularından Abcb1a ve Abcb1b mRNA ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

Elde edilen cDNA'lardan hedef genler Abcb1a ve Abcb1b mRNA seviyesindeki azalış veya artış oranları referans gen (36b4) ekspresyonu ile kıyaslanması sonrasında saptandı. Bunun için, Tablo 12'de gösterilen primerler Abcb1a, Abcb1b ve β -aktin genlerine özgül olarak tasarlanıp sentezletirildi. Bu genlere özgül liyofilize halde gelen primerler son konsantrasyonları 100 μ M olacak şekilde PZR saflığındaki su ile çözülerek ana stokları hazırlandı. Hazırlanan stoktan 1/10 dilüsyon yapılarak 10 μ M final konsantrasyonlardaki ara stoklar oluşturuldu. Tasarlanan primerlerin erime sıcaklıkları (Tm) gradient PZR yapılarak belirlendi.

Tablo 12: Primer dizileri ve erime sıcaklığı değerleri.

Gen	Primer Dizisi	Tm
Abcb1a	İleri: AAT GTT TCG TTA TGC AGG TTG GC	59 °C
	Geri: TGG CTC TTT TAT CGG CCT CAC	
Abcb1b	İleri: GAG ACA GGA TAT AAG CTG GTT CG	61 °C
	Geri: CGC CCC TTT AAC ACT AGA AGC A	
36b4	İleri: TGA GAT TCG GGA TAT GCT GTT GG	61 °C
	Geri: CGG GTC CTA GAC CAG TGT TCT	

Her bir örnek için 6 μ l distile su, 1 μ l ileri primer, 1 μ l geri primer, 10 μ l SensiFAST SYBR Mix (Bioline, ABD) eklenerek mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Hazırlanan PCR karışımı vortekslenerek her bir örnek için lightcycler kapiller tüplere 18 μ l olacak şekilde aktarıldı ve 2 μ l cDNA örnekleri eklendi. Termal döngü, 95°C'de 2 dk 1 siklus ön denatürasyonun ardından toplam 40 siklusk 95°C'de 5 sn denatürasyon, her primere özgü Tm'ye göre 10 sn bağlanma ve 72°C'de 20 sn sentez ile tamamlandı.

SYBR Green hidrolizine bağlı floresan artışı görülen inceleme örneklerinden elde edilen grafiklerdeki cycle of threshold (CT) verileri değerlendirildi. mRNA ekspresyon değerlerinin belirlenmesi için qRT-PZR deneylerinde kullanılan 58 örneğin

her biri ikili olarak çalışıldı ve elde edilen CT değerlerinin ortalaması alındı. Genlerin artış, azalış oranları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (hedef gen-referans gen) yöntemi kullanılarak hesaplandı. Yöntem formülü;

$$\Delta CT = CT(\text{hedef}) - CT(\text{referans})$$

$$\Delta\Delta CT = 2^{\Delta CT} = \text{Ürün miktarı oranı}$$

3.4.6. Protein ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi

3.4.6.1. Karaciğerden protein izolasyonu

-80 °C’de saklanan karaciğer dokuları çözünmesine izin verilmeden havan içerisinde sıvı azot ile parçalandı, çok ince toz haline getirildi. Hücreleri parçalayan tampon çözelti (RIPA, Santa Cruz, ABD) ve proteaz inhibitör kokteyl karışımı içerisinde en az bir gece -80 °C’de bekletildi. Sonikatör ile iyice parçalandıktan sonra soğutmalı santrifüjde +4 °C’de 30 dk 14000 rpm’de santrifüj edildi. Üst faz ayrı bir eppendorf tüpüne alındı ve -80 °C’de saklandı. Total protein konsantrasyonu Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo, ABD) cihazı ile ölçüldü.

3.4.6.2. İleumdan protein izolasyonu

-80 °C’de saklanan dokular Tris-HCl (0,01 M, pH 7.4) ve proteaz inhibitör kokteyl karışımı içerisine alındı, vorteks yapıldıktan sonra sonikatör ile iyice parçalandı. Bir gece -80 °C’de bekletildikten sonra soğutmalı santrifüjde +4 °C’de 40 dk 15000 rpm’de santrifüj edildi. Tekrar Tris-HCl eklenerek vorteks ve sonikasyon yapıldı. Aynı grup örnekler miktarı çoğaltmak için birleştirildi. Total protein konsantrasyonu Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo, ABD) cihazı ile ölçüldü.

3.4.6.3. Western Blotting İşlemi

Jel elektroforezinde kullanılan tampon çözeltiler Tablo 13’te belirtilmiştir.

Tablo 13: Jel elektroforezi için kullanılan tamponların içerik ve miktarları

Tampon	Hazırlanışı
4X Ayırıştırıcı Tampon	(1.5 M Tris/HCL pH: 8.8; %0.4 SDS) 18.2 g Tris/HCL + 0.4 g SDS distile su içerisinde çözülerek 100 ml’ ye tamamlanır.
4X Yığıcı Tampon	(0.5 M Tris/HCL pH: 6.8; %0.4 SDS) 6.1 g Tris/HCL + 0.4 g SDS distile su içerisinde çözülerek 100 ml’ ye tamamlanır.

10X Yürütme Tamponu	30 g Tris baz + 144 g Glisin + 10 g SDS + 4.5 ml konsantre HCl toplam hacim 1L olacak şekilde çözülür. Tampon çalışma esnasında distile suyla 1x konsantrasyonuna getirildi.
---------------------	---

Konsantrasyonları tayin edilen protein örnekleri 2X Laemmli tampon çözelti (Biorad, ABD) ile eşit miktarda karıştırılarak 95 °C’de 5 dk ısıtıcı blok içerisinde inkübe edildi ve sonrasında buza alındı. Proteinlerin ayrıştırılması için %10’luk TGX Stain-Free FastCast jellere (Biorad, ABD) ilk kuyusuna boyalı marker devamında protein örnekleri yüklenerek 120V’de 2 saat süreyle yürütüldü. Proteinlerin ayrıştığının belirlenmesinin ardından transfer aşamasına geçildi.

Transfer basamağı için gerekli tamponların hazırlanışları Tablo 14’te gösterilmiştir.

Tablo 14: Transfer aşaması için kullanılan tamponların içerik ve miktarları

Tampon	Hazırlanışı
Transfer Tamponu	40ml 5X Trans Blot Turbo Transfer tamponu + 40ml Metanol + 80ml distile su
20X TBS	48.8gr Tris Baz + 160gr NaCl + 800ml Distile su, pH 7.6’ya ayarlandıktan sonra tampon 1L’ye tamamlandı. +4°C’de muhafaza edildi.
1X TBST	50ml 20X TBS + 950ml distile su + %0,2 Tween-20

Jel elektroforez işlemi tamamlanmadan 15dk kadar önce 3 ayrı küvete sırasıyla metanol, distile su ve 1X transfer tamponu eklendi. Jelin büyüklüğüne göre kesilmiş 0.45µm gözenek büyüklüğü olan PVDF membrane (Millipore, ABD) 2dk arayla tamponlarda bekletilerek aktive edildi. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel filtre kurutma kağıtları ve membran arasına yerleştirilerek transfer için sandviç modeli oluşturuldu. Biorad soğuk transfer aparatına ile 100 mA’da 10 saatte proteinler jelden membrane transfer edildi. Transfer tamamlandıktan sonra membran spesifik olmayan reaksiyon odaklarının bloke edilmesi amacıyla 1X TBST ile hazırlanmış %5 yağsız süt tozu solüsyonu içinde 4°C’de bir gece bekletildi.

Primer ve sekonder antikorlar 1X TBST ile %5 yağsız süt tozu solüsyonu içinde P-gp 1:250, Lamin B1 1:4000, Anti-mouse IgG 1:2000 ve Anti-rabbit IgG 1:2000 olacak şekilde hazırlandı. Primer antikor inkübasyon +4°C’de bir gece uygulandı ve sonrasında membran 1X TBST ile 5 defa 5dk 80 devirde çalkalayıcı ile yıkandı. Ardından sekonder antikor inkübasyonu oda sıcaklığında 1 saat süreyle uygulandı ve

membran 1X TBST ile 5 defa 5dk 80 devirde çalkalayıcı ile yıkandı. Kemilüminesan görüntüleme için LumiGlo ECL kiti (CTS, ABD) içerisindeki substratlar 1:1 oranında karıştırılarak, asetat kağıdı üzerine alınan membrana eklendi. 1 dakika inkübe edildikten sonra membran büyüklüğünde kesilmiş asetat kağıdı ile membran hava kalmayacak şekilde kapatılarak Biorad Chemidoc Jel Görüntüleme Sistemi ile görüntüleme sağlandı. Western blotlama sonucunda elde edilen bantların derecelendirilmesi ImageJ programı ile belirlendi.

3.4.7. İstatistiksel Analiz

Gruplar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığı Graphpad Prism versiyon 8.00 programı ile Student t-test, tek yönlü, çift-yönlü ve üç-yönlü varyans analizlerini (ANOVA, Analysis of Variance) takiben Tukey veya Sidak post-hoc testler ile değerlendirilmiş ve $p<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Validasyon sonuçları

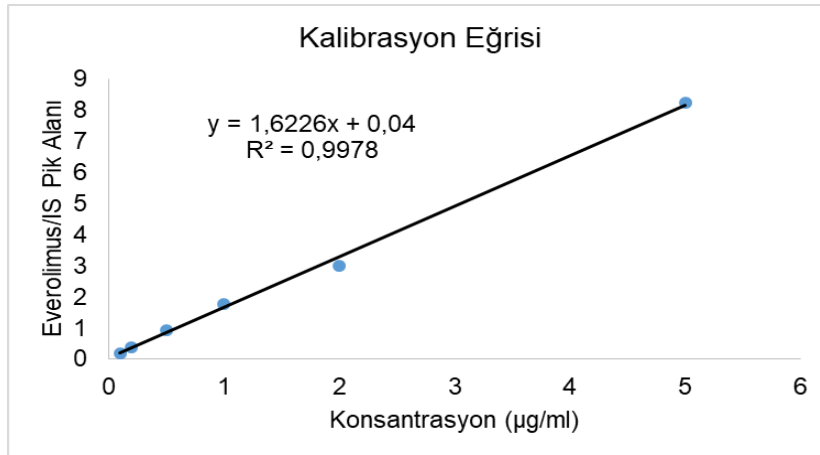
4.1.1. Plazma HPLC metodu validasyon sonuçları

Everolimusun plazmadan kantifikasyonu için kullanılan metodun validasyon sonuçları Tablo 15'te sunulmuştur. Everolimus plazmada 100 – 5000 ng/ml konsantrasyon aralığında doğrusal bulunmuştur. Plazma everolimus kalibrasyon eğrisi Şekil 7'de sunulmuştur. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerlerinin % varyasyon katsayısı (%CV) değerleri %10'dan düşük bulunmuştur. 5 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml konsantrasyonlar için geri kazanım değerleri %100'e çok yakındır.

Tablo 15: Plazmadan everolimus tayini için geliştirilen HPLC metodunun validasyon verileri.

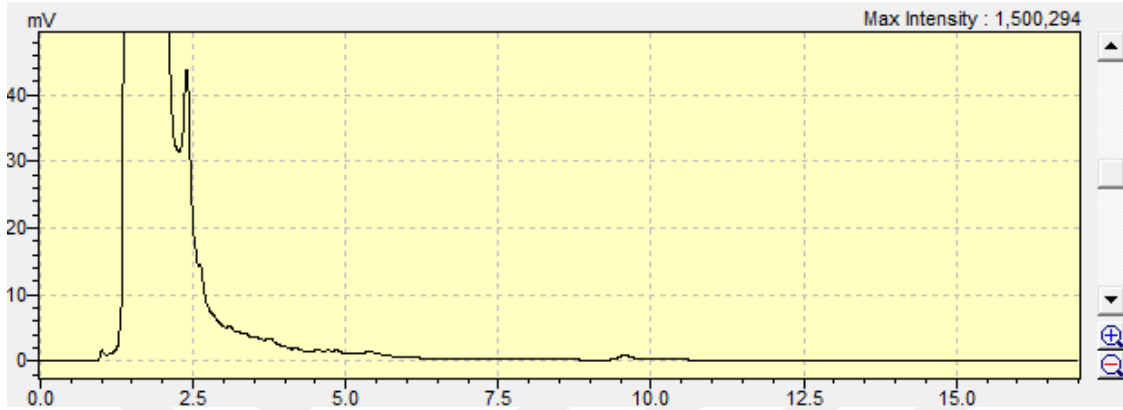
Parametreler	Kromatografik Koşullar
Doğrusallık aralığı (ng/ml)	100 – 5000
R ² değeri	0,9978
Regresyon denklemi	$y = 1,6226x + 0,04$
LOD (ng/ml)	2,49
LOQ (ng/ml)	7,55
Gün içi tekrarlanabilirlik (%CV) n=6	4,87
Günler arası tekrarlanabilirlik (%CV) n=6	3,97
Geri kazanım (5 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml)	%98.5, %98.3, %100.2
Alıkonma zamanı (dk; IS ve everolimus için sırayla)	5,6 ve 14,3

LOD: dedeksiyon limiti (limit of detection); LOQ: kantifikasyon limiti (limit of quantification); %CV: varyasyon katsayısı (coefficient of variation); IS: iç (internal) standart

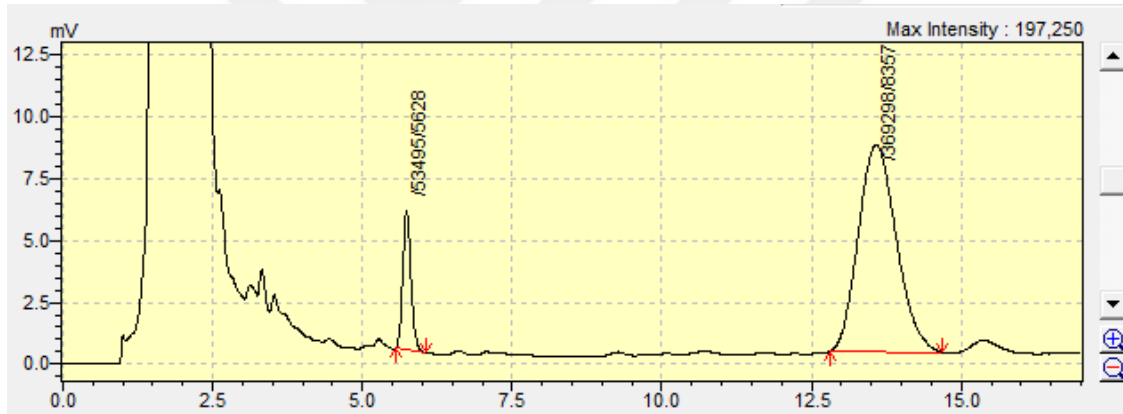


Şekil 7: Everolimus plazma standartlarının pik alanı-konsantrasyon kalibrasyon eğrisi.

Plazma validasyon verilerine göre, everolimusun plazmadan tayin metodunun tekrarlanabilir olduğu valide edilmiştir. Validasyon çalışmalarında kullanılan boş plazma ve everolimus ve IS eklenmiş plazma standartlarına ait örnek kromatogramlar Şekil 8 ve 9'da sunulmuştur.



Şekil 8: Fare boş plazma örneklerinin ekstraksiyonu ve HPLC sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram. Everolimusa ve internal standart rapaglinide ait pik gözlenmemiştir.



Şekil 9: Fare plazmasına spike edilen everolimus standardı (5 µg/ml) ve internal standart repaglinide (5 µg/ml) ait kromatogram. Alıkonma zamanı rapaglinid için 5,6 dakika ve everolimus için 14,3 dakika olarak saptanmıştır.

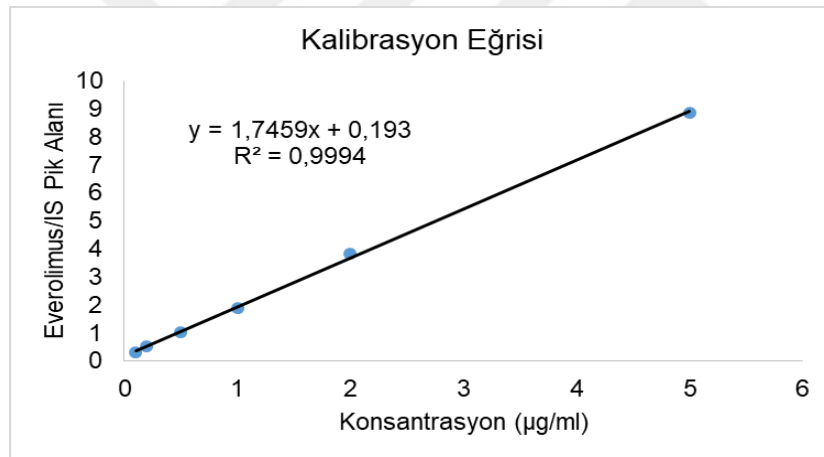
4.1.2. Karaciğerden HPLC metodu validasyon sonuçları

Everolimusun fare karaciğerinden kantifikasyonu için kullanılan metodun validasyon sonuçları Tablo 16'da sunulmuştur. Everolimus karaciğer homojenatında 100 – 5000 ng/ml konsantrasyon aralığında doğrusal bulunmuştur. Karaciğer everolimus kalibrasyon eğrisi Şekil 10'da sunulmuştur. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik değerlerinin %CV değerleri %10'dan düşük bulunmuştur. 5 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml konsantrasyonlar için geri kazanım değerleri %100'e çok yakındır.

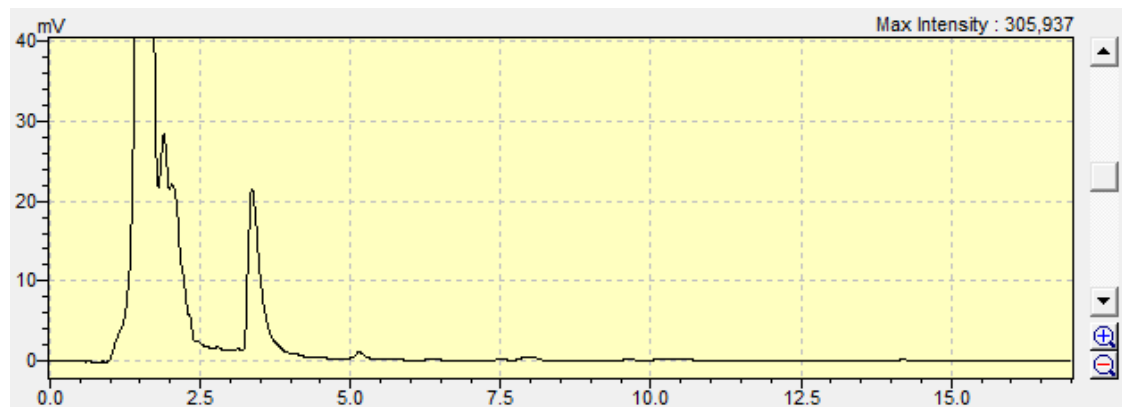
Tablo 16: Karaciğerden everolimus tayini için geliştirilen HPLC metodunun validasyon verileri.

Parametreler	Veriler
Doğrusallık aralığı (ng/ml)	100 – 5000
R ² değeri	0,9994
Regresyon denklemi	$y = 1,7459x + 0,193$
LOD (ng/ml)	7,01
LOQ (ng/ml)	21,26
Gün içi tekrarlanabilirlik (%RSD)	1,12
Günler arası tekrarlanabilirlik (%RSD)	4,40
Geri kazanım (5 µg/ml, 1 µg/ml, 0,5 µg/ml)	%99,39, %98,41, %96,26
Alıkonma zamanı (dakika olarak; IS ve everolimus için sırayla)	5,6 ve 14,3

LOD: dedeksiyon limiti (limit of detection); LOQ: kantifikasyon limiti (limit of quantification); %CV: varyasyon katsayısı (coefficient of variation); IS: iç (internal) standart

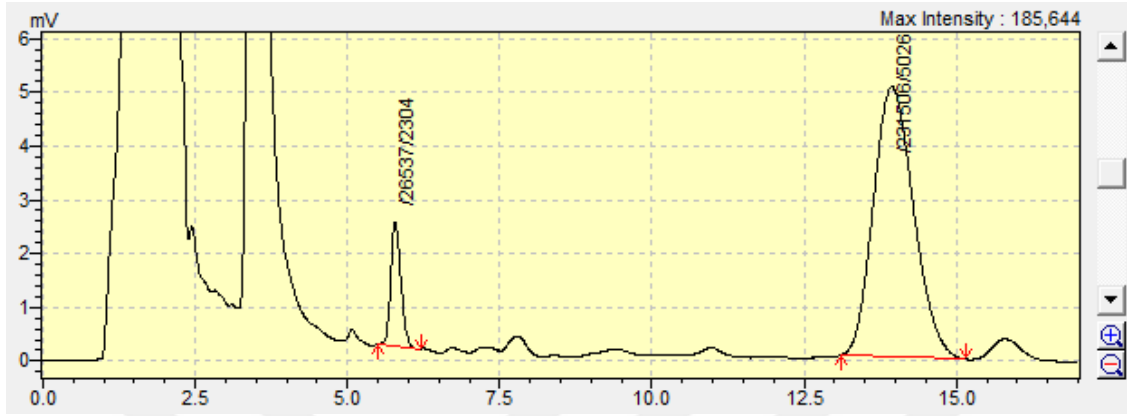


Şekil 10: Everolimus karaciğer standartlarının pik alanı-konsantrasyon kalibrasyon eğrisi.



Şekil 11: Boş karaciğer homojenatlarının ekstraksiyonu ve HPLC sistemine enjeksiyonu ile elde edilen kromatogram. Everolimusa ve internal standart rapeglinide ait pik gözlenmemiştir.

Karaciğer validasyon verilerine göre bu raporda sunulan everolimusun karaciğer numunelerinden tayin metodu tekrarlanabilir bulunmuştur. Validasyon çalışmalarında kullanılan boş karaciğer ve everolimus ve IS eklenmiş karaciğer homojenatı standartlarına ait örnek kromatogramlar Şekil 11 ve 12’de sunulmuştur.



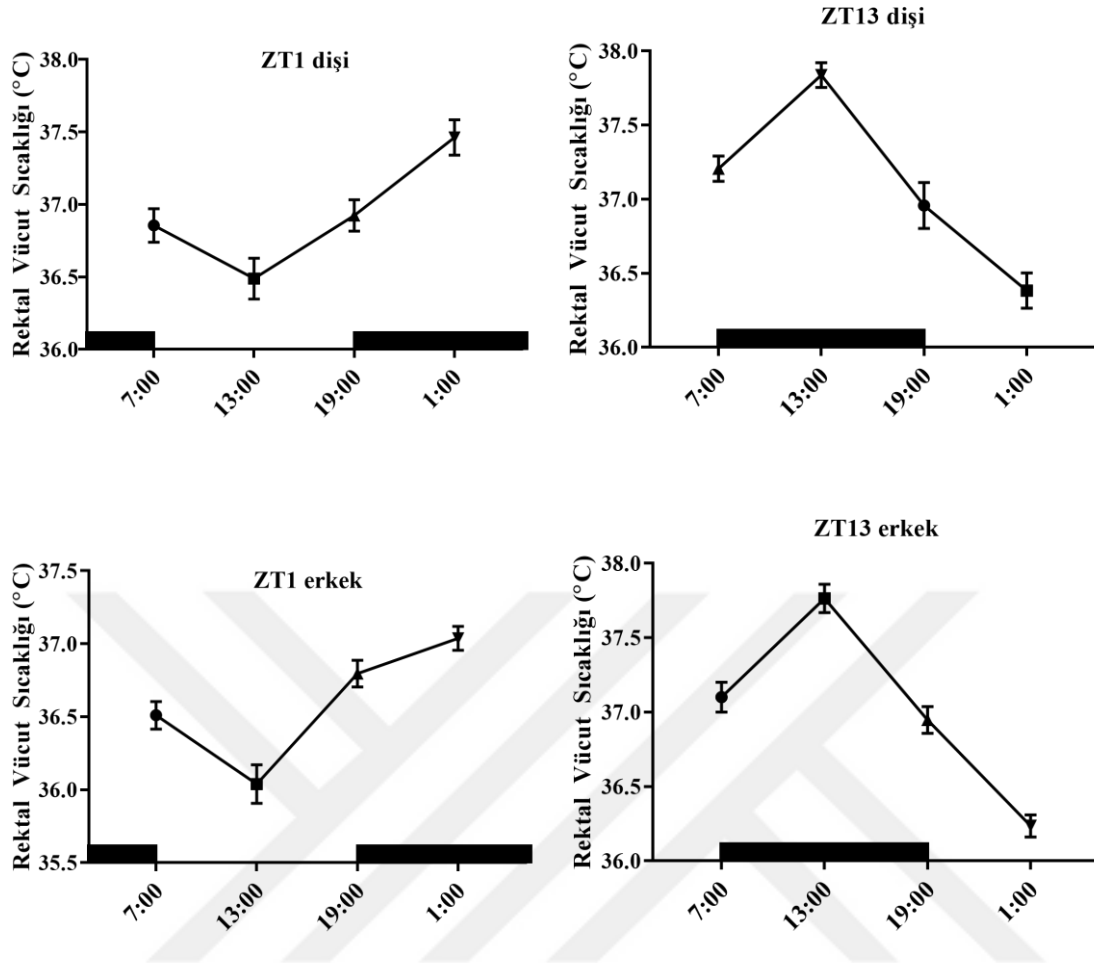
Şekil 12: Fare karaciğer homojenatına spike edilen everolimus standardı (5 µg/ml) ve internal standart repaglinide (5 µg/ml) ait kromatogram. Alıkonma zamanı rapaglinid için 5,6 dakika ve everolimus için 14,3 dakika olarak saptanmıştır.

4.2. Everolimusun Kronofarmakokinetiği (Tek Doz Uygulama)

Yapılan *in vivo* çalışmalarda kullanılan fare ağırlıkları erkeklerde $22,4 \pm 2,5$ g ve dişilerde $18,1 \pm 1,5$ g olarak belirlenmiştir. İlaç uygulanması sonrasında everolimusa bağlı herhangi bir advers etki gözlenmemiştir. Huzursuzluk, salya akması ve piloereksiyon gibi ağrı belirtileri ve everolimusa bağlı gelişebilecek bulantı, kusma, diyare gibi yan etkiler deneye alınan farelerde gözlenmemiştir. Bu çalışmamızda akut uygulama yapılmıştır ve deneylerde hiçbir fare kaybedilmemiştir.

4.2.1. Vücut Sıcaklığı Ölçümleri

Çalışmada sirkadiyan ritmin bir biyobelirteci olan vücut sıcaklığı ritimleri deneyden önceki bir gün günde 4 defa ölçülerek kayıt altına alınmıştır. Gece aktif (nokturnal) olan farelerin karanlık periyodunda, beklendiği gibi vücut sıcaklığının artış gösterdiği saptanmıştır. Erkek ve dişi farelere ait ZT1 ve ZT13 zamanında yapılan ölçümlerde vücut sıcaklıklarının aktivite yani karanlık periyodunda farelerin dinlenme periyoduna göre (gündüz) daha yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 13). Tüm gruplarda vücut sıcaklığı değişimi tek-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,0001$) ve Fourier analizi ile ritmik ($p < 0,0001$) bulunmuştur.



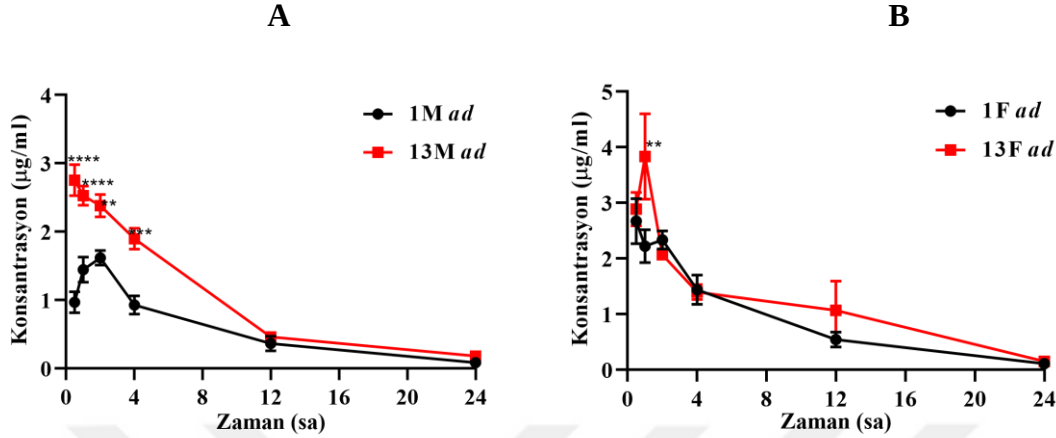
Şekil 13: Vücut sıcaklığının karanlık (aktivite) – aydınlık (dinlenme) periyotlarındaki değişimi.

4.2.2. Everolimusun Plazma Konsantrasyon Verileri ve Farmakokinetik Parametreleri

Everolimusun oral yoldan uygulanması sonrasında C_{maks} ve t_{maks} değerleri uygulama zamanı ve cinsiyete göre değişmektedir. Tüm deney gruplarında son numune toplama noktası olan 24. saatte everolimus konsantrasyonu plazmada saptanabilmiştir. Bu da son numune toplama noktasının doğru olarak seçildiğini göstermektedir. Plazma konsantrasyon-zaman grafikleri tüm gruplar için karşılaştırmalı olarak aşağıda sunulmuştur (Şekil 14-15).

ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen erkek farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma konsantrasyon-zaman grafikleri değerlendirildiğinde, 0,5. ($p < 0,0001$), 1. ($p < 0,0001$), 2. ($p < 0,01$) ve 4. ($p < 0,001$) saatlerde plazma everolimus konsantrasyonunun 13M *ad* grubunda 1M *ad* grubuna göre yüksek olduğu görülmektedir, 12. ve 24. saatlerde fark yoktur. ZT13 zamanında uygulamada 30. dakikada en yüksek değerlere ulaşılmış elde edilen C_{maks}

değerlerinin ($t_{maks}=0,5$.sa; $2,754\pm0,227$ $\mu\text{g/ml}$) ZT1'e göre ($t_{maks}=2$.sa; $1,62\pm0,109$ $\mu\text{g/ml}$) yüksek olduğu görülmektedir. ZT1 zamanında ise 2. saatin sonunda en yüksek plazma değerleri elde edilmiştir (Şekil 14A).

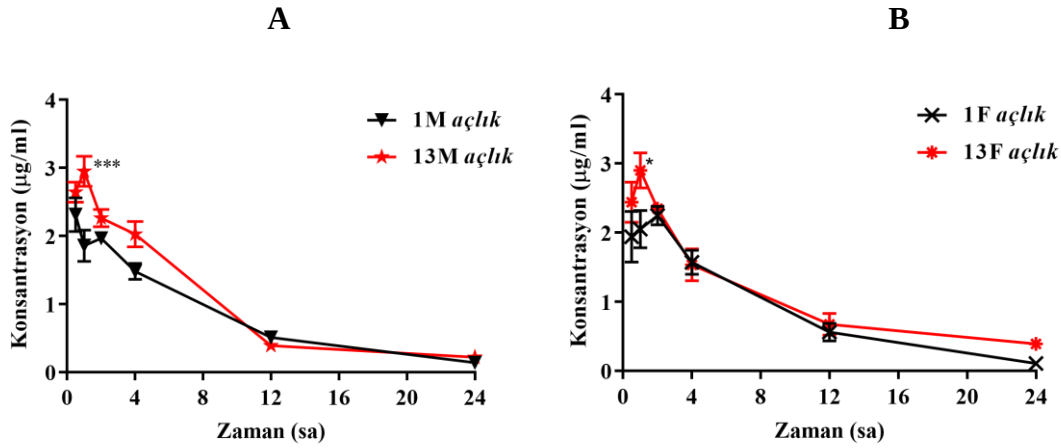


Şekil 14: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen erkek (A) ve dişi (B) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma konsantrasyon-zaman grafikleri. İki-yönlü ANOVA; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; ****, $p<0.0001$. Ort $\pm$ SEM.

Diğer taraftan, dişi farelere farklı zamanda uygulanan everolimusun t_{maks} değerleri farklı olsa bile (1F *ad*: 1. sa ve 13F *ad*: 0,5. sa) benzer bir kinetik profil çizdiği görülmekte olup C_{maks} değerleri arasında anlamlı bir fark yoktur (1F *ad*: $2,674\pm0,406$ $\mu\text{g/ml}$ ve 13F *ad*: $3,384\pm0,768$ $\mu\text{g/ml}$, $p>0,05$). 1. saatte plazma everolimus konsantrasyonunun 13F *ad* grubunda 1F *ad* grubuna göre yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,01$) (Şekil 14B).

Ad libitum beslenen dişi ve erkek farelere ZT1 zamanında ilaç uygulanmasını takiben 2 saat içerisinde en yüksek everolimus plazma konsantrasyonlarına erişilmiş ve sonrasında ilaç düzeyleri 24. saate kadar kademeli olarak azalmıştır. ZT1 zamanında dişi farelerde saptanan maksimum ilaç konsantrasyonu erkek farelere göre daha fazla olmuştur (1M *ad* C_{maks} $1,62\pm0,109$ $\mu\text{g/ml}$, 1F *ad* C_{maks} $2,674\pm0,406$ $\mu\text{g/ml}$, $p>0,05$). 0,5. ($p<0,0001$) ve 1. ($p<0,05$) saatlerde plazma everolimus konsantrasyonunun 1F *ad* grubunda 1M *ad* grubuna göre yüksek olduğu görülmektedir.

ZT13 zamanında ise, her iki cinsiyete uygulanan everolimus plazma konsantrasyonunun 1. Saatte ($p<0,001$) dişilerde yüksek olduğu saptanmıştır. Ancak C_{maks} düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (13M *ad*: $2,754\pm0,227$ $\mu\text{g/ml}$ ve 13F *ad*: $3,384\pm0,768$ $\mu\text{g/ml}$, $p>0,05$).



Şekil 15: ZT1 ve ZT13 zamanlarında aç bırakılan erkek (A) ve dişi (B) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma konsantrasyon-zaman grafikleri. İki-yönlü ANOVA; *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$. Ort $\pm$ SEM.

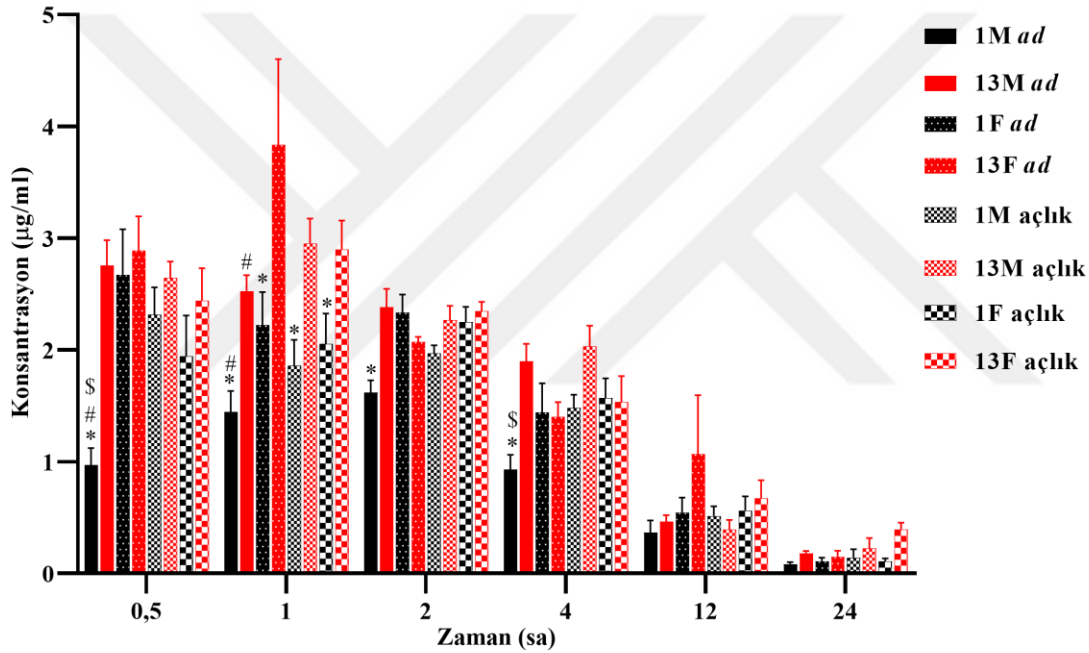
ZT1 ve ZT13 zamanlarında aç bırakılan erkek farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma konsantrasyon-zaman grafikleri değerlendirildiğinde; ZT1 ve ZT13 zamanlarında sırası ile 0,5 ve 1. saatlerde C_{maks} 'a erişilmiştir. ZT13 zamanında 1. saatte ($p<0,001$) ZT1'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme gözlenmesine rağmen C_{maks} değerlerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır (1M açlık: $2,314\pm0,247$ µg/ml ve 13M açlık: $2,953\pm0,222$ µg/ml, $p>0,05$) (Şekil 15A).

Açlık grubu dişi farelerde ise; ZT1 ve ZT13 zamanlarında sırası ile 2. ve 1. saatlerde en yüksek konsantrasyona erişilmiştir. ZT13 zamanında 1. saatte ($p<0,05$) ZT1'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme gözlenmesine rağmen C_{maks} değerlerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır (1F açlık: $2,25\pm0,135$ µg/ml ve 13F açlık: $2,9\pm0,256$ µg/ml, $p>0,05$) (Şekil 15B).

ZT1 zamanında ve açlık koşullarında uygulanan everolimusun erkek farelerde C_{maks} değeri $2,314\pm0,247$ µg/ml ($t_{maks}=0,5$.sa) iken dişi farelerde bu değer $2,25\pm0,135$ µg/ml ($t_{maks}=2$.sa) olarak görülmektedir. 1M açlık ve 1F açlık plazma konsantrasyon zaman grafiğinde zaman noktaları arasında ve C_{maks} değerlerinde anlamlı fark bulunmamıştır. ZT13 zamanında açlık gruplarında plazma everolimus zaman grafiğinde her iki grupta C_{maks} 'a ulaşma süresi 1. saattir. 13M açlık C_{maks} değeri $2,953\pm0,222$ µg/ml iken 13F açlık C_{maks} değeri $2,9\pm0,256$ µg/ml 'dir. 13M açlık ve 13F açlık plazma konsantrasyon zaman grafiğinde zaman noktaları arasında ve C_{maks} değerlerinde anlamlı fark bulunmamıştır.

Ad libitum ve açlık grupları karşılaştırıldığında; ZT1 grubu erkek farelerde açlık koşullarında everolimusun tokluk koşullarına göre, her zaman noktasında daha yüksek

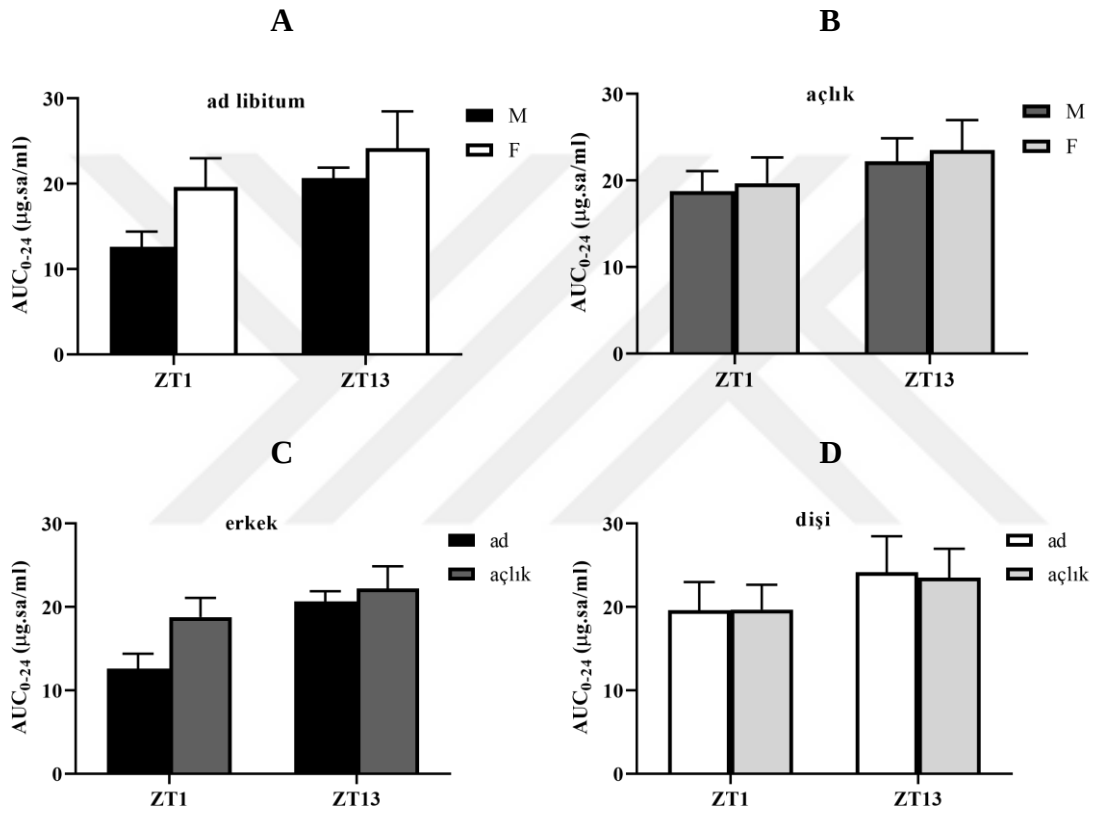
plazma konsantrasyonu oluşturduğu görülmektedir. 1M *ad* ve 1M açlık grupları arasındaki bu fark 0,5. ($p<0,0001$) ve 4. ($p<0,05$) saatlerde istatistiksel olarak anlamlıdır, ancak C_{maks} değerleri arasında fark yoktur. 13M *ad* ve 13M açlık gruplarının plazma everolimus konsantrasyon-zaman grafikleri karşılaştırıldığında beslenmenin bu gruplar arasında bir fark oluşturmadığı görülmektedir. Aynı şekilde dişi gruplarında da açlık-tokluk durumu everolimusun plazma konsantrasyonlarını değiştirmemiştir. 1F *ad* ve 1F açlık grupları arasında ve 13F *ad* ve 13F açlık grupları arasında zaman noktalarında ve C_{maks} değerlerinde fark bulunmamıştır. Tüm grupların plazma everolimus konsantrasyon zaman grafikleri karşılatırmalı olarak Şekil 16'da sunulmuştur.



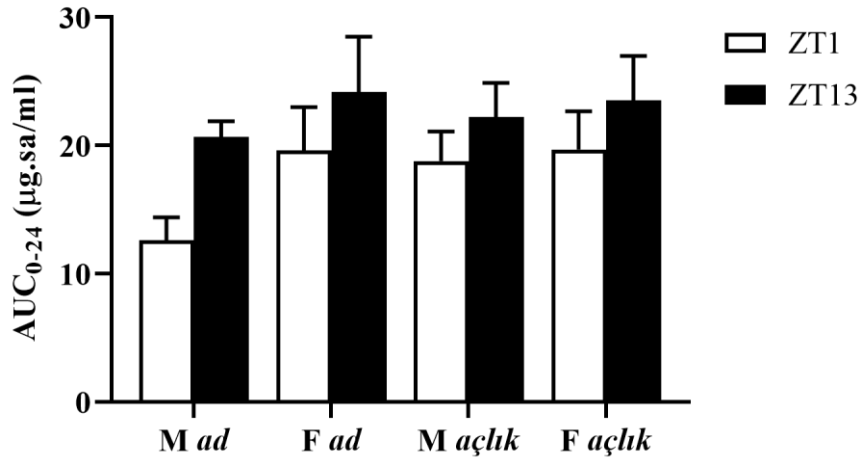
Şekil 16: ZT1 ve ZT13 zamanlarında aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen karşılatırmalı plazma konsantrasyon-zaman grafikleri. İki-yönlü ANOVA; *, #,\$, $p<0,05$; *, ZT1 vs ZT13, #; erkek vs dişi, \$; *ad libitum* vs açlık. Ort ± SEM.

0.-24. saat arasında eğri altında kalan alan (AUC_{0-24}) değerlerine bakıldığında en belirgin farklılık 1M *ad* grubunda gözlenmektedir. Diğer tüm gruplara göre AUC_{0-24} daha düşük bulunmuştur. Erkek ve dişi *ad libitum* gruplarının (Şekil 17A) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT fonksiyonu ($p=0,048$) istatistiksel olarak anlamlı bulunmasına rağmen Sidak post-hoc test ile gruplar arası anlamlılık bulunmamıştır. Cinsiyet ve ZT*Cinsiyet, fonksiyonları anlamlı değildir ($p>0,05$). Bu da *ad libitum* gruplarının AUC_{0-24} değerlerinde görülen istatistiksel farkın ZT'den kaynaklandığını göstermektedir. Erkek ve dişi açlık gruplarının (Şekil 17B) iki-yönlü

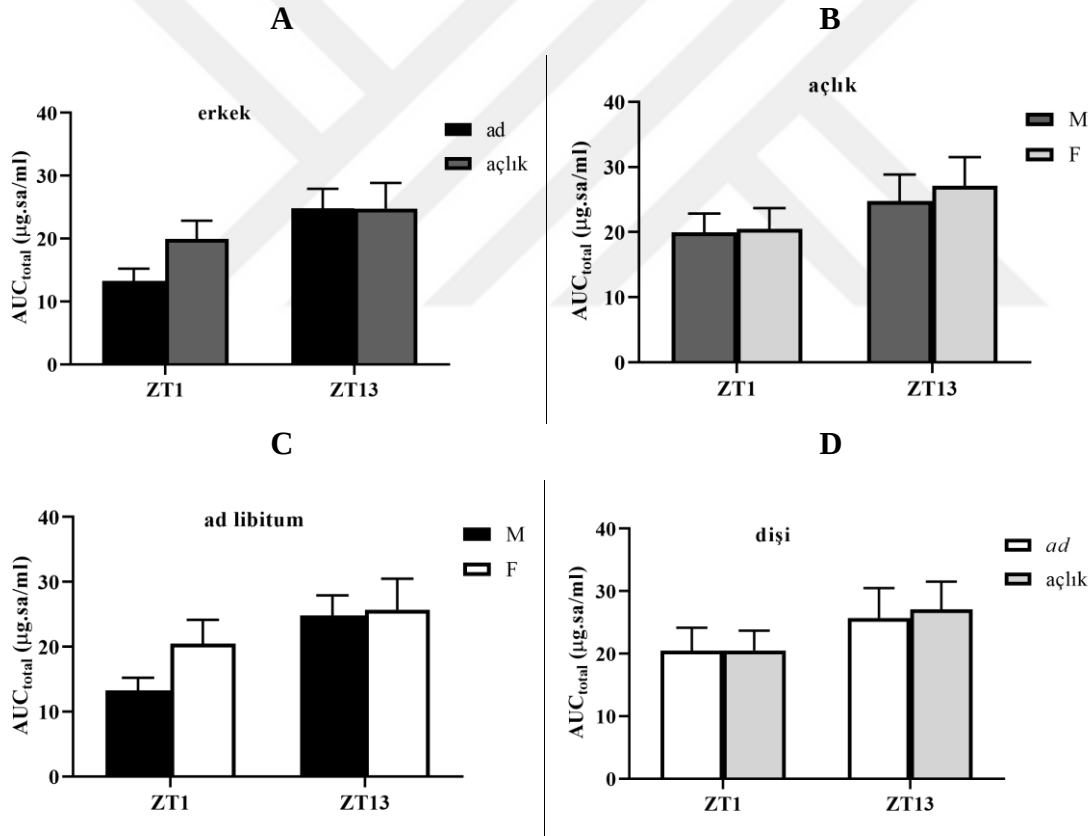
ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT'ye ve Cinsiyet'e bağlı bir fark gözlenmemiştir. Erkek *ad libitum* ve açlık gruplarının (Şekil 17C) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,0138$). FS and ZT*FS, fonksiyonları anlamlı değildir ($p>0,05$). Dişi *ad libitum* ve açlık gruplarının (Şekil 17D) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT'ye ve FS'ye bağlı bir fark gözlenmemiştir. Tüm gruplar arasındaki fark ZT'nin bir fonksiyonu olarak üç-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,022$). ZT*FS, ZT*Cinsiyet, ZT*FS*Cinsiyet ve diğer etkileşimler anlamlı değildir ($p>0,05$) (Şekil 18).



Şekil 17: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen (A) veya aç bırakılan (B) erkek (C) ve dişi (D) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma AUC₀₋₂₄ verileri. İki-yönlü ANOVA; Ort ± SEM.



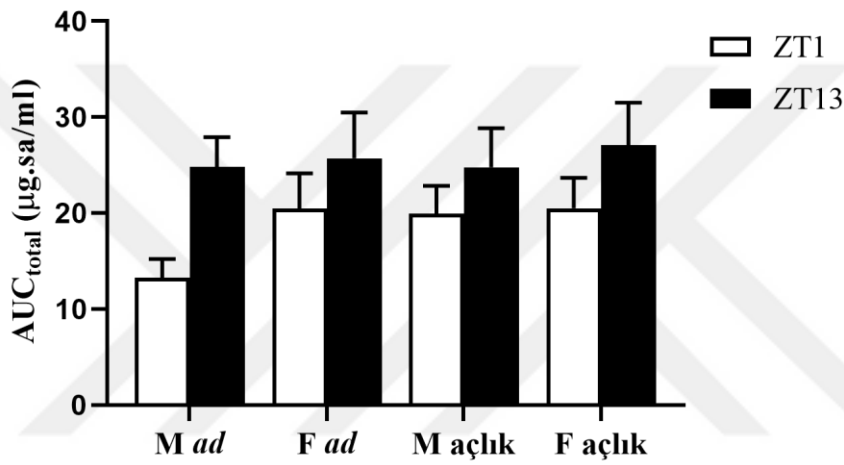
Şekil 18: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen veya aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma AUC_{0-24} verileri. Üç-yönlü ANOVA; Ort $\pm$ SEM.



Şekil 19: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen (A) veya aç bırakılan (B) erkek (C) ve dişi (D) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma AUC_{total} verileri. İki-yönlü ANOVA; Ort $\pm$ SEM.

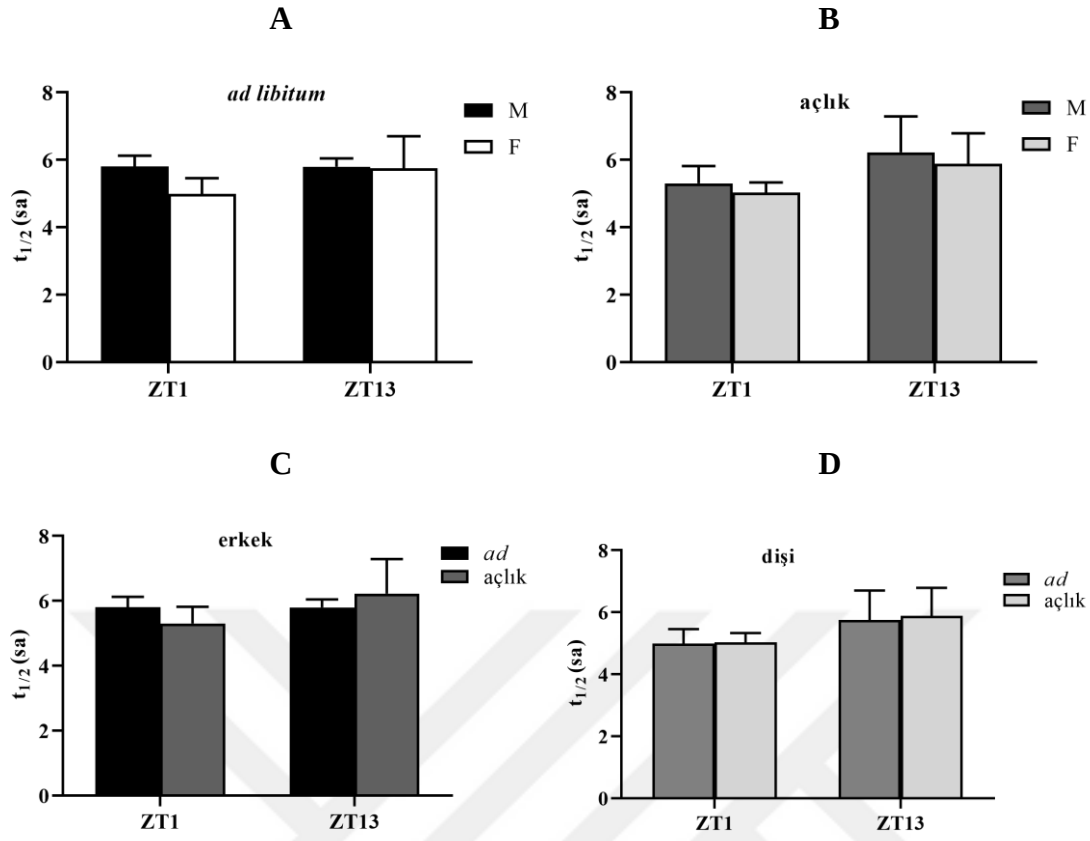
Total eğri altında kalan alan (AUC_{total}) değerlerine bakıldığında; beklendiği gibi AUC_{0-24} değerleri ile benzerdir. Erkek ve dişi *ad libitum* gruplarının (Şekil 19A) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0297$). Cinsiyet ve ZT*Cinsiyet, fonksiyonları anlamlı değildir.

($p>0,05$). Erkek ve dişi açlık gruplarının (Şekil 19B) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT'ye ve Cinsiyet'e bağlı bir fark gözlenmemiştir. Erkek *ad libitum* ve açlık gruplarının (Şekil 19C) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0174$). FS and ZT*FS, fonksiyonları anlamlı değildir ($p>0,05$). Dişi *ad libitum* ve açlık gruplarının (Şekil 19D) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT'ye ve FS'ye bağlı bir fark gözlenmemiştir. Tüm gruplar arasındaki fark ZT'nin ($p=0,0094$) bir fonksiyonu olarak üç-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ZT*FS, ZT*Cinsiyet, ZT*FS*Cinsiyet ve diğer etkileşimler anlamlı değildir ($p>0,05$) (Şekil 20).

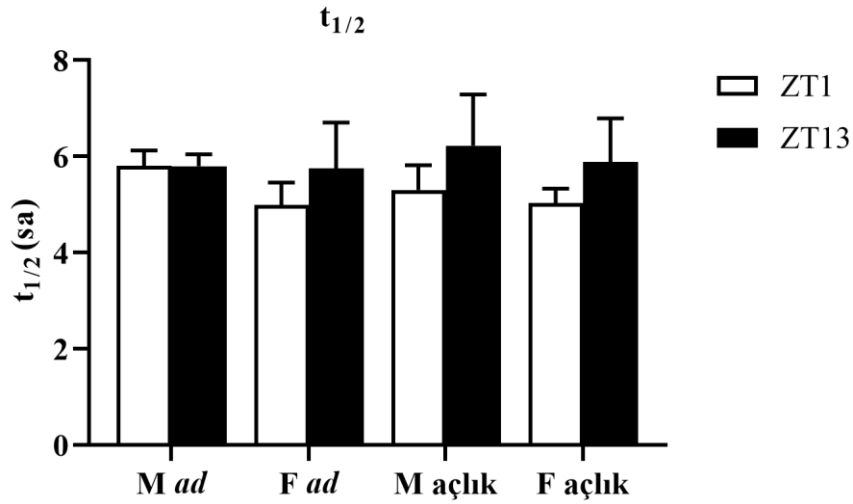


Şekil 20: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen veya aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma AUC_{total} verileri. Üç-yönlü ANOVA; Ort $\pm$ SEM.

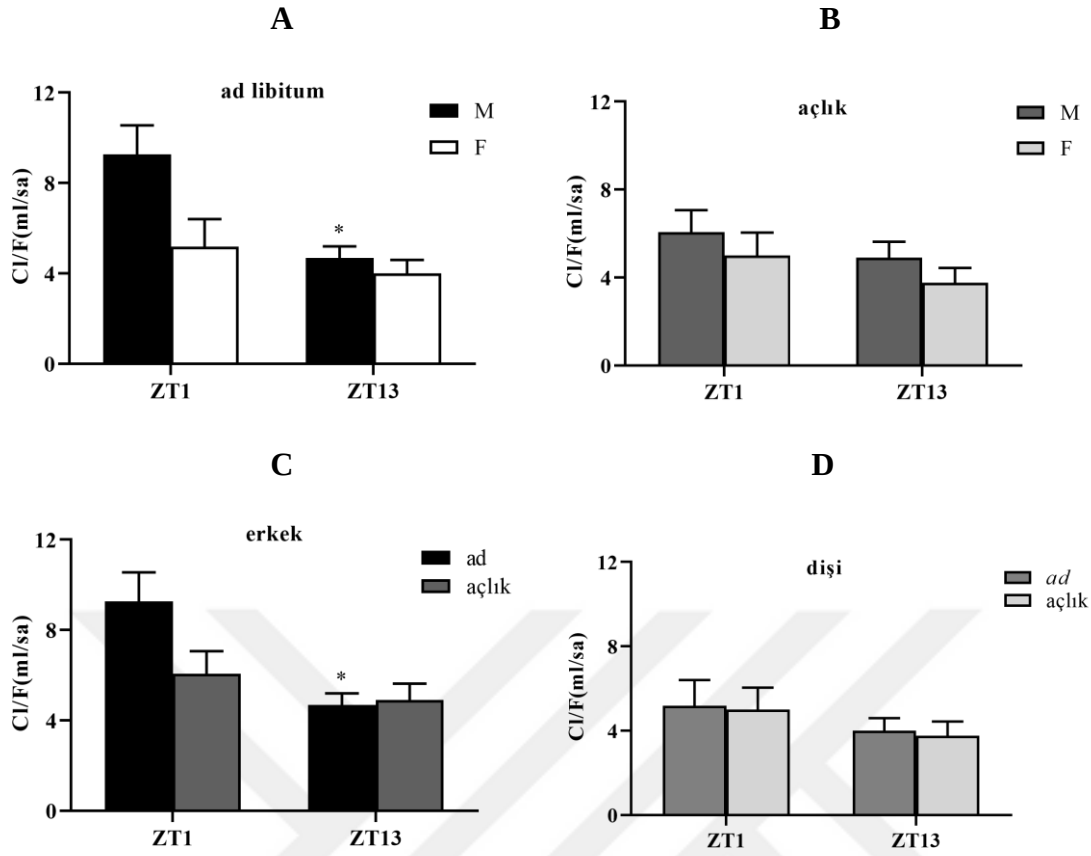
Tüm grupların plazma yarılanma ömrü verilerine bakıldığında tüm grupların plazma yarılanma ömrünün ($t_{1/2}$) benzer olduğu görülmektedir. Erkek ve dişi *ad libitum* gruplarının (Şekil 21A) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ve Cinsiyet'e bağlı bir fark gözlenmemiştir. Erkek ve dişi açlık gruplarının (Şekil 21B) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ve Cinsiyet'e bağlı bir fark gözlenmemiştir. Erkek *ad libitum* ve açlık gruplarının (Şekil 21C) karşılaştırılması sonucu ZT ve FS'ye bağlı bir fark gözlenmemiştir. Dişi *ad libitum* ve açlık gruplarının (Şekil 21D) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ve FS'ye bağlı bir fark gözlenmemiştir. Tüm gruplar arasındaki fark üç-yönlü ANOVA ile değerlendirildiğinde ZT, Cinsiyet ve FS'ye bağlı istatistiksel bir fark bulunmamıştır (Şekil 22).



Şekil 21: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen (A) veya aç bırakılan (B) erkek (C) ve dişi (D) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma $t_{1/2}$ verileri. İki-yönlü ANOVA; Ort $\pm$ SEM.



Şekil 22: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen veya aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma $t_{1/2}$ verileri. Üç-yönlü ANOVA; Ort $\pm$ SEM.

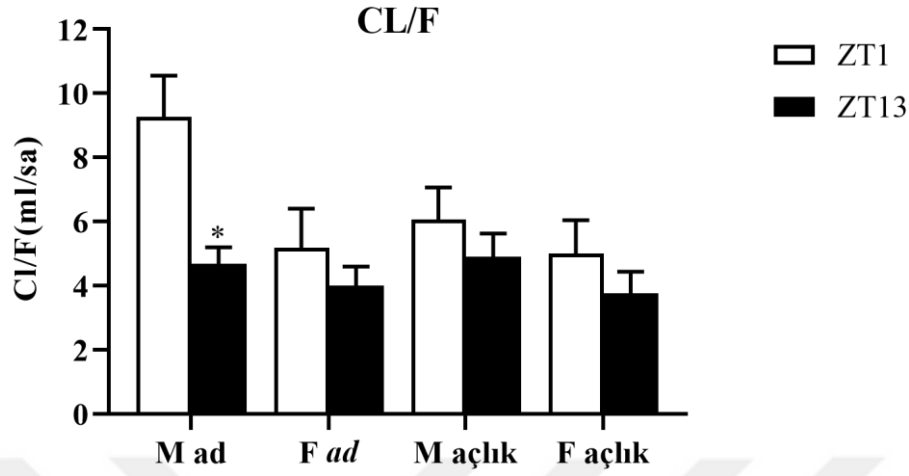


Şekil 23: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen (A) veya aç bırakılan (B) erkek (C) ve dişi (D) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma total klirens (Cl/F) verileri. İki-yönlü ANOVA; *, $p < 0.05$; *, ZT1 vs ZT13. Ort $\pm$ SEM.

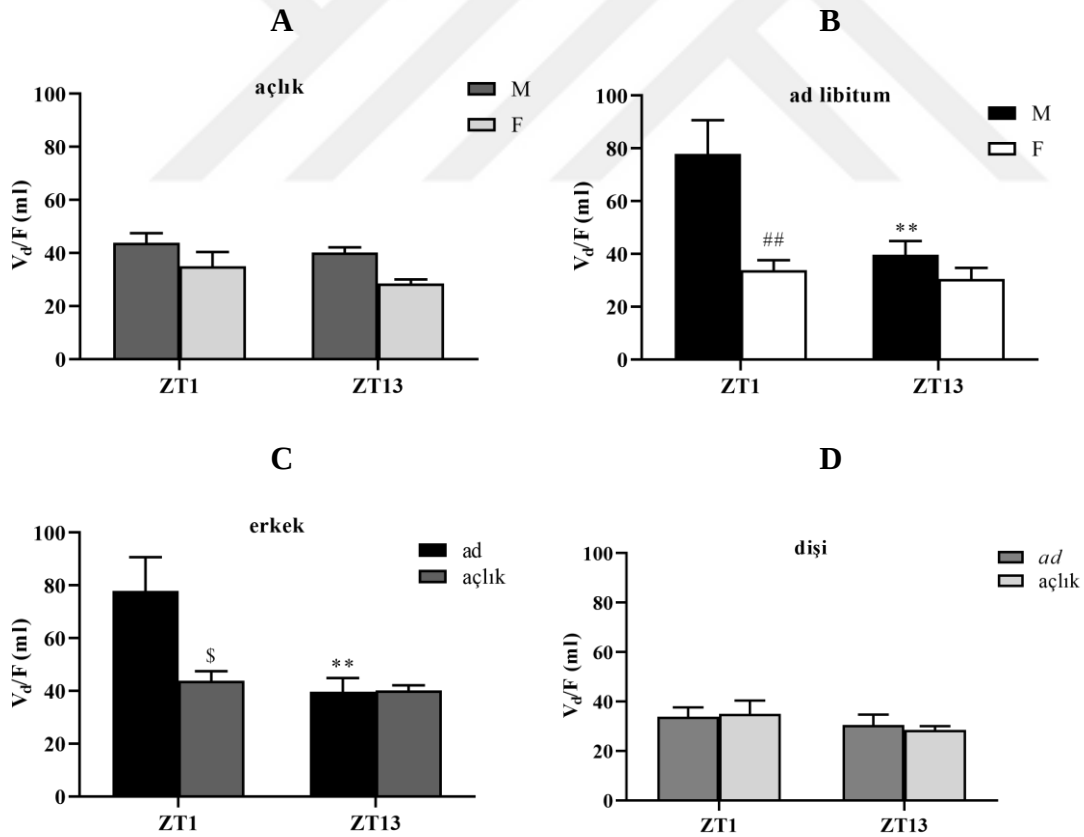
Tüm grupların plazma Cl/F verilerine bakıldığında 1M *ad* Cl/F'nin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görülmektedir. *Ad libitum* erkek ve dişi gruplarının (Şekil 23A) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ($p=0,0094$) ve Cinsiyet ($p=0,0259$) fonksiyonları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ZT*Cinsiyet fonksiyonu anlamlı değildir ($p>0,05$). 1M *ad* Cl/F değeri, 13M *ad* grubuna göre anlamlı olarak yüksektir ($p=0,0256$; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test).

Erkek ve dişi açlık gruplarının (Şekil 23B) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ve Cinsiyet'e bağlı bir fark gözlenmemiştir. Erkek *ad libitum* ve açlık gruplarının (Şekil 23C) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,007$). FS ve ZT*FS fonksiyonları anlamlı değildir ($p>0,05$). Dişi *ad libitum* ve açlık gruplarının (Şekil 23D) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ve FS'ye bağlı bir fark gözlenmemiştir. Tüm gruplar arasındaki fark ZT ($p=0,0039$) ve Cinsiyet'in ($p=0,0119$) bir fonksiyonu olarak üç-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

ZT*FS, ZT*Cinsiyet, ZT*FS*Cinsiyet ve diğer etkileşimler anlamlı değildir ($p>0,05$) (Şekil 24).



Şekil 24: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen veya aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma Cl/F verileri. Üç-yönlü ANOVA; *, $p<0,05$; *, ZT1 vs ZT13. Ort $\pm$ SEM.

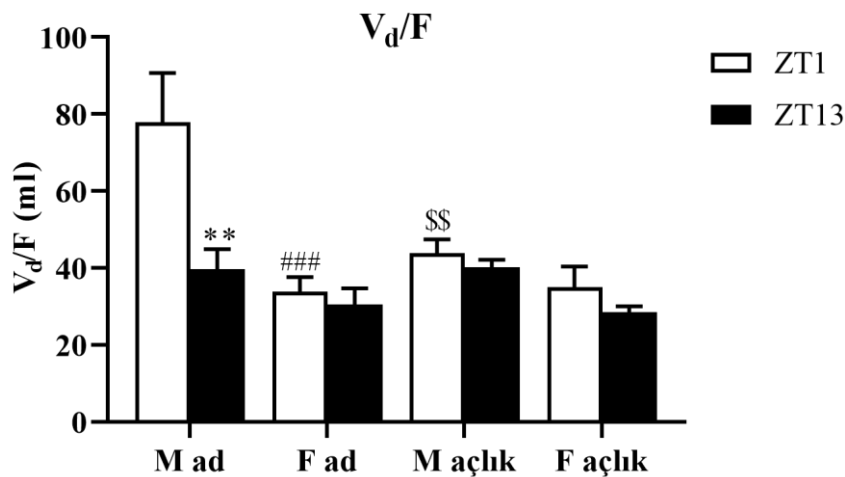


Şekil 25: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen (A) veya aç bırakılan (B) erkek (C) ve dişi (D) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma dağılım hacmi (V_d/F) verileri. İki-yönlü ANOVA; *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; *, ZT1 vs ZT13, #; erkek vs dişi, \$; *ad libitum* vs açlık. Ort $\pm$ SEM.

Tüm grupların plazma V_d/F verilerine bakıldığında; Cl/F sonuçlarında olduğu gibi 1M *ad* V_d/F değerinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görülmektedir. *Ad libitum* gruplarının (Şekil 25A) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ($p=0,0135$), Cinsiyet ($p=0,027$) ve ZT*Cinsiyet ($p=0,0332$) fonksiyonları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 1M *ad* V_d/F değeri, 1F *ad* grubuna göre anlamlı derecede yüksektir ($p=0,0044$; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test). Aynı zamanda, 1M *ad* V_d/F değeri, 13M *ad* grubuna göre de yüksek bulunmuştur ($p=0,009$; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test).

Erkek ve dişi açlık gruplarının (Şekil 25B) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu Cinsiyet ($p=0,0107$) fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Erkek gruplarının (Şekil 25C) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ($p=0,0108$), FS ($p=0,0336$) ve ZT*FS ($p=0,0301$) fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 1M *ad* V_d/F değeri, 1M açlık grubuna göre yüksek bulunmuştur ($p=0,0201$; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test). Dişi *ad libitum* ve açlık gruplarının (Şekil 25D) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ve FS'ye bağlı bir fark gözlenmemiştir. Tüm gruplar arasındaki fark ZT ($p=0,0038$), Cinsiyet ($p<0,0001$), FS ($p=0,0434$) ve ZT*FS*Cinsiyet ($p=0,0298$) bir fonksiyonu olarak üç-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 26).

Everolimusun plazma farmakokinetik parametrelerine ait tüm değerler Tablo 17'de sunulmuştur.



Şekil 26: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen veya aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma V_d/F verileri. Üç-yönlü ANOVA; **, \$\$, $p<0,01$; ###, $p<0,001$; *, ZT1 vs ZT13, #, erkek vs dişi, \$, *ad libitum* vs açlık. Ort $\pm$ SEM.

Tablo 17: Everolimusun plazma farmakokinetik verileri

	1M ad	13M ad	1F ad	13F ad	1M açlık	13M açlık	1F açlık	13F açlık
t_{maks} (sa)	2	0,5	0,5	1	0,5	1	2	1
C_{maks} (µg/ml) ±SEM	1,620	2,754	2,674	3,834	2,314	2,953	2,250	2,900
	±0,109	±0,227	±0,406	±0,768	±0,247	±0,222	±0,135	±0,256
AUC₀₋₂₄ (µg.sa/ml) ±SEM	12,58	20,66	19,62	24,17	18,78	22,21	19,70	23,52
	±1,818	±1,232	±3,358	±4,325	±2,308	±2,684	±2,964	±3,472
AUC_{total} (µg.sa/ml) ±SEM	13,29	24,83	20,50	25,70	19,96	24,79	20,52	27,10
	±1,937	±3,070	±3,644	±4,772	±2,896	±4,066	±3,179	±4,429
t_{1/2} (sa) ±SEM	5,805	5,795	4,989	5,751	5,304	6,224	5,032	5,885
	±0,318	±0,247	±0,467	±0,952	±0,513	±1,067	±0,297	±0,904
k_{el}(sa⁻¹) ±SEM	0,121	0,121	0,145	0,138	0,138	0,122	0,140	0,132
	±0,006	±0,006	±0,017	±0,027	±0,018	±0,016	±0,009	±0,023
Cl/F (ml/sa) ±SEM	9,265	4,688	5,170	3,999	6,066	4,900	5,001	3,754
	±1,290	±0,507	±1,233	±0,594	±0,999	±0,728	±1,041	±0,681
V_d/F (ml) ±SEM	77,84	39,69	33,91	30,58	43,76	40,09	34,92	28,49
	±12,85	±5,179	±3,751	±4,126	±3,735	±2,019	±5,449	±1,521

t_{maks}: Maksimum plazma konsantrasyonunun izlendiği zaman. C_{maks}: Maksimum plazmakonsantrasyonu. t_{1/2}: Plazma yarılanma ömrü. AUC₀₋₂₄: 24. saate kadar eğri altında kalan alan. AUC_{total}: Toplam eğri altında kalan alan. k_{el}: Eliminasyon hız sabiti. Cl/F: Klirens. V_d/F: Dağılım hacmi

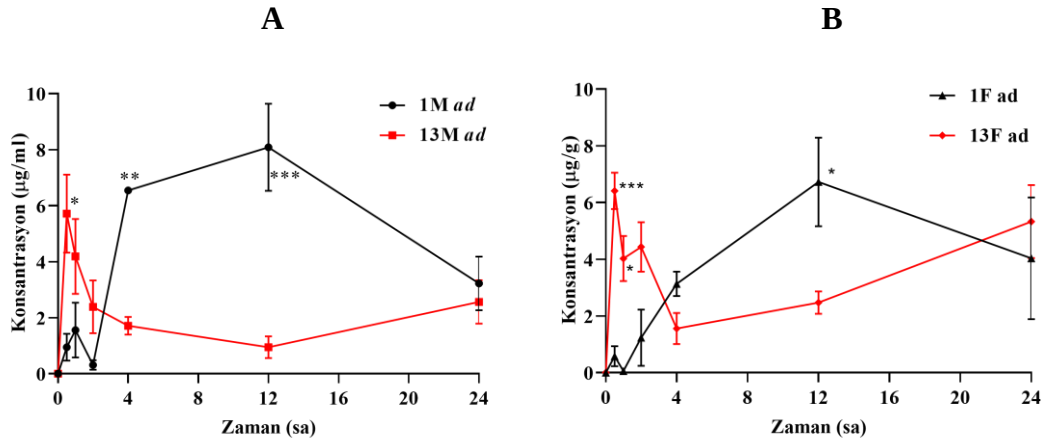
4.2.3. Everolimusun Karaciğer Konsantrasyon Verileri ve Farmakokinetik Parametreleri

Everolimusun oral yoldan uygulanmasını takiben karaciğer dokusuna ait C_{maks} ve t_{maks} değerleri uygulama zamanı, cinsiyet ve açlık/tokluk durumuna göre değişmektedir. Tüm deney gruplarında son numune toplama noktası olan 24. saatte everolimus konsantrasyonu karaciğerde tayin edilmiş olup, tüm gruplar için 48. saat sonunda da karaciğer dokusunda everolimusun saptanabileceği ön görülmüştür (Şekil 27-28). 13M *ad*, 13F *ad*, 1M açlık, 13M açlık, 1F açlık gruplarında karaciğer everolimus konsantrasyonu son saatlerde azalmaya devam etmemiş, 4. veya 12. saatlerden sonra artmıştır. Bu artış sebebiyle eliminasyon hız sabiti (k_{el}) ve buna bağlı olarak da eliminasyon yarılanma ömrü, klirens ve dağılım hacmi parametreleri hesaplanamamıştır. Karşılaştırma yapılamayacağından dolayı, hesaplama yapılabilen grupların değerleri de teze dahil edilmemiştir. Hesaplanabilen tüm farmakokinetik parametreler Tablo 18'de sunulmuştur.

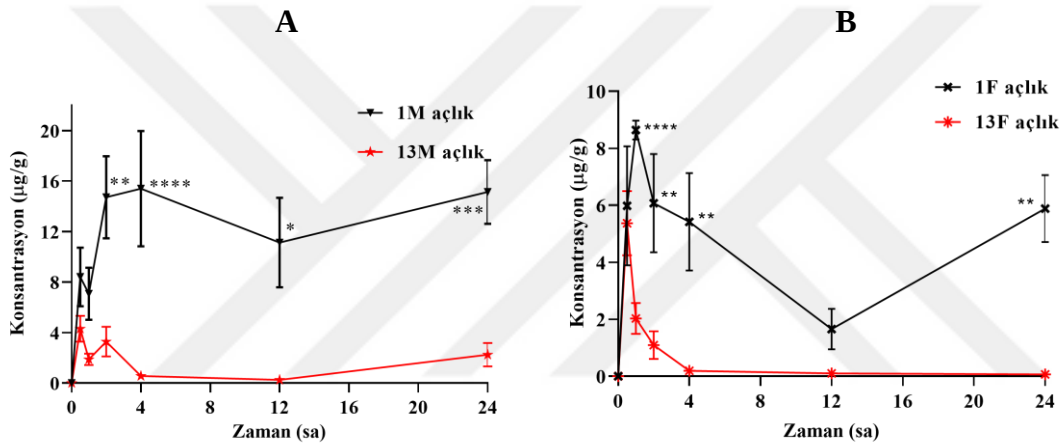
1M *ad* ve 13M *ad* gruplarının karaciğer everolimus konsantrasyon-zaman grafiği karşılaştırıldığında, t_{maks} 'ın iki grup arasında farklı olduğu görülmektedir. C_{maks} değerine 1M *ad* ve 13M *ad* gruplarında sırasıyla 12. ve 0,5. saatlerde ulaşılmıştır. 1. ($p<0,05$), 4. ($p<0,05$) ve 12. ($p<0,01$) saatlerinde everolimus konsantrasyonlarında bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu halde C_{maks} değerleri arasında farklılık gözlenmemiştir (Şekil 27A).

Ad libitum erkek gruplarında olduğu gibi 1F *ad* ve 13F *ad* gruplarında da t_{maks} 'ın farklı olduğu görülmektedir; sırasıyla 12 ve 0,5'tir. 0,5. ($p<0,001$), 1. ($p<0,05$) ve 12. ($p<0,05$) saatlerde everolimus konsantrasyonlarının bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu halde C_{maks} değerleri arasında farklılık gözlenmemiştir (Şekil 27B).

Açlık koşullarındaki erkek farelere ait ZT1 ve ZT13 zamanlarındaki karaciğer konsantrasyon-zaman profilleri incelendiğinde iki grup arasında belirgin fark olduğu görülmektedir. 1M açlık grubunda 4. saatte ve 13M açlık grubunda 0,5. saatte C_{maks} 'a ulaşılmıştır. C_{maks} değeri 1M açlık grubunda daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). 2., 4. 12. ve 24. zaman noktalarında da 1M açlık grubu anlamlı derecede daha yüksektir ($p<0,001$) (Şekil 28A).



Şekil 27: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen erkek (A) ve dişi (B) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen karaciğer konsantrasyon-zaman grafikleri. İki-yönlü ANOVA; *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$. Ort $\pm$ SEM.



Şekil 28: ZT1 ve ZT13 zamanlarında aç bırakılan erkek (A) ve dişi (B) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma konsantrasyon-zaman grafikleri. İki-yönlü ANOVA; *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; ****, $p<0.001$. Ort $\pm$ SEM.

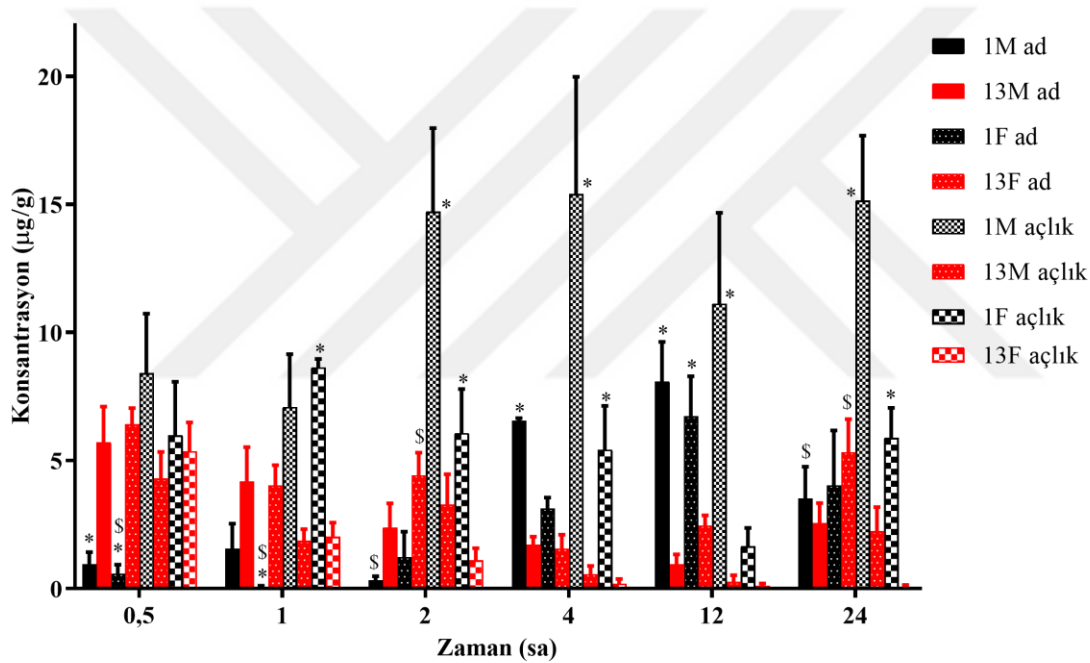
Açlık koşullarındaki dişi farelere ait ZT1 ve ZT13 zamanlarındaki karaciğer konsantrasyon-zaman profilleri incelendiğinde 1., 2., 4. ve 24. saatlerde iki grup arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,01$) 1F açlık ve 13F açlık gruplarının C_{maks} değerleri arasında farklılık gözlenmemiştir (Şekil 28B).

Ad libitum grupları arasında cinsiyete bağlı karaciğer konsantrasyon-zaman profillerindeki farklılık değerlendirildiğinde 1M *ad* ve 1F *ad* grupları arasında ve 13M *ad* ve 13F *ad* grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir.

Açlık grupları arasında cinsiyete bağlı karaciğer konsantrasyon-zaman profillerindeki farklılık değerlendirildiğinde 1M açlık ve 1F açlık grupları arasında ve 13M açlık ve 13F açlık grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir.

Everolimusun karaciğer konsantrasyon-zaman grafikleri açlık/tokluk durumuna göre değerlendirildiğinde; ZT1 grubu erkek farelerde açlık koşullarında everolimusun tokluk koşullarına göre, her zaman noktasında karaciğerde daha yüksek konsantrasyon oluşturduğu görülmektedir. 1M *ad* ve 1M açlık grupları arasındaki bu fark 2. ($p<0,001$) ve 24. ($p<0,05$) saatlerde istatistiksel olarak anlamlıdır, C_{maks} değerleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır, 1M açlık grubunda C_{maks} daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

13M *ad* ve 13M açlık gruplarının karaciğer everolimus konsantrasyon-zaman grafikleri karşılaştırıldığında beslenmenin bu gruplar arasında bir fark oluşturmadığı görülmektedir.

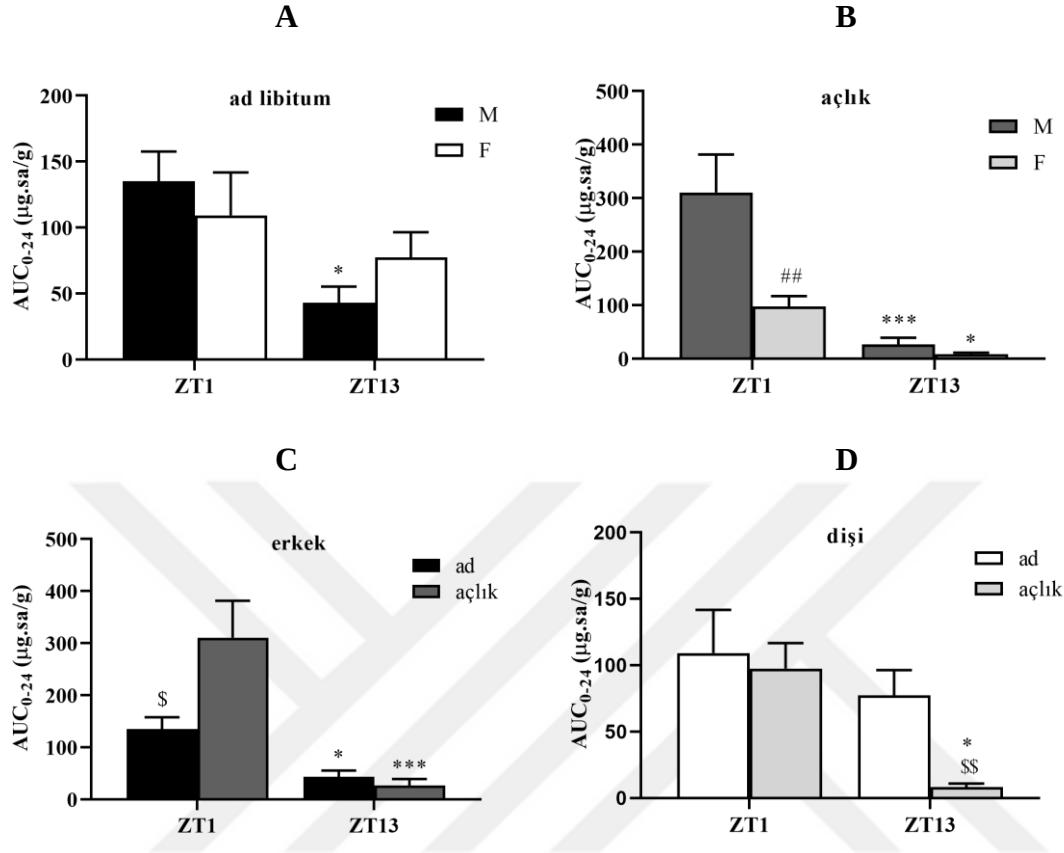


Şekil 29: ZT1 ve ZT13 zamanlarında aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen karşılaştırmalı karaciğer konsantrasyon-zaman grafikleri. İki-yönlü ANOVA; *, #, \$, $p<0,05$; *, ZT1 vs ZT13, #, erkek vs dişi, \$, *ad libitum* vs açlık. Ort $\pm$ SEM.

1F *ad* ve 1F açlık gruplarının karaciğer everolimus konsantrasyon-zaman grafikleri arasında 0,5. ($p<0,05$), 1. ($p<0,001$) ve 12. ($p<0,05$) saatlerde anlamlı fark bulunmaktadır. Ancak C_{maks} değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

ZT13 grubu dişi fareler açlık/tokluk durumuna göre değerlendirildiğinde; 13F *ad* 13F açlık grubuna göre 2. ($p<0,01$) ve 24. ($p<0,0001$) saatlerde daha yüksek bulunmuştur. C_{maks} değerleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

Tüm grupların karşılaştırmalı everolimus karaciğer konsantrasyon-zaman grafikleri Şekil 29’da sunulmuştur.



Şekil 30: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen (A) veya aç bırakılan (B) erkek (C) ve dişi (D) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen karaciğer AUC₀₋₂₄ verileri. İki-yönlü ANOVA; *,\$,p<0,05; **,\$\$,p<0,01; *,ZT1 vs ZT13, #, erkek vs dişi, \$, ad libitum vs açlık. Ort ± SEM.

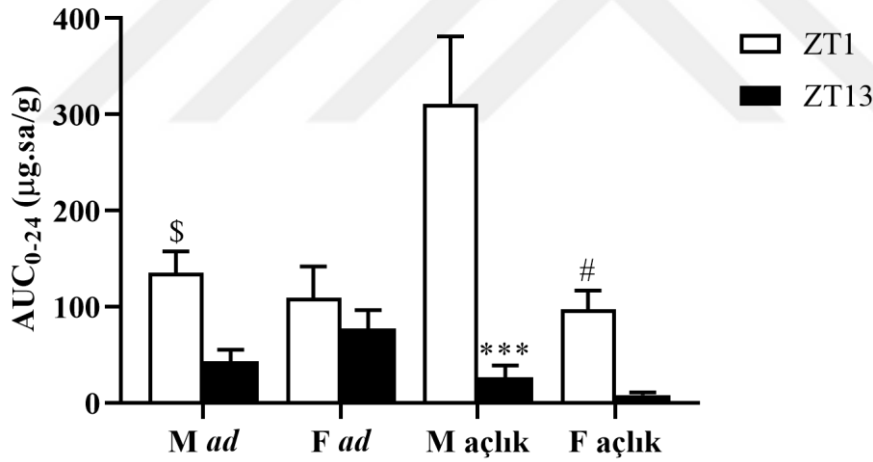
AUC₀₋₂₄ değerlerine bakıldığında ZT1 ve ZT13 zamanları arasında farklılık olduğu gözlenmektedir. 1M açlık grubunda AUC₀₋₂₄ değeri diğer tüm gruplara göre daha yüksek ve 13F açlık grubunda en düşüktür. *Ad libitum* gruplarının (Şekil 30A) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT (p=0,0124) fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Cinsiyet ve ZT*Cinsiyet, fonksiyonları anlamlı değildir (p>0,05). 1M ad grubu AUC₀₋₂₄ değeri, 13M ad grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,0413; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test).

Açlık gruplarının (Şekil 30B) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT (p=0,0002), Cinsiyet (p=0,0095) ve ZT*Cinsiyet (p=0,0243) fonksiyonları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 1M açlık grubu AUC₀₋₂₄ değeri, 13M açlık grubuna göre anlamlı derecede yüksektir (p=0,0004; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test). 1M açlık grubu AUC₀₋₂₄ değeri, 1F açlık grubuna göre de anlamlı derecede yüksektir

($p=0,0091$; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test). Aynı zamanda, 1F açlık AUC_{0-24} değeri, 13F açlık grubuna göre anlamlı derecede yüksektir ($p=0,0301$; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test).

Erkek gruplarının (Şekil 30C) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ($p=0,0003$) ve ZT*FS ($p=0,0288$) fonksiyonları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. FS fonksiyonu anlamlı değildir ($p>0,05$). 1M açlık grubu AUC_{0-24} değeri, 1M *ad* grubuna göre anlamlı derecede yüksektir ($p=0,0373$; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test).

Dişi gruplarının (Şekil 30D) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ($p=0,0132$) fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. FS and ZT*FS, fonksiyonları anlamlı değildir ($p>0,05$). 13F *ad* AUC_{0-24} değeri, 13F açlık grubuna göre anlamlı derecede yüksektir ($p=0,0084$; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test). Aynı zamanda, 1F açlık AUC_{0-24} değeri, 13F açlık grubuna göre anlamlı derecede yüksektir ($p=0,0301$; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test).



Şekil 31: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen veya aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen karaciğer AUC_{0-24} verileri. Üç-yönlü ANOVA; #,\$ $p<0,05$; *** $p<0,001$; *, ZT1 vs ZT13, #; erkek vs dişi, \$; *ad libitum* vs açlık. Ort $\pm$ SEM.

Tüm gruplar arasındaki fark ZT ($p<0,0001$), Cinsiyet ($p=0,0202$), ZT*FS ($p=0,01$), ZT*Cinsiyet ($p=0,0087$), FS*Cinsiyet ($p=0,013$) bir fonksiyonu olarak üç-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ZT*FS*Cinsiyet fonksiyonu anlamlı değildir ($p>0,05$) (Şekil 31).

Tablo 18: Everolimusun karaciğer dokusuna ait farmakokinetik verileri

	1M ad	13M ad	1F ad	13F ad	1M açlık	13M açlık	1F açlık	13F açlık
t_{maks} (sa)	12	0.5	12	0.5	4	0.5	1	0.5
C_{maks} (µg/g)	8,083	5,715	6,726	6,408	15,406	4,302	8,637	5,368
± SEM	±1,552	±1,391	±1,561	±0,641	±4,576	±1,032	±0,332	±1,127
AUC₀₋₂₄ (µg.sa/g)	135,0	43,01	109,3	77,34	310,8	27,41	97,53	8,247
± SEM	±22,57	±12,17	±32,53	±19,06	±70,51	±12,52	±19,19	±2,734

t_{maks}: Maksimum plazma konsantrasyonunun izlendiği zaman. C_{maks}: Maksimum plazmakonsantrasyonu. AUC₀₋₂₄: 24. saate kadar eğri altında kalan alan.

4.2.3.1. Karaciğer/Plazma Oranları

Doku dağılımının bir göstergesi olan, everolimus karaciğer ve plazma konsantrasyonlarının oranlanması ile bulunan karaciğer/plazma oranlarına bakıldığında (Şekil 32), 13F *açlık* grubu hariç tüm gruplarda karaciğer/plazma oranlarının zamana bağlı olarak arttığı saptanmıştır.

Ad libitum erkek gruplarında ilk saatlerde 13M ad grubunda karaciğer/plazma oranları yüksek iken, 4. saatten sonra 1M ad grubunda 13M *ad*'a göre doku dağılımının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. 1M *ad* ve 13M *ad* grupları karaciğer dağılımları arasında 12. ve 24. saatlerde anlamlı fark gözlenmiştir (p<0,0001; iki-yönlü ANOVA Sidak post-hoc test). 1M *ad* ve 13M *ad* arasındaki fark ZT (p<0,0001) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 32A).

1F *ad* ve 13F *ad* grupları karşılaştırıldığında, karaciğer dağılım profillerinin benzediği görülmektedir. Bu gruplar arasında karaciğer dağılımları açısından anlamlı fark bulunamamıştır (Şekil 32B).

Tüm *ad libitum* grupları beraber değerlendirildiğinde ZT*Cinsiyet (p=0,0172) fonksiyonları üç-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Açlık gruplarında hesaplanan karaciğer/plazma oranlarına bakıldığında ilk zaman noktasından itibaren ZT1 gruplarında ZT13 gruplarına göre daha yüksek dağılım gözlenmiştir. Özellikle 1M *açlık* grubunda 24. saatte bu oranın diğer gruplardan anlamlı olarak yüksek olduğunu görmekteyiz (p<0,0001). 1M *açlık* ve 13M *açlık* grupları karaciğer dağılımları arasında 24. saatte anlamlı fark gözlenmiştir (p<0,0001; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test). 1M *açlık* ve 13M *açlık* arasındaki fark ZT (p=0,016)

fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 32C).

1F açlık ve 13F açlık grupları karşılaştırıldığında diğer gruplara benzer olarak ZT1'de doku dağılımının yüksek olduğu görülmektedir. 1F açlık ve 13F açlık grupları karaciğer dağılımları arasında 1. saatten itibaren anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0,05$; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test). 1F açlık ve 13F açlık arasındaki fark ZT ($p<0,0001$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 32D).

Tüm açlık grupları beraber değerlendirildiğinde ZT ($p=0,0125$) ve Cinsiyet ($p=0,0403$) fonksiyonları üç-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Ad libitum grupları cinsiyete bağlı olarak karşılaştırıldığında; 1M *ad* ve 1F *ad* gruplarında karaciğer dağılım profillerinin benzediği görülmektedir. Bu gruplar arasında karaciğer dağılımları açısından anlamlı fark bulunamamıştır.

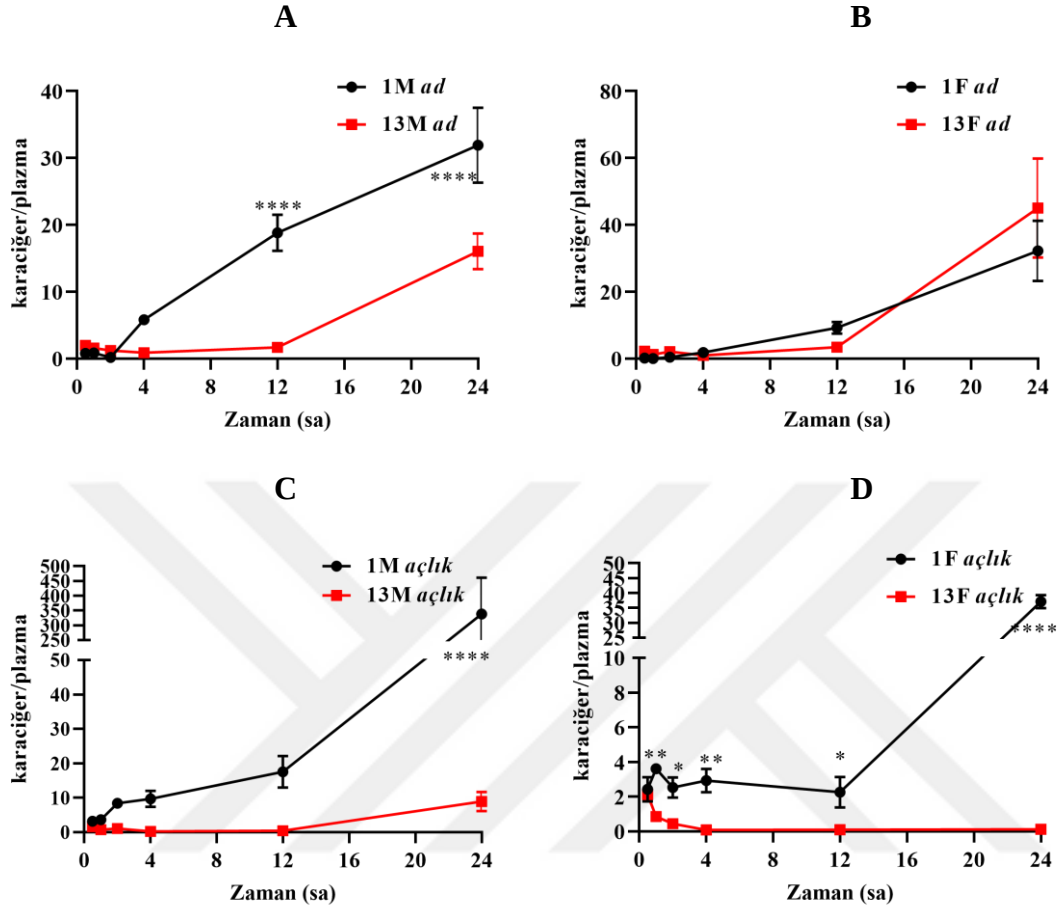
13M *ad* ve 13F *ad* grupları karşılaştırıldığında ise, 24. saatte 13F *ad*'nin 13M *ad*'ye göre anlamlı olarak yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,001$; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test). 13F *ad* ve 13M *ad* arasındaki fark Cinsiyet ($p=0,0329$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Açlık grupları cinsiyete bağlı olarak karşılaştırıldığında; 1M açlık ve 1F açlık gruplarının karaciğer dağılım profillerinin benzediği görülmektedir. Bu grupların karaciğer dağılımları arasında 24. saatte anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0,01$; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test). Ancak iki-yönlü ANOVA ile genel değerlendirildiğinde karaciğer dağılımları açısından anlamlı fark bulunamamıştır.

13M açlık ve 13F açlık grupları karşılaştırıldığında ise, 24. saatte 13M açlık'ın 13F açlık'a göre anlamlı olarak yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,0001$; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test). 13F açlık ve 13M açlık arasındaki fark Cinsiyet ($p=0,0015$) ve fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Açlık/tokluk durumuna bağlı olarak da karaciğer/plazma oranları değerlendirilmiştir. 1M *ad* ve 1M açlık grupları karşılaştırıldığında; 24. saatte 1M açlık'ın 1M *ad*'a göre anlamlı olarak yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,001$; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test). 1M *ad* ve 1M açlık arasındaki fark FS*Zaman'ın

($p=0,0109$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



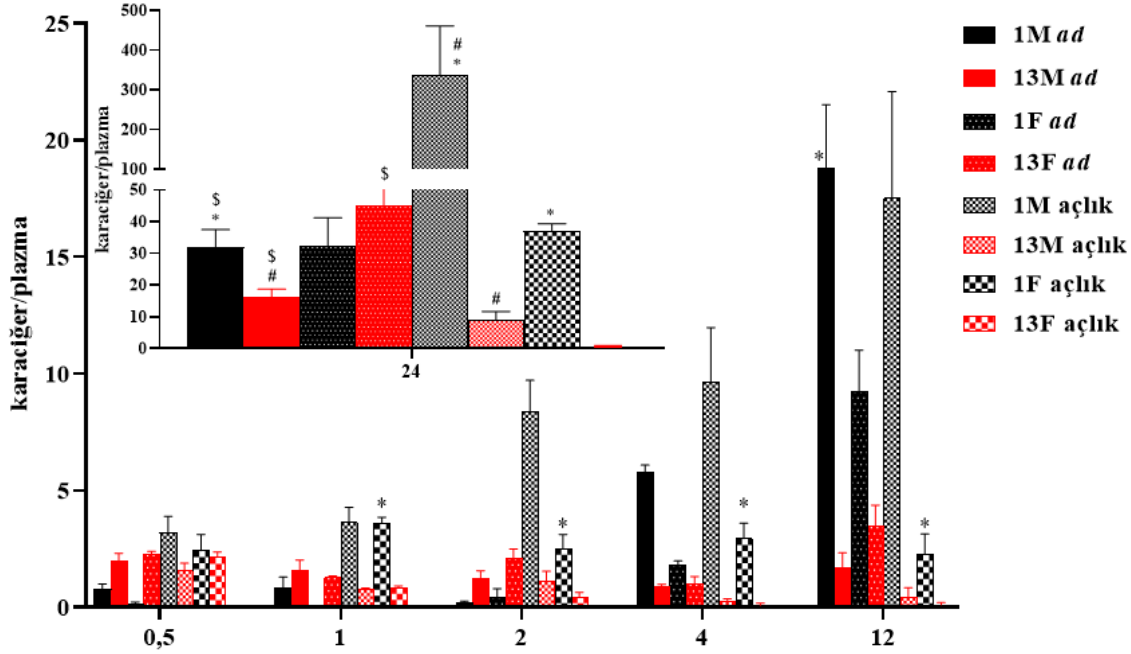
Şekil 32: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen erkek (A) ve dişi (B) veya açlık koşullarındaki erkek (C) ve dişi (D) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen karaciğer ve plazma konsantrasyonlarından hesaplanan karaciğer/plazma oranları. İki-yönlü ANOVA; *, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$; ****, $p<0.0001$. Ort $\pm$ SEM.

13M *ad* ve 13M açlık grupları karşılaştırıldığında; 24. saatte 13M *ad*'ın 13M açlık'a göre anlamlı olarak yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,001$; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test). 13M *ad* ve 13M açlık arasındaki fark FS ($p=0,008$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Tüm erkek grupları beraber değerlendirildiğinde ZT ($p=0,0153$) ve FS*ZT ($p=0,0442$) ve fonksiyonları üç-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

1F *ad* ve 1F açlık grupları karşılaştırıldığında, karaciğer dağılım profillerinin benzediği görülmektedir. Bu gruplar arasında karaciğer dağılımları açısından anlamlı fark bulunmamıştır. 13F *ad* ve 13F açlık grupları açlık/tokluk durumuna göre karşılaştırıldığında; 24. saatte 13F *ad*'nin 13F açlık'a göre anlamlı olarak yüksek olduğu

görülmektedir ($p<0,0001$; iki-yönlü ANOVA, Sidak post-hoc test). 13F ad ve 13F açlık arasındaki fark FS ($p=0,008$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 33: Tüm grupların karşılaştırmalı karaciğer/plazma oranları. İki-yönlü ANOVA; *, #, \$, $p<0.05$; *, ZT1 vs ZT13, #; erkek vs dişi, \$; ad libitum vs açlık. Ort $\pm$ SEM.

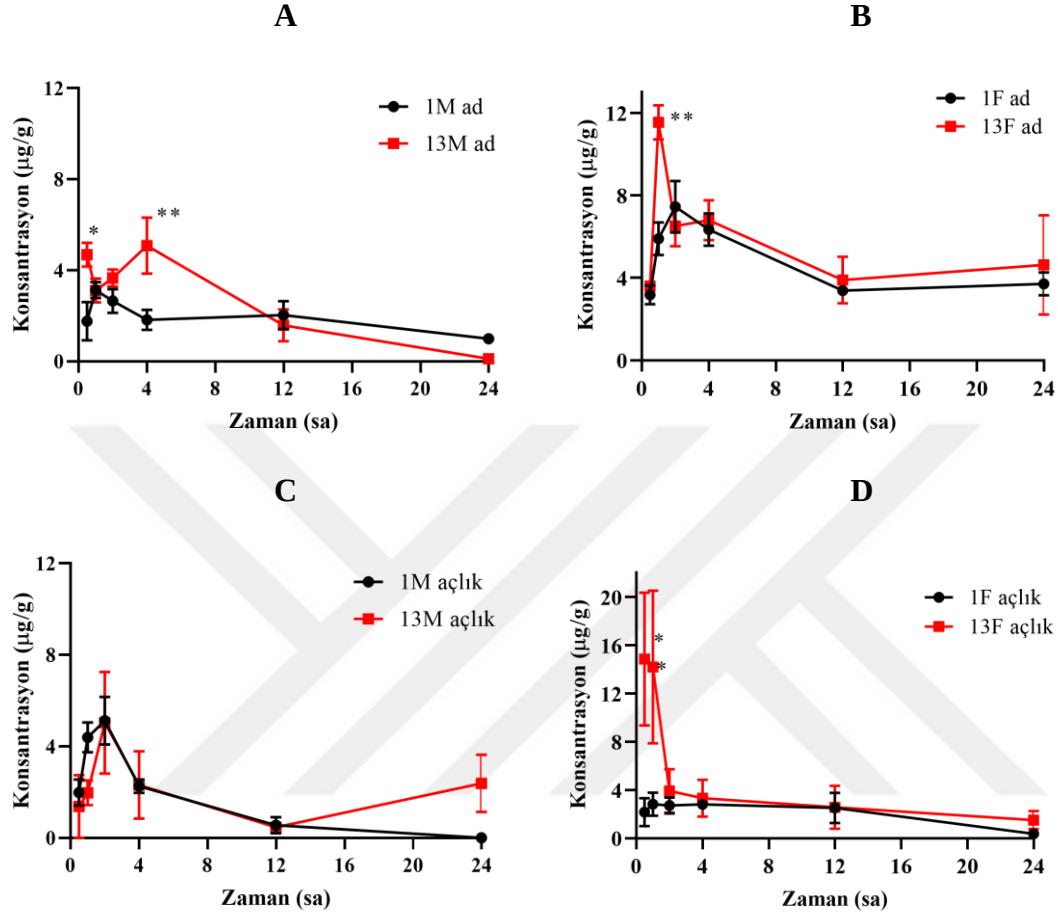
Tüm dişi grupları beraber değerlendirildiğinde FS ($p=0,0139$), ZT ($p=0,0443$) ve FS*ZT ($p=0,00015$) fonksiyonları üç-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tüm grupların karşılaştırmalı olarak karaciğer/plazma oranları Şekil 33'te sunulmuştur.

4.2.4. Everolimusun İleum Konsantrasyon Verileri ve Farmakokinetik Parametreleri

Everolimusun oral yoldan uygulanmasını takiben ileum dokusuna ait C_{maks} ve t_{maks} değerleri uygulama zamanı, cinsiyet ve açlık/tokluk durumuna göre değişmektedir. Tüm deney gruplarında son numune toplama noktası olan 24. saatte everolimus konsantrasyonu ileumda tayin edilebilmiştir (Şekil 34). 13M *açlık* dışındaki tüm gruplarda ileum everolimus konsantrasyonu zamana bağlı olarak azalmıştır. İleum dokusuna ait everolimusun tüm farmakokinetik parametreleri Tablo 19'da sunulmuştur.

1M *ad* ve 13M *ad* gruplarının ileum everolimus konsantrasyon-zaman grafiği karşılaştırıldığında, C_{maks} değerine 1M *ad* ve 13M *ad* gruplarında sırasıyla 1. ve 4. saatlerde ulaşılmıştır. 0,5. ($p=0,0107$) ve 4. ($p=0,0013$) saatlerde everolimus konsantrasyonlarında bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu

halde C_{maks} değerleri arasında farklılık gözlenmemiştir. Bu grupların (Şekil 34A) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ($p=0,0049$) fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Şekil 34: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen veya aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen ileum konsantrasyon-zaman grafikleri. İki-yönlü ANOVA; *, $p<0.05$; **, $p<0.01$. Ort $\pm$ SEM.

Ad libitum erkek gruplarında olduğu gibi 1F ad ve 13F ad gruplarında t_{maks} 'ın farklı olduğu görülmektedir; sırasıyla 2. ve 1. saatlerde ulaşılmıştır. 1. saatte ($p=0,0022$) ileum everolimus konsantrasyonlarında bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu halde C_{maks} değerleri arasında farklılık gözlenmemiştir. Bu grupların (Şekil 34B) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT*Zaman ($p=0,0432$) fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Ad libitum grupları arasında cinsiyete bağlı farklılık değerlendirildiğinde; 1M *ad* ve 1F *ad* gruplarının iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu Cinsiyet ($p<0,0001$) fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 1. ($p=0,0143$), 2. ($p<0,0001$), 4. ($p<0,0001$) ve 24. ($p=0,0331$) saatlerde 1F *ad* ileum everolimus konsantrasyonları 1M

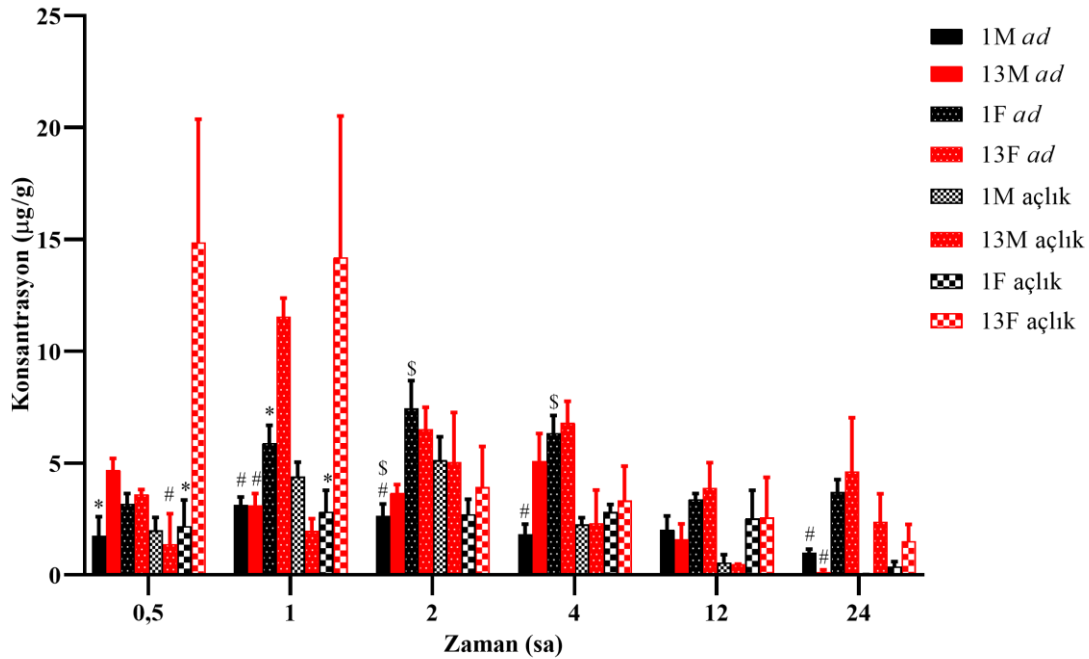
ad grubuna göre daha yüksektir. 1F *ad* ($t_{maks}=2.sa$) C_{maks} değeri de 1M *ad*'a ($t_{maks}=1.sa$) göre yüksek bulunmuştur ($p=0,0245$).

13M *ad* ve 13F *ad* gruplarının iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ise; Cinsiyet ($p<0,0001$) fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Zaman noktaları arasında da 1. ($p<0,0001$) ve 24. ($p=0,0054$) saatlerde 13F *ad* istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur

Açlık koşullarındaki erkek farelere ait ZT1 ve ZT13 zamanlarındaki ileum konsantrasyon-zaman profilleri incelendiğinde iki grup arasında belirgin fark olmadığı görülmektedir (34C).

Açlık koşullarındaki dişi farelere ait ZT1 ve ZT13 zamanlarındaki ileum konsantrasyon-zaman profilleri incelendiğinde 0,5, ve 1. saatlerde iki grup arasında anlamlı fark bulunmaktadır ($p<0,05$), 13F açlık grubu daha yüksektir (Şekil 34D).

Açlık grupları arasında cinsiyete bağlı farklılık değerlendirildiğinde; 1M açlık ve 1F açlık grupları arasında istatistiksel olarak fark olmadığı görülmektedir. 13M açlık ve 13F açlık gruplarının iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu 0,5. saatte 13F açlık grubunda ileum everolimus konsantrasyonu anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0,0393$).



Şekil 35: ZT1 ve ZT13 zamanlarında aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen karşılaştırmalı ileum konsantrasyon-zaman grafikleri. İki-yönlü ANOVA; *, #, \$, $p<0,05$; *, ZT1 vs ZT13, #, erkek vs dişi, \$, *ad libitum* vs açlık. Ort $\pm$ SEM.

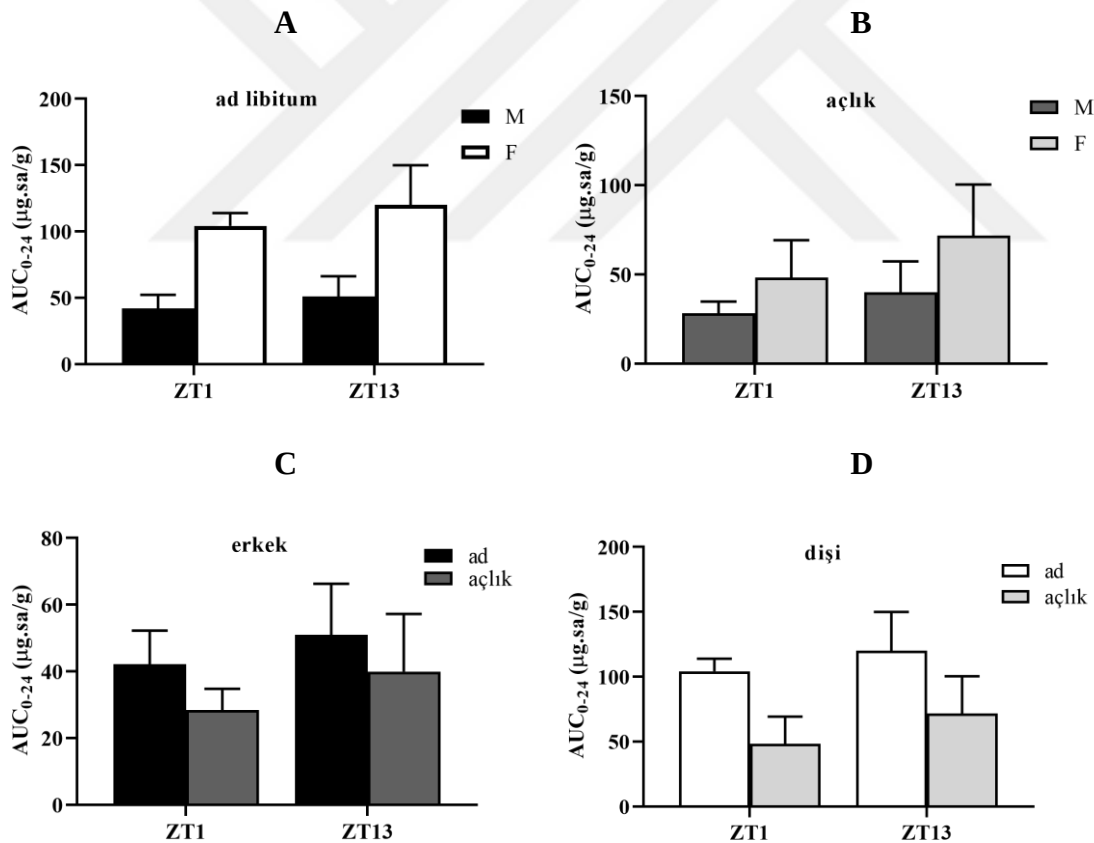
Açlık/tokluk durumunun karşılaştırıldığında; 2. saatte 1M açlık grubu ileum everolimus konsantrasyonu 1M *ad* grubuna göre anlamlı olarak daha yüksektir ($p=0,0109$).

Aynı şekilde 13M *ad* ve 13M açlık gruplarının da iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu zaman noktaları arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

1F *ad* ve 1F açlık gruplarının iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucunda ise 2. ($p=0,0016$) ve 4. ($p=0,0281$) saatlerde 1F *ad* ileum everolimus konsantrasyonu 1F açlık grubuna göre daha yüksektir.

13F *ad* ve 13F açlık grupları arasında istatistiksel olarak fark olmadığı görülmektedir.

Tüm grupların karşılaştırmalı everolimus ileum konsantrasyon-zaman grafikleri Şekil 35'te sunulmuştur.

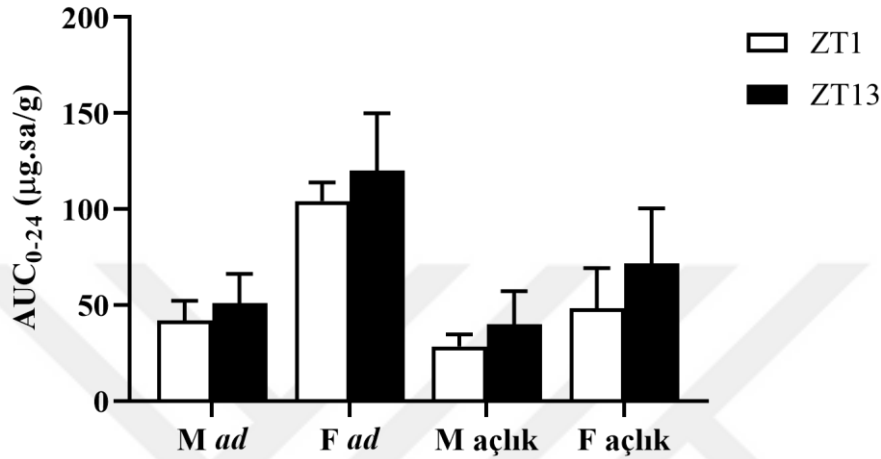


Şekil 36: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen (A) veya aç bırakılan (B) erkek (C) ve dişi (D) farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen ileum AUC₀₋₂₄ verileri. İki-yönlü ANOVA, Ort ± SEM.

AUC₀₋₂₄ değerlerine bakıldığında zamana bağlı fark olmadığı ancak cinsiyete ve açlık/tokluk durumuna bağlı farklılık olduğu gözlenmektedir. *Ad libitum* gruplarının

(Şekil 36A) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu Cinsiyet ($p=0,0019$) fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur, ZT'ye bağlı fark gözlenmemiştir.

Açlık gruplarının (Şekil 36B) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT'ye veya Cinsiyete bağlı bir fark bulunmamıştır. Aynı şekilde erkek grupları (Şekil 36C) beraber değerlendirildiğinde de ZT'ye ve FS'ye bağlı bir fark gözlenmemiştir.



Şekil 37: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen veya aç bırakılan farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen ileum AUC₀₋₂₄ verileri. Üç-yönlü ANOVA; Ort $\pm$ SEM.

Tablo 19: Everolimusun ileum dokusuna ait farmakokinetik verileri

	1M ad	13M ad	1F ad	13F ad	1M açlık	13M açlık	1F açlık	13F açlık
t_{maks} (sa)	1	4	2	1	2	2	1	0.5
C_{maks} (µg/g)	3,132	5,08	7,446	11,548	5,128	5,039	2,829	14,866
± SEM	±0,348	±1,237	±1,243	±0,830	±1,042	±2,225	±0,958	±5,506
AUC₀₋₂₄ (µg.sa/g)	42,16	50,96	104,3	120,1	28,37	39,98	48,32	71,74
± SEM	±10,09	±15,34	±9,616	±29,83	±6,403	±17,28	±20,86	±28,74

t_{maks}: Maksimum plazma konsantrasyonunun izlendiği zaman. C_{maks}: Maksimum plazma konsantrasyonu. AUC₀₋₂₄: eğri altında kalan alan t: 0-24

Dişi grupları (Şekil 36D) beraber değerlendirildiğinde iki-yönlü ANOVA ile FS'ye bağlı olarak fark bulunmuştur ($p=0,0453$), ZT'ye bağlı fark gözlenmemiştir. Tüm gruplar birlikte üç-yönlü ANOVA ile değerlendirildiğinde Cinsiyet ($p=0,0014$) ve FS'nin ($p=0,0186$) fonksiyonları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 37).

4.2.4.1. İleum/Plazma Oranı

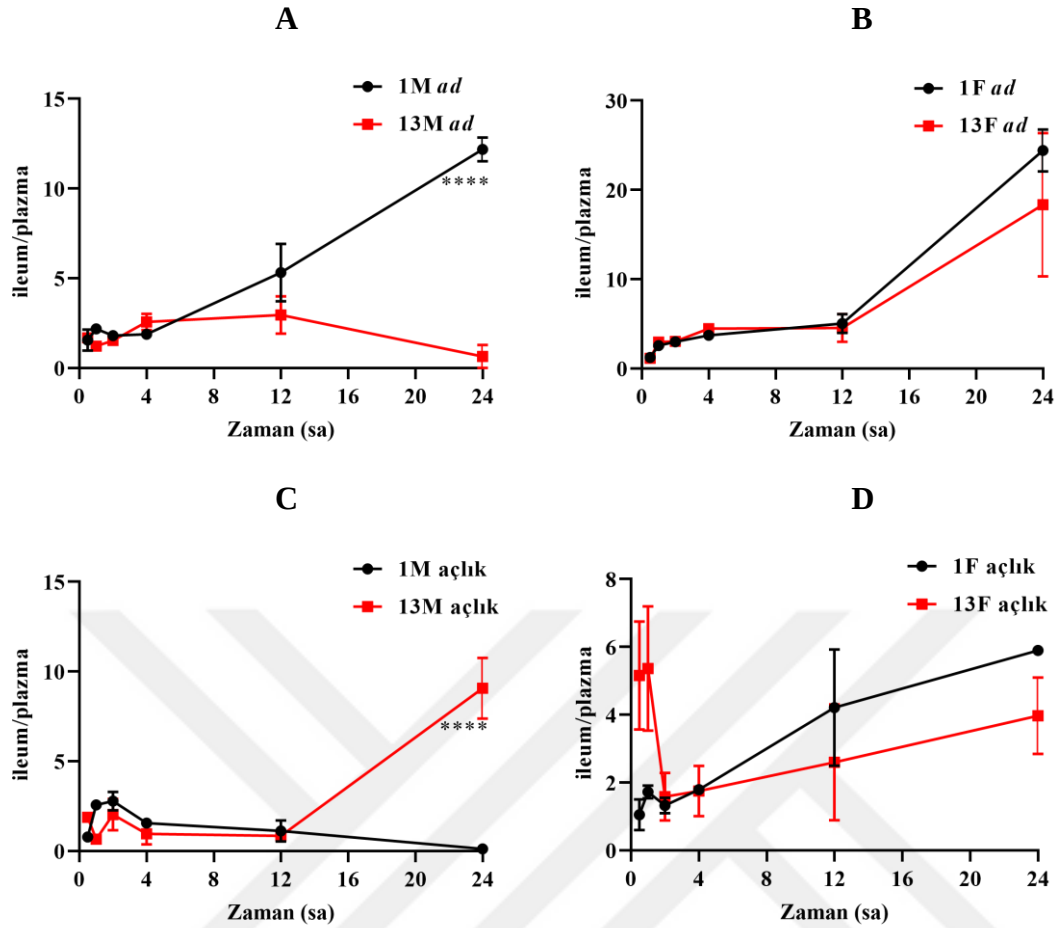
İntestinal dağılımın bir göstergesi olan, everolimus ileum ve plazma konsantrasyonlarının oranlanması ile bulunan ileum/plazma oranlarına bakıldığında (Şekil 38), erkek açlık grupları hariç tüm gruplarda ileum/plazma oranlarının ZT1’de daha yüksek olduğu görülmektedir.

1M *ad* ve 13M *ad* gruplarında ileum dağılımları arasında 24. saatte anlamlı fark gözlenmiştir ($p<0,0001$). 1M *ad* ve 13M *ad* arasındaki fark ZT ($p<0,0001$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 38A). 1F *ad* ve 13F *ad* gruplarının iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ileum dağılımları arasında istatistiksel fark bulunmamıştır (Şekil 38B).

Ad libitum gruplarının ileumdaki everolimus dağılımları cinsiyete bağlı olarak karşılaştırıldığında; 1F *ad* grubunun 1M *ad*’e göre ileum dağılımının 24. saatte daha yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,0001$). 1M *ad* ve 1F *ad* arasındaki fark Cinsiyet ($p<0,0001$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 13M *ad* ve 13F *ad* grupları karşılaştırıldığında ise, 24. saatte 13F’nin 13M’ye göre anlamlı olarak yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,01$). 13F *ad* ve 13M *ad* arasındaki fark Cinsiyet ($p=0,005$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Tüm *ad libitum* grupları beraber değerlendirildiğinde Cinsiyet ($p<0,0001$) ve ZT ($p<0,0173$) fonksiyonları üç-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Açlık gruplarında hesaplanan ileum/plazma oranlarına bakıldığında; 1M açlık ve 13M açlık grupları ileum dağılımları arasında 24. ($p<0,0001$) saatlerde anlamlı fark gözlenmiştir, 13M açlık daha yüksektir. 1M açlık ve 13M açlık arasındaki fark ZT ($p=0,0034$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 38C). 1F açlık ve 13F açlık gruplarının ileum dağılımları karşılaştırıldığında; zaman noktaları arasında fark olmamasına rağmen 1F açlık ve 13F açlık arasında ZT*Zaman’ın ($p=0,0417$) fonksiyonu iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 38D).



Şekil 38: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen ve açlık koşullarında, farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen ileum ve plazma konsantrasyonlarından hesaplanan ileum/plazma oranları. İki-yönlü ANOVA; ****, $p < 0.001$. Ort $\pm$ SEM.

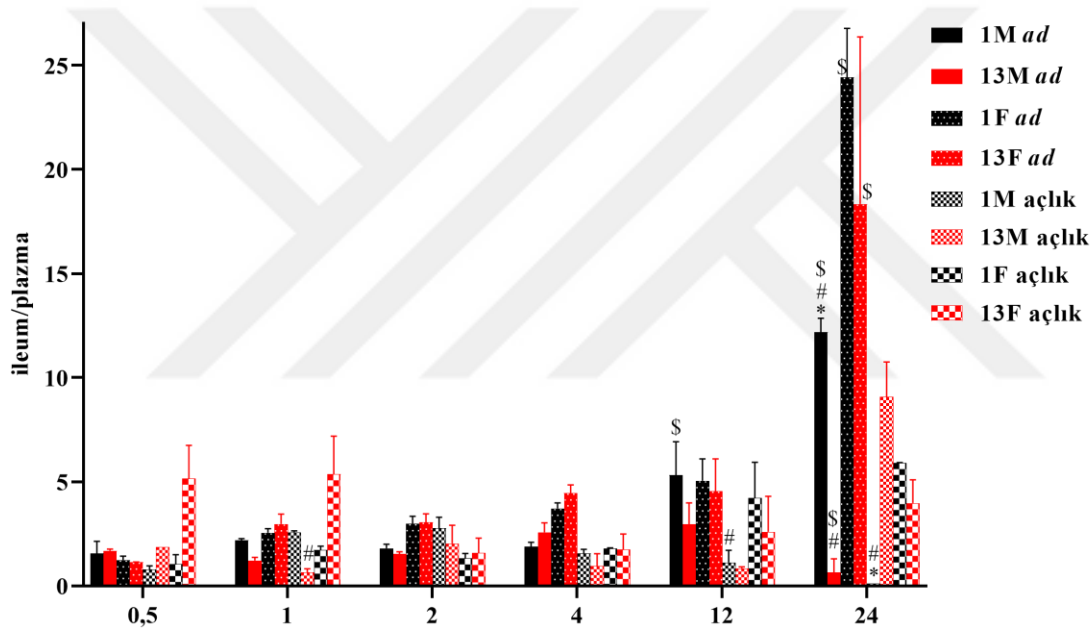
Açlık grupları cinsiyete bağlı olarak karşılaştırıldığında; 1F açlık grubunun 12. ve 24. saatlerde 1M açlık grupundan yüksek olduğu görülmektedir ($p < 0,001$). 1F açlık ve 1M açlık arasındaki fark Cinsiyet ($p = 0,0048$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 13M açlık ve 13F açlık grupları karşılaştırıldığında ise, 1. saatte 13F açlık'ın 13M açlık'a göre anlamlı olarak yüksek olduğu görülmektedir ($p < 0,05$). 13F açlık ve 13M açlık arasındaki fark Cinsiyet*Zaman'ın ($p = 0,0195$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Tüm açlık grupları beraber değerlendirildiğinde ZT ($p = 0,0316$), Cinsiyet ($p = 0,018$) ve ZT*Cinsiyet*Zaman ($p < 0,0001$) fonksiyonları üç-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Açlık/tokluk durumuna bağlı olarak da ileum/plazma oranları değerlendirilmiştir. 1M *ad* ve 1M açlık grupları karşılaştırıldığında; 12. ve 24. saatlerde

1M *ad*'nin 1M açlık'a göre anlamlı olarak yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,001$). 1M *ad* ve 1M açlık arasındaki fark FS ($p<0,0001$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 13M *ad* ve 13M açlık grupları karşılaştırıldığında; 24. saatte 13M açlık'ın 13M *ad*'ye göre anlamlı olarak yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,001$). 13M *ad* ve 13M açlık arasındaki fark FS*Zaman'ın ($p=0,001$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Tüm erkek grupları beraber değerlendirildiğinde FS ($p<0,0001$), FS*ZT ($p<0,0001$) ve ZT*FS*Zaman ($p<0,0001$) fonksiyonları üç-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



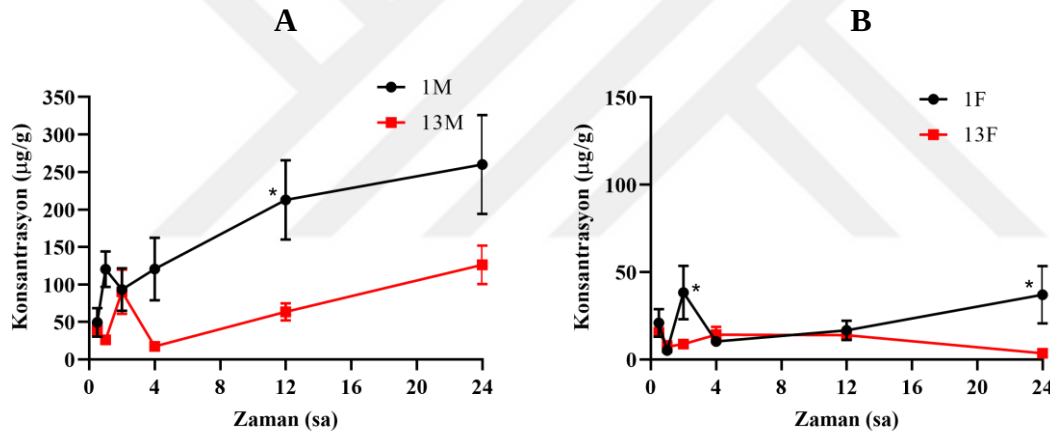
Şekil 39: Tüm grupların karşılaştırmalı ileum/plazma oranları. İki-yönlü ANOVA; *, #, \$, $p<0,05$; *, ZT1 vs ZT13, #; erkek vs dişi, \$; *ad* libitum vs açlık. Ort $\pm$ SEM.

1F *ad* ve 1F açlık grupları karşılaştırıldığında, 24. saatte 1F *ad*'nin 1F açlık'a göre anlamlı olarak yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,0001$). 1F *ad* ve 1F açlık arasındaki fark FS ($p<0,0001$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 13F *ad* ve 13F açlık grupları açlık/tokluk durumuna göre karşılaştırıldığında; 24. saatte 13F *ad*'nin 13F açlık'a göre anlamlı olarak yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,01$). 13F *ad* ve 13F açlık arasındaki fark FS*Zaman'ın ($p=0,0074$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Tüm dişi grupları beraber değerlendirildiğinde FS ($p<0,0001$) ve ZT ($p=0,0443$) fonksiyonları üç-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tüm grupların karşılaştırmalı olarak ileum/plazma oranları Şekil 39’da sunulmuştur.

4.2.5. Everolimusun Timus Konsantrasyon Verileri ve Farmakokinetik Parametreleri

Everolimusun oral yoldan uygulanmasını takiben timus dokusunda *ad libitum* grubu hayvanlardan everolimus tayin edilmiştir. Daha önceki çalışmamızda everolimusun zamana bağlı toksisitesi *ad libitum* beslenen hayvanlarda değerlendirildiği için sadece *ad libitum* erkek ve dişi farelerin timus everolimus konsantrasyonları çalışılmıştır. C_{maks} ve t_{maks} değerleri uygulama zamanı ve cinsiyete göre değişmektedir. Erkek gruplarında everolimus timus konsantrasyonu zamana bağlı olarak artarken, dişi gruplarında azalmış ya da sabit kalmıştır. Timus dokusuna ait everolimusun tüm farmakokinetik parametreleri Tablo 20’de sunulmuştur.

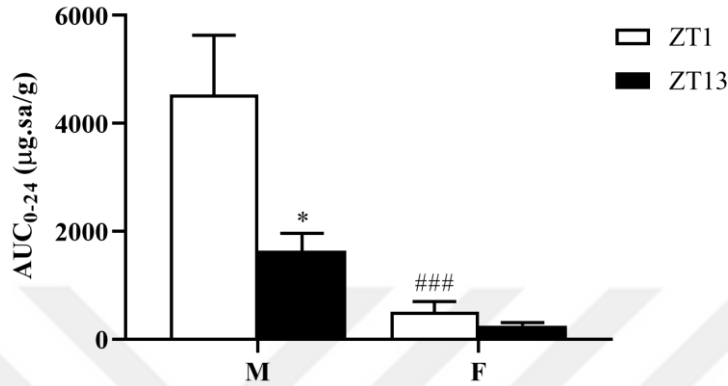


Şekil 40: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen timus konsantrasyon-zaman grafikleri. İki-yönlü ANOVA; *, $p<0.05$. Ort $\pm$ SEM.

1M *ad* ve 13M *ad* gruplarının timus everolimus konsantrasyon-zaman grafiği karşılaştırıldığında, C_{maks} değerine 1M *ad* ve 13M *ad* gruplarında 24. saatte ulaşılmıştır. 12. saatte ($p=0,0105$) everolimus konsantrasyonlarında bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu halde C_{maks} değerleri arasında farklılık gözlenmemiştir (Şekil 40A).

Ad libitum dişi gruplarında t_{maks} ’ın farklı olduğu görülmektedir; sırasıyla 2 ve 0,5’dir. 2. ($p=0,0256$) ve 24. ($p=0,0165$) saatlerde everolimus timus konsantrasyonları 1F *ad* grubunda 13F *ad*’a göre istatistiksel olarak daha yüksek olmasına rağmen C_{maks} değerleri arasında farklılık gözlenmemiştir (Şekil 40B).

Timus konsantrasyon-zaman garfikleri cinsiyete bağılı olarak incelendiğinde 1M ad timus everolimus konsantrasyonlarının 1. ($p=0,391$), 12. ($p=0,0007$) ve 24. ($p=0,0003$) saatlerde 1F ad grubundan yüksek olduğu saptanmıştır. 13M ad ve 13F ad gruplarının konsantrasyon-zaman grafikleri karşılaştırıldığında 13M ad'ın 2. ($p=0,0003$) ve 24. ($p<0,0001$) saatlerde 13F ad'a göre yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 41: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen timus AUC₀₋₂₄ verileri. İki-yönlü ANOVA, *, $p<0,05$; ###, $p<0,001$. *, ZT1 vs ZT13, #, erkek vs dişi. Ort $\pm$ SEM.

Tablo 20: Everolimusun timus dokusuna ait farmakokinetik verileri

	1M ad	13M ad	1F ad	13F ad
t_{maks} (sa)	24	24	2	0.5
C_{maks} (µg/g)	260,067	126,047	38,273	15,591
$\pm$ SEM	$\pm 65,877$	$\pm 25,631$	$\pm 15,309$	$\pm 0,982$
AUC₀₋₂₄ (µg.sa/g)	4534	1640	507,6	253,8
$\pm$ SEM	± 1097	$\pm 324,5$	$\pm 188,4$	$\pm 51,35$

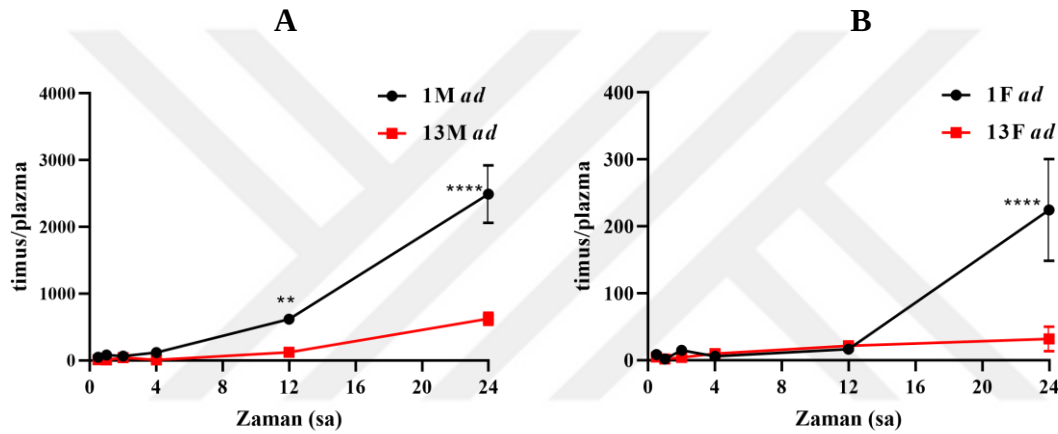
t_{maks}: Maksimum plazma konsantrasyonunun izlendiği zaman. C_{maks}: Maksimum plazma konsantrasyonu. AUC₀₋₂₄: eğri altında kalan alan t: 0-24

Everolimus timus AUC₀₋₂₄ değerlerine bakıldığında uygulama zamanına ve cinsiyete bağılı farklılık olduğu gözlenmektedir. 1M ad grubu AUC₀₋₂₄ değeri, 13M ad grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$), 1M ad timus AUC₀₋₂₄ değeri 13M ad'a göre 2,8 kat daha yüksektir. 1M ad, 1F ad'ye göre de anlamlı derecede yüksektir ($p<0,001$), 1M ad timus AUC₀₋₂₄ değeri 1F ad'a göre 8,9 kat daha yüksektir. Tüm grupların (Şekil 41) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ($p=0,00154$), Cinsiyet ($p=0,0003$) ve ZT* Cinsiyet ($p=0,037$) fonksiyonları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4.2.5.1. Timus/Plazma Oranları

Timus/plazma oranlarına bakıldığında (Şekil 42), ilk saatten itibaren ZT1 gruplarının ZT13'e göre daha yüksek olduğu bulunmuştur.

1M *ad* ve 13M *ad* gruplarında timus dağılımları arasında 12. ($p<0,01$) ve 24. ($p<0,0001$) saatlerde anlamlı fark gözlenmiştir. 1M *ad* ve 13M *ad* arasındaki fark ZT ($p<0,0001$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 42A). 1F *ad* ve 13F *ad* grupları karşılaştırıldığında timus dağılımları arasında 24. saatte anlamlı fark gözlenmiştir, 1F *ad* daha yüksek bulunmuştur ($p<0,0001$). 1F *ad* ve 13F *ad* arasındaki fark ZT ($p=0,0027$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 42B).



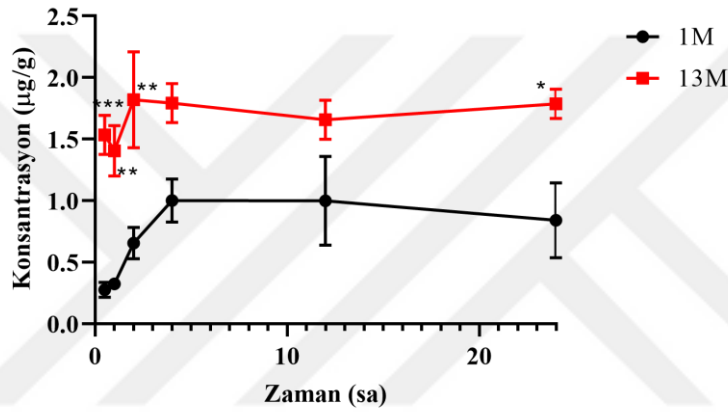
Şekil 42: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen timus ve plazma konsantrasyonlarından hesaplanan timus/plazma oranları. İki-yönlü ANOVA; **, $p<0,01$; ****, $p<0,0001$. Ort $\pm$ SEM.

Ad libitum gruplarının timus dağılımları cinsiyete bağlı olarak karşılaştırıldığında; 1M *ad* grubunun 1F *ad*'a göre timus dağılımının yüksek olduğu bulunmuştur. 12. ve 24. saatte 1M *ad* anlamlı derecede yüksektir ($p<0,001$). 1M *ad* ve 1F *ad* arasındaki fark Cinsiyet ($p<0,0001$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 13M *ad* ve 13F *ad* grupları karşılaştırıldığında ise, 12. ($p<0,05$) ve 24. ($p<0,0001$) saatte 13M timus dağılımının 13F'ye göre anlamlı olarak yüksek olduğu görülmektedir. 13F *ad* ve 13M *ad* arasındaki fark Cinsiyet ($p<0,0001$) fonksiyonu olarak iki-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

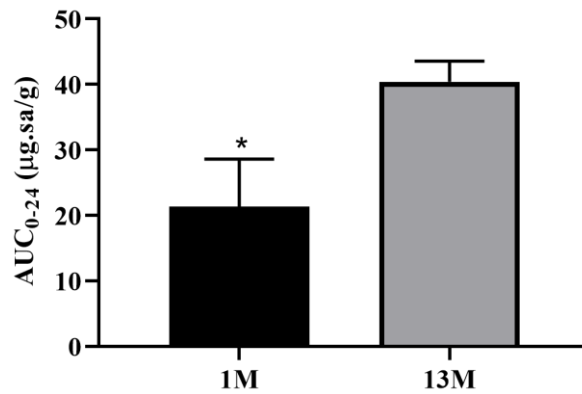
Tüm *ad libitum* grupları beraber değerlendirildiğinde Cinsiyet ($p<0,0001$), ZT ($p<0,0001$), ZT*Cinsiyet ($p<0,0001$), ZT*Cinsiyet*Zaman ($p<0,0001$) fonksiyonları üç-yönlü ANOVA ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4.2.6. Everolimusun Testis Konsantrasyon Verileri ve Farmakokinetik Parametreleri

Everolimusun oral yoldan uygulanmasını takiben testis dokusunda *ad libitum* grubu hayvanlardan everolimus tayin edilmiştir. Daha önceki çalışmamızda everolimusun zamana bağlı toksisitesi *ad libitum* beslenen hayvanlarda değerlendirildiği için sadece *ad libitum* erkek farelerin testis everolimus konsantrasyonları çalışılmıştır. C_{maks} ve t_{maks} değerleri uygulama zamanına göre değişmektedir. Her iki grupta da everolimus testis konsantrasyonu zamana bağlı artmış ve 4. saatten sonra sabit kalmıştır. Testis dokusuna ait everolimusun tüm farmakokinetik parametreleri Tablo 21’de sunulmuştur.



Şekil 43: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen erkek farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen testis konsantrasyon-zaman grafikleri. İki-yönlü ANOVA; *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$. Ort $\pm$ SEM.



Şekil 44: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen erkek farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen testis AUC₀₋₂₄ verileri. Student t-test; *, $p<0,05$. Ort $\pm$ SEM.

1M *ad* ve 13M *ad* gruplarının testis everolimus konsantrasyon-zaman grafiği karşılaştırıldığında, C_{maks} değerine 1M *ad* ve 13M *ad* gruplarında sırasıyla 4. ve 2.

saatlerde ulaşılmıştır. 0,5., 1., 2. ve 24. saatlerde everolimus konsantrasyonlarında bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$). Bu grupların testis everolimus konsantrasyon-zaman grafikleri (Şekil 43) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($<0,0001$).

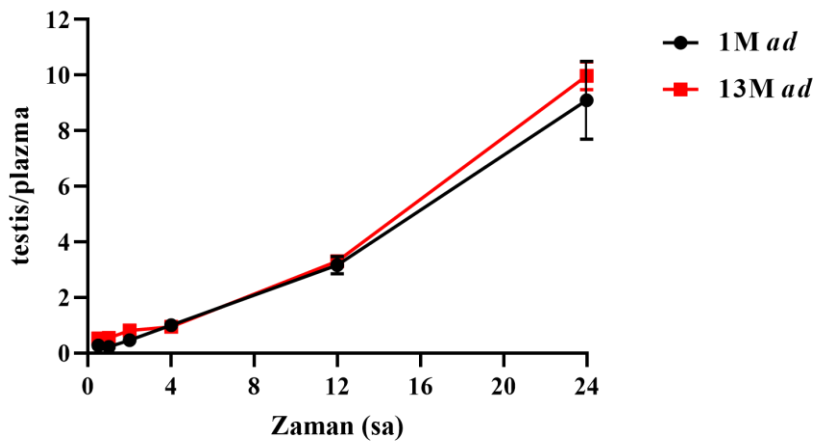
Everolimus testis AUC_{0-24} değerlerine bakıldığında zamana bağlı farklılık olduğu gözlenmektedir. 1M *ad* ve 13M *ad* gruplarının testis AUC_{0-24} değerlerinin Student t-test ile karşılaştırılması sonucu; 13M *ad* grubu 1M *ad* grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p=0,0427$) (Şekil 44).

Tablo 21: Everolimusun testis dokusuna ait farmakokinetik verileri

	1M <i>ad</i>	13M <i>ad</i>
t_{maks} (sa)	4	2
C_{maks} ($\mu\text{g/g}$)	1,001	1,820
$\pm$ SEM	$\pm 0,176$	$\pm 0,390$
AUC_{0-24} ($\mu\text{g.sa/g}$)	21,34	40,41
$\pm$ SEM	$\pm 7,27$	$\pm 3,17$

4.2.6.1. Testis/Plazma Oranları

Testis/plazma oranlarına bakıldığında (Şekil 45), testis dağılım profillerinin her iki saatte de benzediği görülmektedir. 13 *ad*'de 24. saatte hafif bir yükselme olsa da istatistiksel olarak anlam oluşturmamıştır. 1M *ad* ve 13M *ad* arasındaki fark iki-yönlü ANOVA ile değerlendirildiğinde istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır ($P>0,05$).



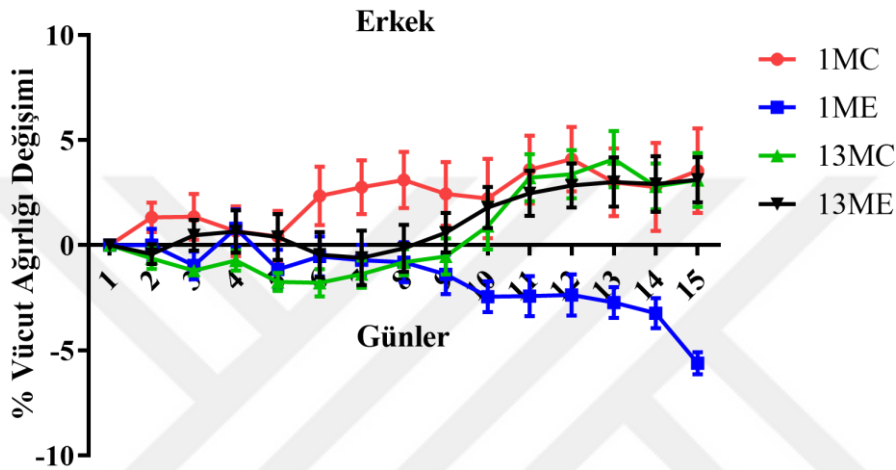
Şekil 45: ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen farelere oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulanmasını takiben elde edilen testis ve plazma konsantrasyonlarından hesaplanan testis /plazma oranları. İki-yönlü ANOVA. Ort $\pm$ SEM.

4.3. Everolimusun Kronofarmakokinetiği (Tekrarlı Doz Uygulama)

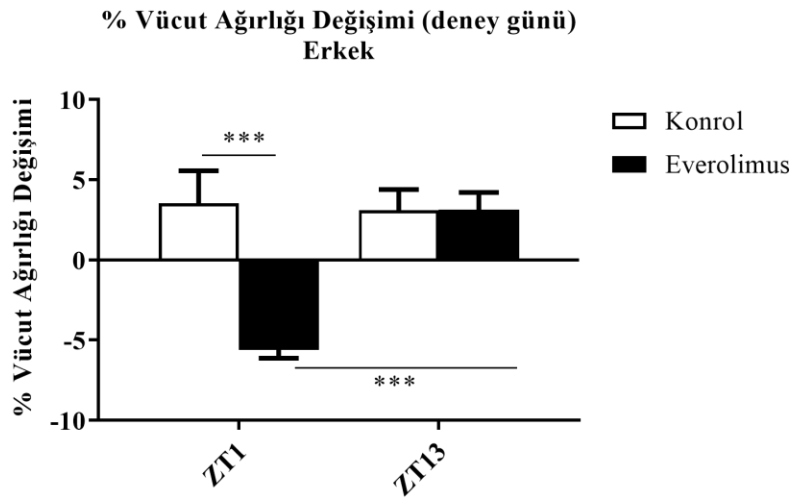
4.3.1. Deney hayvanlarının günlük ağırlık değişimi

Everolimus (5 mg/kg) veya sıvağ dişi ve erkek farelere 14 gün boyunca uygulanmış ve her gün farelerin vücut ağırlığı takip edilmiştir. Vücut ağırlık değişimi ilk güne kıyasla hesaplanmıştır. Kontrol ve everolimus uygulanmış dişi ve erkek farelerin vücut ağırlık değişimi Şekil 46 ve Şekil 47’de verilmiştir.

A.



B.



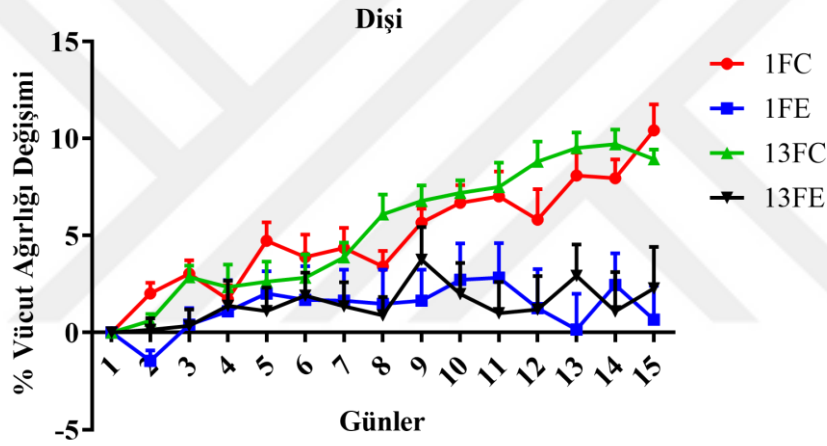
Şekil 46: ZT1 ve ZT13 grubu erkek farelerde everolimus uygulamasının başlangıç gününe kıyasla % vücut ağırlığı değişimleri A. Günlük değişim B. Everolimus uygulamasının başlangıç gününe kıyasla sonuncu gün (deney günü) değişim farkı. İki-yönlü ANOVA; ***, $p < 0,001$, Ort $\pm$ SEM.

Şekil 46A’da görüldüğü gibi everolimus uygulanan ZT1 grubu erkek farelerde zamana bağlı olarak %5,6 ağırlık kaybı yaşanmıştır. ZT13 grubunda ise zamana bağlı olarak ağırlık kaybı gözlenmemiştir. 13ME grubu kontrol gruplarına benzer vücut

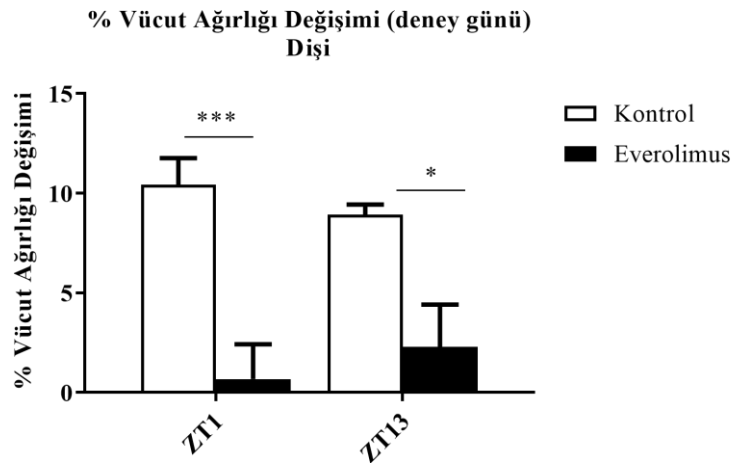
ağırlığı değişim profili göstermiştir. Şekil 46B’de everolimus uygulamasının son gününe ait (15. gün) vücut ağırlık değişim yüzdelere bakıldığında; 1ME (%-5,6) grubunda 1MC (%+3,5) ve 13ME (%+3,1) grubuna kıyasla ağırlık kaybı olduğu görülmektedir ($p<0,001$).

Şekil 47A’da görüldüğü gibi everolimus uygulanan ZT1 ve ZT13 grubu dişi farelerde zamana bağlı olarak ağırlık kaybı yaşanmamıştır. Ancak everolimus uygulanan dişi farelerde her iki grupta da ağırlık artışı kontrol grubuna göre durmuştur. Şekil 47B’de everolimus uygulamasının son gününe ait vücut ağırlık değişim yüzdelere bakıldığında; 1FE grubunda kontrolüne kıyasla ağırlık kaybının, 13FE grubuna göre daha fazla olduğu görülmektedir (1FE; $p<0,001$ ve 13FE; $p<0,05$).

A.



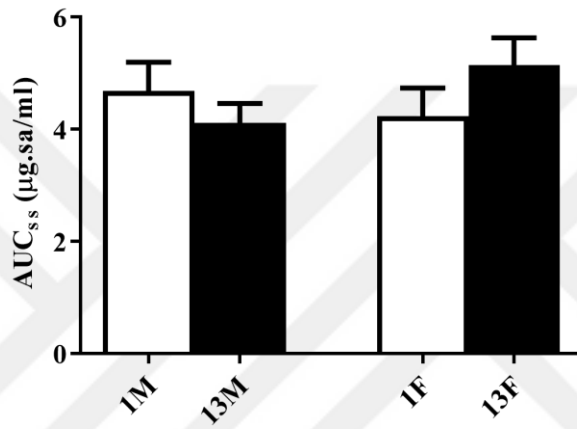
B.



Şekil 47: ZT1 ve ZT13 grubu dişi farelerde everolimus uygulamasının başlangıç gününe kıyasla % vücut ağırlığı değişimleri. A. Günlük değişim B. Everolimus uygulamasının başlangıç gününe kıyasla sonuncu gün (deney günü) değişim farkı. İki-yönlü ANOVA; * $p<0,05$; ***, $p<0,001$, Ort $\pm$ SEM.

4.3.2. Plazma everolimus kararlı-durum düzeyi

14 gün boyunca oral yoldan 5 mg/kg everolimus uygulaması sonrası 15. günde toplanan plazmalardan everolimus tayin edilmiştir. Farelerin sakrifikasyon işlemi son everolimus uygulamasından yaklaşık 24 saat sonra yapılmıştır. Kararlı durum çukur konsantrasyonu son uygulamadan yaklaşık 24 saat sonrasına denk gelmektedir (everolimus günde tek doz halinde kullanılır). Erkek farelerde ZT1 zamanında everolimusun kararlı durum AUC değeri (AUC_{ss}) daha yüksektir. Dişi farelerde ise AUC_{ss} , ZT13'te daha yüksek bulunmuştur. Ancak her iki grupta da istatistiksel olarak anlamlılık saptanmamıştır (Şekil 48).



Şekil 48: ZT1 ve ZT13 zamanlarında dişi ve erkek farelere 14 gün boyunca 5 mg/kg everolimus uygulaması sonrası ölçülen kararlı durum plazma everolimus konsantrasyonlarından elde edilen AUC_{ss} . İki-yönlü ANOVA, Ort $\pm$ SEM.

4.3.3. Zamana bağlı subakut everolimus uygulamasının P-glikoprotein mRNA ve protein düzeylerine etkisi

14 gün boyunca oral 5 mg/kg everolimus uygulaması sonrası 15. günde deney hayvanları sakrifiye edilmiştir. Karaciğer ve intestinal mukozadan RNA ve protein izolasyonu yapılmıştır. P-gp ekspresyonu mRNA (Abcb1a ve Abcb1b) ve protein düzeyleri açısından belirlenmiş ve zamana ve cinsiyete bağlı olarak everolimus uygulamasının P-gp ekspresyonu üzerindeki rolü değerlendirilmiştir.

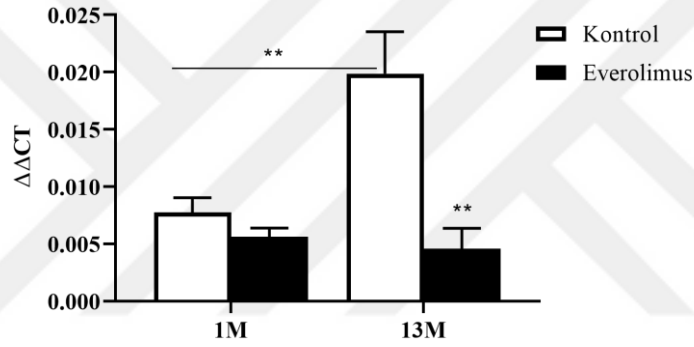
4.3.3.1. Zamana bağlı subakut everolimus uygulamasının karaciğerde abcb1a/b mRNA ve P-glikoprotein düzeylerine etkisi

14 gün boyunca oral 5 mg/kg everolimus uygulaması sonrasında Abcb1a mRNA ekspresyonu erkek ve dişi fare karaciğerinde değerlendirilmiştir (Şekil 49). Karaciğerde Abcb1a ekspresyonu kontrol gruplarında incelendiğinde; 13MC grubunda 1MC grubuna göre yüksek olduğu görülmektedir. Everolimus uygulaması ile ise ZT1'de

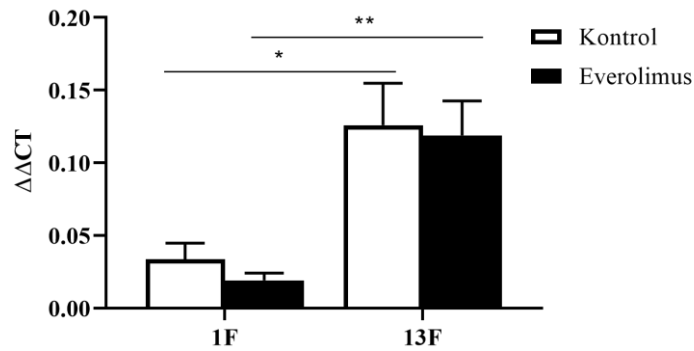
değişiklik olmazken ZT13'te everolimus Abcb1a ekspresyonunu azaltmıştır. Bu grupların (Şekil 49A) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ($p=0,0161$), Tedavi ($p=0,0005$) ve ZT*Tedavi ($p=0,0053$) fonksiyonları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Dişilerde karaciğer Abcb1a ekspresyonu hem kontrol hem everolimus gruplarında zamana bağlı fark göstermektedir. Ancak everolimusun karaciğerde Abcb1a ekspresyonu üzerinde etkisi olmamıştır. Abcb1a ekspresyonu hem kontrol hem everolimus gruplarında ZT13'te ZT1'e göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Dişi grupların (Şekil 49B) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ($p<0,0001$) fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

A.



B.

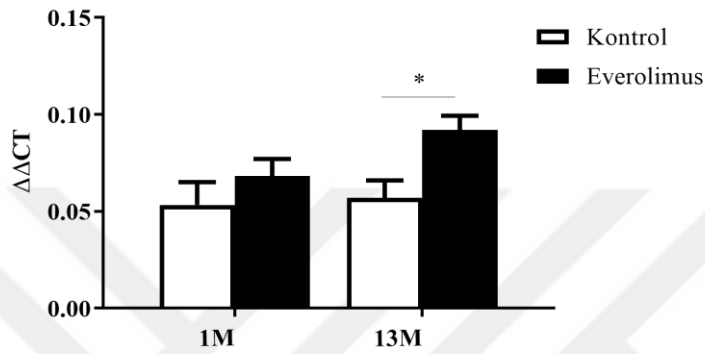


Şekil 49: ZT1 ve ZT13 zamanında everolimus uygulanmış veya kontrol grubu erkek (A) ve dişi (B) farelerde karaciğer Abcb1a mRNA düzeyleri. İki-yönlü ANOVA; * $p<0,05$; **, $p<0,01$; Ort $\pm$ SEM.

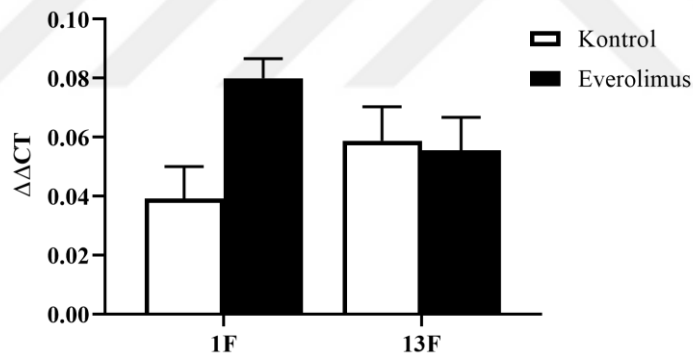
14 gün süreyle 5 mg/kg everolimus uygulaması sonrasında Abcb1b mRNA ekspresyonu erkek ve dişi fare karaciğerinde değerlendirilmiştir (Şekil 50). Karaciğerde Abcb1b ekspresyonu kontrol gruplarında incelendiğinde; erkek farelerde everolimsu uygulamsını takiben Abcb1b ekspresyonu kontrole göre her iki zamanda da artmıştır.

Ancak ZT13'te anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Bu grupların (Şekil 50A) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu Tedavi ($p=0,0144$) fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Dişilerde karaciğer Abcb1b ekspresyonu 1FE grubunda kontrolüne göre artmıştır. ZT13'te ise değişiklik görülmemiştir. Bu grupların (Şekil 50B) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu istatistiksel anlamlılık bulunmamıştır.

A.

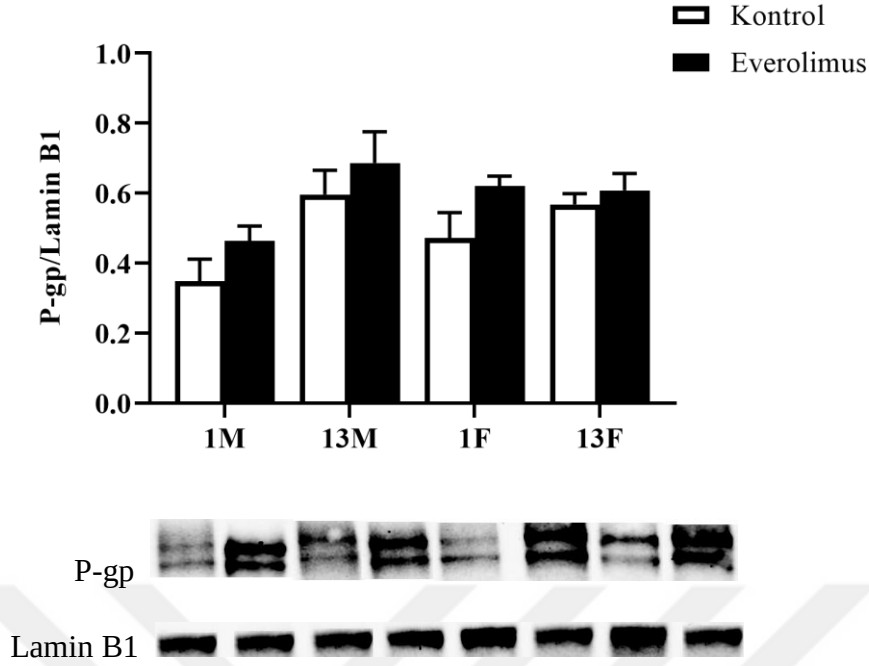


B.



Şekil 50: ZT1 ve ZT13 zamanında everolimus uygulanmış veya kontrol grubu erkek (A) ve dişi (B) farelerde karaciğer Abcb1b mRNA düzeyleri. İki-yönlü ANOVA; * $p<0,05$; Ort $\pm$ SEM.

Everolimusun karaciğerde P-gp protein ekspresyonu üzerine etkisi incelendiğinde tüm gruplarda everolimus uygulamasının P-gp ekspresyonunu arttırdığı görülmektedir. Tüm grupların (Şekil 51) üç-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ($p=0,0018$), Tedavi ($p=0,0221$) ve ZT*Cinsiyet ($p=0,247$) fonksiyonları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Sadece erkek gruplarının iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ($p=0,0026$) fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, sadece dişi gruplarının iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı değildir.



Şekil 51: ZT1 ve ZT13 zamanında everolimus uygulanmış veya kontrol grubu erkek ve dişi farelerde karaciğer P-glikoprotein protein ekspresyonu düzeyleri (n=5-8). Üç-yönlü ANOVA, Ort $\pm$ SEM.

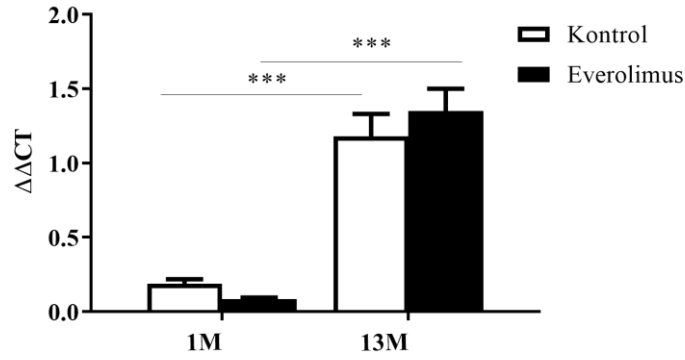
4.3.3.2. Zamana bağlı subakut everolimus uygulamasının ileumda abcb1a/b mRNA ve P-glikoprotein düzeylerine etkisi

14 gün 5 mg/kg everolimus uygulaması sonrasında Abcb1a mRNA ekspresyonu erkek ve dişi fare ileum mukozasında değerlendirilmiştir (Şekil 52).

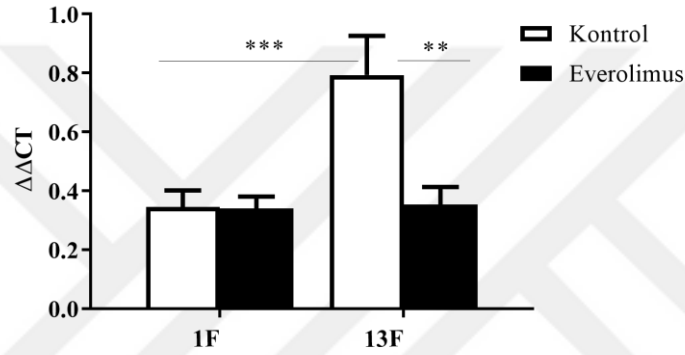
Erkek farelerde ileum Abcb1a ekspresyonu hem kontrol hem everolimus gruplarında zamana bağlı fark göstermektedir. Ancak everolimusun ileum Abcb1a ekspresyonu üzerinde etkisi olmamıştır. Abcb1a ekspresyonu hem kontrol hem everolimus gruplarında ZT13'te ZT1'e göre daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$). Tüm grupların (Şekil 52A) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ($p < 0,0001$) fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Dişilerde ileum Abcb1a ekspresyonu incelendiğinde; kontrol gruplarında 13FC'nin 1FC'ye göre anlamlı derece yüksek olduğu görülmektedir ($p < 0,001$). Everolimus uygulaması ile ise ZT1'de değişiklik olmazken ZT13'te everolimus Abcb1a ekspresyonunu azaltmıştır ($p < 0,01$). Bu grupların (Şekil 52B) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ($p = 0,0082$), Tedavi ($p = 0,0106$) ve ZT*Tedavi ($p = 0,012$) fonksiyonları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

A.



B.

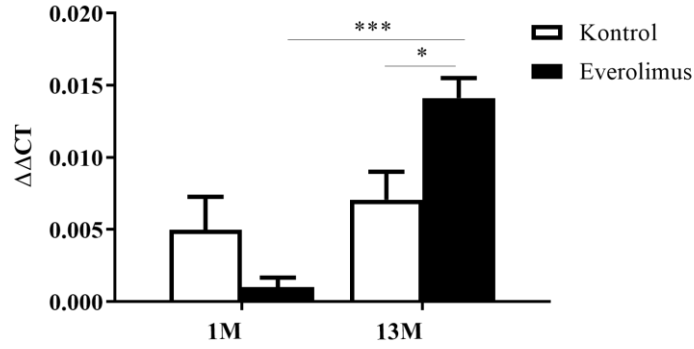


Şekil 52: ZT1 ve ZT13 zamanında everolimus uygulanmış veya kontrol grubu erkek (A) ve dişi (B) farelerde ileum Abcb1a mRNA düzeyleri. İki-yönlü ANOVA; ** $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, Ort $\pm$ SEM.

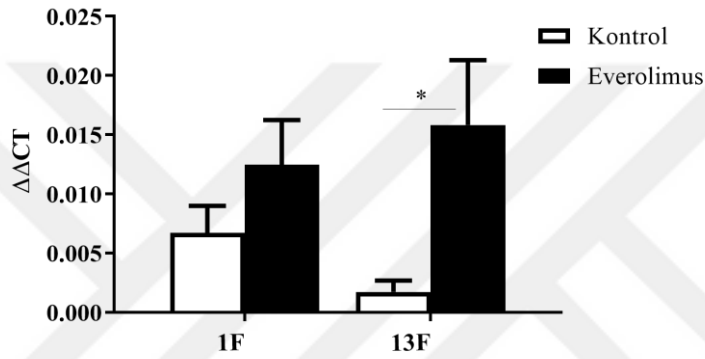
14 gün 5 mg/kg everolimus uygulaması sonrasında Abcb1b mRNA ekspresyonu erkek ve dişi fare ileum dokusunda değerlendirilmiştir (Şekil 53). İleumda Abcb1b ekspresyonu erkek hayvanlarda kontrol gruplarında zamana bağlı fark göstermezken everolimus gruplarında ZT13'te daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$). ZT13'te kontrolüne göre de everolimus Abcb1b ekspresyonunu artırmıştır ($p < 0,05$). Tüm grupların (Şekil 53A) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ($p = 0,0006$) ve ZT*Tedavi ($p = 0,0067$) fonksiyonları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Dişilerde ileum Abcb1b ekspresyonu incelendiğinde; everolimusun her iki zamanda da Abcb1b ekspresyonunu artırdığı görülmektedir, ancak ZT13 gruplarında anlamlı fark olmuştur ($p < 0,05$). Bu grupların (Şekil 53B) iki-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu Tedavi ($p = 0,0097$) fonksiyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

A.

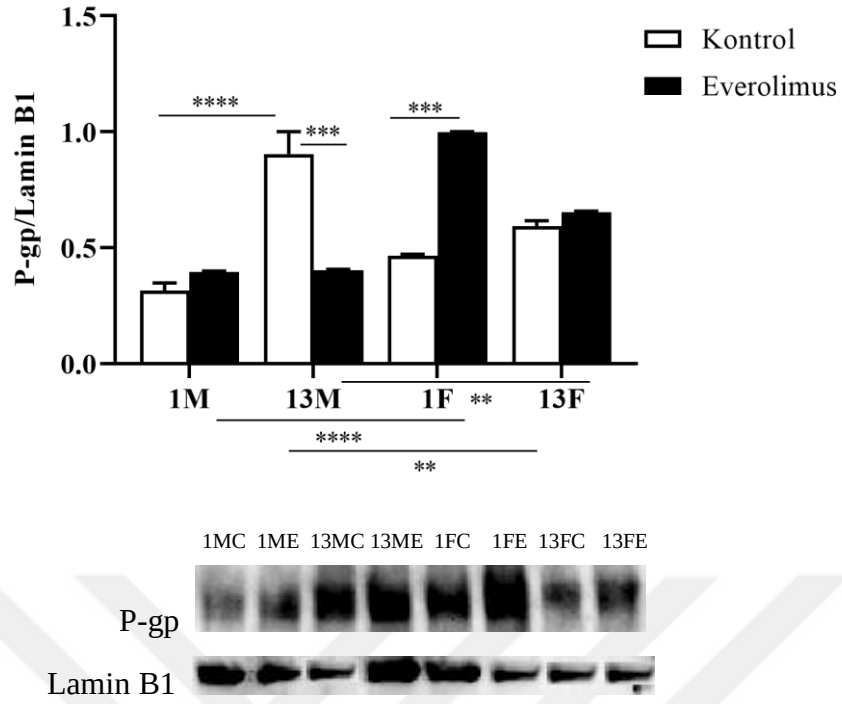


B.



Şekil 53: ZT1 ve ZT13 zamanında everolimus uygulanmış veya kontrol grubu erkek (A) ve dişi (B) farelerde ileum Abcb1b mRNA düzeyleri. İki-yönlü ANOVA; * $p<0,05$; ***, $p<0,001$, Ort $\pm$ SEM.

Everolimusun ileumda P-gp protein ekspresyonu üzerine etkisi incelendiğinde kontrol gruplarında P-gp ekspresyonunun ZT13'te daha yüksek olduğu gözlenmiştir, erkek gruplarında daha bariz ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,0001$). Everolimus uygulamasının dişi ve erkek farelerde P-gp ekspresyonunu farklı şekilde etkilediği görülmektedir. Everolimus uygulaması ZT13 erkek farelerde ileumda P-gp ekspresyonunu azaltmış ($p<0,0001$), ZT1 dişi farelerde artırmıştır ($p<0,0001$). Tüm grupların (Şekil 54) üç-yönlü ANOVA ile karşılaştırılması sonucu ZT ($p=0,0064$), Cinsiyet ($p=0,0002$), ZT*Tedavi ($p<0,0001$), Cinsiyet*Tedavi ($p<0,0001$) ve Cinsiyet*ZT ($p<0,0001$) fonksiyonları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tedavi fonksiyonu tek başına anlamlı değildir.



Şekil 54: ZT1 ve ZT13 zamanında everolimus uygulanmış veya kontrol grubu erkek ve dişi farelerde ileum P-glikoprotein protein ekspresyonu düzeyleri (n=5-8 örnek birleştirildi). Üç-yönlü ANOVA; **p<0,01; ***, p<0,001; **** p<0,0001; Ort ± SEM.

5. TARTIŞMA

Fizyolojik fonksiyonlardan, hastalık durumlarına kadar vücudumuzdaki pek çok süreç, çevresel uyarıcıların düzenlemesi ve sirkadiyan saat sisteminin kontrolü altında ritmik bir devinim göstermektedir. Doğal olarak da, hastalık durumlarında uygulanacak tedavi gerek hastalığın ritminden ve gerekse ilacın farmakodinamiği ve farmakokinetiğindeki zaman boyutlu değişikliklerden etkilenmektedir. Sirkadiyan saat sistemi, memelilerde, ilaç metabolizması ve detoksifikasyonu, hormon sekresyonu, hücre döngüsü olayları, DNA onarımı ve anjiyojenez gibi pek çok önemli biyolojik fonksiyonu kontrol etmektedir^{2,160}. Son 10 yılda yapılan prelinik ve klinik çalışmalarda, pek çok vücut fonksiyonunda belirgin gün içi ritimlerin bulunduğu, ilaçların farmakokinetiğinin ve farmakodinamiğinin, bu ritimlere bağlı olarak ilacın veriliş zamanına göre değişebileceği konusunda yeterli kanıtlar ortaya konulmuştur^{2,25,160-162}. İlaçların farmakokinetik ve farmakodinamik parametrelerinde 24 saat boyunca gözlenen ritmik değişiklikler, dozlama zamanına bağlı olarak özellikle terapötik indeksi dar olan ve bireyler arası yüksek değişkenlik gösteren antikanser ilaçların farmakokinetiğini, hedef organ toksisitesini ve sitotoksik aktivitesini etkilemektedir. Antikanser ilaçların sağlıklı hücrelerdeki tolere edilebilirliği ve kötü huylu tümörlerdeki etkinliğinin ilaç uygulama zamanına bağlı olarak değişebileceği, hem deneysel modellerde hem de kanser hastalarında yapılan klinik çalışmalarla gösterilmiştir. İlaçlar, en iyi tolere edildikleri zamanda verildiklerinde, etkinliklerinin de arttığı görülmüştür^{2,19,25,27,88,124,163}. Özellikle yüksek toksisite potansiyeline sahip antikanser ilaçların en etkili olduğu ve/veya en az advers/toksik etki gösterdiği zamanda uygulanması ve bu uygulama zamanlarında ilaç farmakokinetiğinin bilinmesi önem taşımaktadır.

Everolimusun açlık-tokluk, cinsiyet ve uygulanma zamanına bağlı olarak farmakokinetiğini değerlendirdiğimiz bu çalışmamızda, everolimus kronotoksitesini incelediğimiz önceki çalışmamıza ait bulguların aydınlatılması hedeflenmiştir. Çalışmamızda, iki farklı sirkadiyan zamanda (ZT1 ve ZT13), açlık/tokluk durumunda, dişi/erkek farelere uygulanan antikanser ve immunosupresan etkili bir ilaç olan everolimusun, uygulanma zamanına bağlı olarak farmakokinetik parametrelerdeki değişimin araştırılması hedeflenmiştir. Bu kapsamda, aç bırakılmış veya *ad libitum* beslenen (tok) dişi/erkek C57BL/6J farelere, oral yoldan 5 mg/kg everolimus, günün iki

farklı zamanında uygulanmış ve ilaç uygulaması sonrası 6 farklı zaman noktasında kan ve doku örnekleri toplanmıştır. Plazma, karaciğer, ileum, timus ve testis dokularında everolimusun farmakokinetik parametreleri hesaplanmıştır. Ayrıca, 5 mg/kg dozda everolimusun iki farklı sirkadiyan zamanda (ZT1 ve ZT13), dişi ve erkek farelere 14 gün boyunca uygulanmasının ardından efluks proteini P-gp'nin mRNA ve protein ekspresyonları üzerine etkisi incelenmiştir. 14 gün boyunca farelere uygulanan everolimusun plazmadan tayini yapılarak kararlı durum çukur düzeyi de zamana bağlı olarak değerlendirilmiştir.

Araştırma grubumuzun önceki çalışmasında^{20,21}, everolimusun sağlıklı farelerde, sirkadiyan saat sisteminin fizyolojik biyobelirteçleri olan vücut sıcaklığı ve lokomotor aktivite ritimleri üzerine cinsiyet, doz ve uygulama zamanına bağlı etkileri ve kronotoksitesi incelenmiştir. Bu kapsamda, sağlıklı C57BL/6J dişi ve erkek farelere telemetrik sensör implante edilmiş, everolimus oral yoldan iki farklı dozda (erkeklerde 5 ve 10 mg/kg; dişilerde 15 ve 20 mg/kg) dört farklı sirkadiyan zamanda (ZT1, ZT7, ZT13 veya ZT19) 14 gün boyunca uygulanmıştır. Bu çalışma ile en iyi tolere edilen zaman, en toksik zaman ve en uygun dozlar belirlenmiş; akabinde bulgularımız bir kronotoksite çalışması ile desteklenmiştir. Subakut toksite çalışmasında everolimus, erkek (5 mg/kg dozda) ve dişi (15 mg/kg dozda) farelere oral yoldan ZT1-en kötü tolere edilen- ve ZT13-en iyi tolere edilen- zamanlarda 28 gün boyunca uygulanmış; ilaca bağlı kilo kaybı, biyokimyasal, hematolojik ve immunolojik parametrelerdeki değişiklikler ile organ toksitesi araştırılmıştır. Genel toksite bulgularına ve everolimusun her iki ritim üzerindeki etkilerine bakıldığında, hem dişilerde hem de erkeklerde everolimus tolere edilebilirliğinin ZT13'te en iyi olduğu görülmüştür. Ritim parametrelerinde en ciddi değişiklikler, en toksik zaman ZT1'de everolimus uygulamasında gözlenmiştir. Everolimusun en az toksik etki gösterdiği zaman olan ZT13'te uygulanması ile sirkadiyan fizyoloji çıktılarında da en az değişiklikler görülmüştür. Everolimusun zamana bağlı etkilerinin güçlü bir şekilde görüldüğü organ timustur. Everolimus uygulaması ile her iki ZT'de de timusta kortikal atrofi gözlenmiş ve timus ağırlıkları kontrol farelere göre düşük bulunmuştur. Ancak histolojide ve organ ağırlığında gözlenen bu fark ZT1'de daha fazladır. Aynı zamanda; total lökosit, total lenfosit sayıları ve T yardımcı (+ CD4), B (+ CD19) hücrelerinin mutlak değerleri kontrol grubuna kıyasla ZT1'de anlamlı derecede azalmıştır, ancak ZT13'te değişiklik olmamıştır. Everolimus toksisitesinden zamana bağlı olarak etkilenen bir diğer organ da

testislerdir. Testis ağırlığı ve testisin morfolojisinde histopatolojik değişiklikler kontrol gruplarına kıyasla en fazla ZT1 gruplarında gözlenmiştir. Ana periferik saatlerden karaciğerde de everolimusun toksisitesine bağlı olarak ZT1’de total kolesterol daha yüksek bulunmuştur^{20,21}. Bu farklılıklardan yola çıkarak everolimusun zamana bağlı gözlenen toksik etkilerinin ilacın farmakokinetiğine bağlı olup olmadığının araştırılması bu tezin ana amacıdır. Ek olarak, açlık/tokluk durumunun, cinsiyet farkının ve efluks taşıyıcısı P-gp’nin sirkadiyan ritmik ekspresyonuna bağlı farklılıkların everolimus kronofarmakokinetiğine etkileri de bu tez çalışması kapsamında araştırılmıştır. Literatüre bakıldığında, tümör taşıyan veya sağlıklı farelerde everolimus farmakokinetiğinin incelendiği çeşitli çalışmalar mevcuttur^{132,134,137}. Ancak everolimus farmakokinetiğinin uygulama zamanına göre değerlendirildiği sadece tek bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada everolimus, Balb/c soyu erkek farelere 20 mg/kg dozda saat 07:00’da (ZT0-gündüz) ve 19:00’da (ZT12-gece) i.v. yoldan uygulanmıştır¹³. Everolimus oral olarak kullanılan bir ilaç olup, bahsedilen çalışmalarda ilaç farmakokinetiğine etki edebilecek faktörler olan zaman, cinsiyet ve uygulama zamanı bir arada değerlendirilmemiştir. Bu şekilde tasarlanmış bir çalışma literatürde bulunmadığından çalışmamız özgünlük arz etmektedir.

Farmakokinetik çalışma öncesinde aydınlık/karanlık döngüsü değiştirilen hayvanlarda senkronizasyonu kontrol etmek için hem ZT1 hem ZT13 gruplarında vücut sıcaklıkları ölçülmüştür. Vücut sıcaklığı, sirkadiyan ritim gösteren fizyolojik bir süreçtir. Uzun yıllardır sirkadiyan ritmin biyolojik belirteci olarak lokomotor aktivite ile beraber kullanılmaktadır^{164,165}. Bu çalışmada da gece aktif (nokturnal) olan farelerin karanlık periyodunda, beklendiği gibi vücut sıcaklığının artış gösterdiği saptanmıştır. Erkek ve dişi farelere ait ZT1 ve ZT13 zamanında yapılan ölçümlerde vücut sıcaklıklarının aktivite yani karanlık periyodunda farelerin dinlenme periyoduna göre (gündüz) daha fazla olduğu görülmektedir (Tek yönlü ANOVA ($p<0,0001$) ve Fourier ($p<0,0001$)). Bu bulgu bize laboratuvarında farelerin sirkadiyan senkronizasyonunun uygun olarak yapıldığını göstermektedir.

Tek doz farmakokinetik çalışmasında plazma, karaciğer, ileum, timus ve testis dokularından everolimus tayini yapılmıştır. Çalışmada karaciğer ve bağırsak dokularının seçilmesinin amacı; bu organların everolimus farmakokinetiğini sirkadiyan ritme bağlı olarak etkileyebilecek ana organlar olmasıdır. Everolimus, ilaç absorpsiyonunda ve eliminasyonunda önemli rol oynayan ve ritmik olarak eksprese edilen P-gp’nin bir

substratı ve orta derecede inhibitörüdür. Aynı zamanda sirkadiyen ritim gösteren CYP3A4'ün de bir substratıdır. Everolimus başlıca bağırsaklarda ve daha çok karaciğerde CYP3A4 ile metabolize edilmekte ve P-gp ile hücre dışına atılmaktadır^{14,15,166,167}. Timus ve testis dokularının seçilme nedeni ise; daha önceki çalışmamızda zamana bağlı toksisite gördüğümüz dokular olmasından kaynaklanmaktadır^{20,21}. Everolimusun toksik etkileri, immünosupresan etkisinden dolayı, çoğunlukla lökositler ve lenfatik organlar (timus, dalak, lenf nodülleri) üzerinde görülmektedir. Ayrıca testis, ovaryum ve uterus, gibi üreme organları da everolimustan etkilenmektedir^{15,129,167-169}.

Çalışmamızda everolimusun 5 mg/kg dozda, oral yoldan dişi ve erkek farelere uygulanmasını takiben plazma verileri incelendiğinde tüm gruplarda t_{maks} 0,5 ile 2. saatler arasında görülmüştür, ancak gruplar arasında zaman, cinsiyet ve açlık/tokluk durumuna bağlı farklılıklar bulunmaktadır. Absorpsiyon hızının t_{maks} 'ı etkilediği bilinmektedir¹⁷⁰. Sirkadiyan ritimler, ilaç absorpsiyonunu mide boşalma hızı, mide kan akımı ve motilite gibi fizyolojik fonsiyonları etkileyerek değiştirebilmektedir^{8,9,24}. Aktivite döneminde ilaç absorpsiyonu daha yüksek olmaktadır^{9,24,35}. Bu da *ad libitum*-erkek ve açlık-dişi gruplarındaki dinlenme döneminde (ZT1) gözlenen yüksek t_{maks} (2. sa) bulgumuzu ve aktivite döneminde (ZT13) gözlenen düşük t_{maks} 'ı (0,5-1. sa) açıklayabilmektedir. Plazma C_{maks} değerleri incelendiğinde, her grupta ZT13'te daha yüksek değerler ölçülmüştür. Tüm gruplar arasında en düşük plazma C_{maks} değeri 1M *ad* grubunda görülmüştür. 1M *ad* plazma C_{maks} değeri; ZT, cinsiyet ve açlık/tokluk durumuna bağlı olarak sırasıyla 13M *ad*, 1F *ad* ve 1M açlık gruplarının C_{maks} değerinden düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Tüm gruplarda plazma everolimus AUC_{0-24} ve AUC_{total} değeri ZT13'te ZT1'e göre daha yüksek olarak hesaplanmıştır (üç-yönlü ANOVA $p<0,05$). C_{maks} 'ta olduğu gibi AUC_{0-24} ve AUC_{total} 'nin en düşük değerleri, 1M *ad* grubunda görülmüştür. Birim zamanda belirli bir ilaçtan temizlenen plazma hacmini ifade eden plazma Cl/F verilerine bakıldığında, 1M *ad* Cl/F'nin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Cl/F değeri tüm gruplarda, ZT1'de ZT13'e göre daha yüksek bulunmuştur (üç-yönlü ANOVA $p<0,05$). Bu da birim zamanda plazmadan temizlenen everolimusun ZT1'de daha fazla olduğunu göstermektedir. Cinsiyete bağlı olarak da fark gözlenmiştir, erkeklerde dişilere göre Cl/F değeri daha yüksek bulunmuştur (üç-yönlü ANOVA $p<0,05$). Vd/F de ZT1'de daha yüksektir. Vd/F'nin yüksek olması özellikle 1M *ad* grubunda everolimusun plazma dağılımının yüksek olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda everolimusun 5 mg/kg dozda, oral yoldan dişi ve erkek farelere uygulanmasını takiben karaciğer farmakokinetik verileri incelendiğinde tüm gruplarda ZT1'de karaciğerde everolimus t_{maks} değerinin ZT13'e göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Dinlenme zamanında (ZT1) absorpsiyon hızındaki düşüş plazmada olduğu gibi karaciğerde de t_{maks} 'ı geciktirmiştir. Karaciğer everolimus C_{maks} ve AUC_{0-24} değerlerinin de tüm gruplarda ZT1'de ZT13'e oranla daha yüksek olduğu görülmektedir. Hem absorpsiyonun daha yavaş gerçekleşmesi hem de karaciğerde ilaç metabolizmasının dinlenme fazında (ZT1) yavaşlaması nedeniyle ZT1'de karaciğer everolimus dağılımının fazla olması açıklanabilmektedir^{2,8,9,24,55}. Doku dağılımının bir göstergesi olan, everolimus karaciğer ve plazma konsantrasyonlarının oranlanması ile bulunan karaciğer/plazma oranlarına bakıldığında ZT1 dişi grupları hariç, karaciğer/plazma oranı ZT1'de daha yüksek bulunmuştur. Karaciğer doku dağılımlarının ZT1'de daha yüksek olduğu bu veri ile de doğrulanmaktadır. Açlık gruplarının karaciğer/plazma oranlarına bakıldığında everolimus uygulama zamanına bağlı olarak oluşan farkın, bu gruplarda daha da belirgin olduğu görülmektedir. İlaç absorpsiyon ve metabolizmasının zamana bağlı etkisine besin alımının kısıtlanması da eklenince karaciğer everolimus dağılımının artışı söz konusu olmuş olabilir. Çünkü besin alımı everolimus biyoyararlanımını azaltabilmektedir^{12,15,127}.

İleum farmakokinetik verileri değerlendirildiğinde; everolimusun ileum konsantrasyon-zaman grafikleri ve AUC_{0-24} değerlerinin, uygulama zamanı, cinsiyet ve açlık/tokluk durumuna göre değiştiği görülmektedir. *Ad libitum* erkek ve dişi-açlık gruplarında everolimus ileum konsantrasyonları genel olarak ZT13'te daha yüksektir ($p<0,05$). Ancak zamana bağlı olarak görülen bu fark AUC_{0-24} değerlerinde gözlenmemiştir. Cinsiyete bağlı olarak ise ZT1-açlık grupları dışında dişilerde everolimus ileum konsantrasyonları daha yüksektir ($p<0,05$). Özellikle cinsiyete bağlı fark *ad libitum* gruplarında daha belirgindir, AUC_{0-24} her iki açlık/tokluk durumunda da dişilerde daha yüksektir ($p<0,05$). Açlık durumunda tüm gruplarda ileumda everolimus AUC_{0-24} değeri azalmıştır. Bu azalma ZT1 dişi gruplarında belirgindir, everolimus konsantrasyonları *ad libitum* grubunda daha yüksektir ($p<0,05$). AUC_{0-24} değerleri tüm gruplar için değerlendirildiğinde de uygulama zamanı değil, cinsiyet ve açlık/tokluk durumu fonksiyonları anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Okyar ve ark. tarafından çok yakında yayınlanan bir çalışmada P-gp ekspresyonu ve aktivitesi, P-gp substratı talinolol kullanılarak uygulama zamanına, cinsiyete ve açlık/tokluk durumuna göre

değerlendirilmiştir. İleum P-gp aktivitesinin mezor değeri erkeklerde dişilere göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak ZT15'te P-gp ekspresyonu dişilerde anlamlı derecede yüksektir¹⁷¹. P-gp ekspresyonunun yüksek olması everolimusun P-gp tarafından ileuma daha fazla atılacağını göstermektedir. Bu durum bizim bulgularımız ile uyumludur, everolimus AUC₀₋₂₄ değeri ileumda dişilerde daha yüksektir. Okyar ve ark.'ın çalışmasında açlık durumu P-gp aktivitesinin mezor değerini artırmış ve ritmisitesini engellemiştir¹⁷¹. Bu durum ise bizim bulgularımız ile çelişmektedir, çünkü bizim bulgularımızda açlık durumunda ileumda everolimus AUC₀₋₂₄ değeri azalmıştır.

Everolimusun timus dağılımına bakıldığında her iki cinsiyette de ZT1 zamanında AUC₀₋₂₄ daha yüksektir ($p<0,05$). Erkek gruplarında dişilere göre doku dağılımının anlamlı derecede yüksek olduğu görülmektedir ($p<0,05$). Everolimus timus dağılımındaki bu değişim daha önceki toksisite çalışmamız ile paralellik göstermektedir²¹. Toksisite çalışmasında farelerin everolimusu en kötü tolere ettiği zaman ZT1'dir. Erkekler dişilere göre everolimus toksisitesine daha duyarlı bulunmuştur. Timusta da hem organ ağırlık kaybı hem de histopatolojik olarak ZT1'de daha yüksek toksisite gözlenmiştir²¹. Timusta uygulama zamanına bağlı görülen toksisite, ZT1'de everolimusun dokuya dağılımının artmasıyla açıklanabilir.

Everolimusun testise dağılımı ise ZT13'te daha yüksek gözlenmiştir. Ancak her iki zamanda da testis everolimus konsantrasyonlarının diğer dokulara göre çok düşük olduğu görülmektedir. Everolimusun testise dağılımı testis-kan bariyeri ile engellenmiş olabilir¹⁷². Daha önceki çalışmamıza ait toksisite bulgularında testiste hem organ ağırlığı hem histolojik açıdan everolimusa bağlı toksisite gözlenmiştir²⁰. Bu durum ZT1'de daha barizdir. Uzun süreli kullanıma bağlı olarak toksistede artış gözlenmiş olabilir. Everolimusun üreme organlarında toksisitesi literatürde tanımlanmıştır^{15,127,169}.

Besinler; ilaçların farmakokinetiğini, mide boşalmasında gecikme, safra akışının uyarılması, gastrointestinal pH'taki ve lümen metabolizmasındaki değişiklikler veya ilaç ve besinlerin doğrudan etkileşimleri gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla etkileyebilir. Besinlerin ilacın farmakokinetiğini ne yönde etkileyeceği, ilacın fizikokimyasal özellikleri ile ilgilidir. Everolimus suda az çözünen ve membran geçirgenliği düşük olan bir ilaç etkin maddesidir (BCS sınıf IV). Bu özelliklere sahip ilaçlar, formülasyona göre sınıf II (düşük çözünürlük, yüksek permeabilite) veya sınıf III (yüksek çözünürlük, düşük permeabilite) olarak davranabilmektedir. Sınıf III ilaçlar besinlerden negatif olarak etkilenirler. Yani C_{maks} ve AUC açlık durumuna göre azalır, t_{maks} ise uzar¹⁷³.

Everolimusun da besinler ile alındığında C_{maks} ve AUC'sinin azaldığı ve t_{maks} 'ının uzadığı saptanmıştır^{174,175}. Bu çalışmamızda ad libitum beslenen erkek farelerde, açlık durumuna göre t_{maks} uzamış, C_{maks} ve AUC değeri azalmıştır. Aynı grup farelerde hepatik everolimus düzeyi de açlık durumunda yüksek bulunmuştur. Hepatik kan akımının besinlerle arttığı bilinmektedir, ancak bunun ilaç absorpsiyonu ve dağılımındaki önemi kanıtlanamamıştır¹⁷⁶. Ayrıca besinler everolimusun metabolizmasını Cyp3a4 ve P-gp'yi etkileyerek değiştirmiş olabilir¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Açlık durumunda everolimusun biyoyararlanımındaki bu artış sadece ZT1 grubu erkek farelerde görülmüştür. Bu durum ilaç metabolizmasının ZT13'te (aktivite fazı) ve erkekler göre dişilerde daha yüksek olması ile açıklanabilir^{62,180-183}. Besin alımının everolimus farmakokinetiğine etkisi ileum verilerine bakıldığında da görülmektedir. İleumda her grupta besin alımı ile, ileum everolimus düzeyi artmıştır. Besin etkisi ile emilemeyen/P-gp ile atılan fraksiyonun daha fazla olduğu görülmektedir. Bu da karaciğerdeki bulgular ile uyumludur.

Everolimus farmakokinetiğini etkileyebilecek bir diğer faktör cinsiyettir. Dişi ve erkek fizyolojisi arasındaki fark ilaç farmakokinetiğini çeşitli şekillerde etkileyebilmektedir. Örneğin dişilerde besinlerin gastrointestinal geçiş süresi daha uzundur, bu da everolimusun absorpsiyonunu azaltmaktadır. Bu durum ileumda emilmeyen everolimus miktarının dişilerde daha fazla olmasını açıklayabilir. Aynı zamanda CYP3A4 (farede Cyp3a11) aktivitesi dişilerde daha yüksektir^{182,183}, bu da yine karaciğer ve bağırsakta daha hızlı metabolize olmasına yol açacaktır. Hepatik P-gp ekspresyonunun insanda erkekte daha yüksek olduğu bilinmesine rağmen, fare çalışmalarında dişide daha yüksek ekspresyon gözlenmiştir¹⁷¹. Bu da yine everolimusa total maruziyetin dişide daha az olmasını açıklayabilir. Ancak çalışmamızda dişi ve erkek fareler arasındaki en büyük fark timus everolimus düzeylerinde görülmüştür. Everolimusun erkek farelerde timusa afinitesinin daha yüksek olduğu timus/plazma oranlarına bakıldığında net bir şekilde görülmektedir. Timus farmakokinetiğinde görülen bu fark önceki çalışmamız ile benzerlik göstermektedir¹⁵⁸. Önceki çalışmamızda 28 gün boyunca, erkek farelere 5 mg/kg, dişi farelere ise 15 mg/kg dozda everolimus uygulanmıştır. Timusta everolimusa bağlı görülen toksisitenin doz farkına rağmen dişi ve erkekte eşit olduğu görülmüştür. Bu da dişi farelerde ancak 3 kat fazla doz uygulandığında erkek farelerdeki timus everolimus düzeylerine erişildiğini düşündürmektedir.

ZT1'de everolimus uygulanan dişi ve özellikle erkek farelerde ZT13'te everolimus uygulananlara göre daha fazla toksik etki gözlenmesinin ve sirkadiyan saat sisteminin fizyolojik biyobelirteçleri olan lokomotor aktivite ve vücut sıcaklığı ritimlerinin daha fazla bozulmasının altında yatan nedenin, everolimusun uygulanma zamanına bağlı olarak farmakokinetik profilindeki değişikliklere bağlı olup olmadığı bu çalışmamız ile kısmen ortaya konulmuştur. Everolimusun plazma AUC değerleri yani sistemik dolaşıma geçen ilaç miktarları arasında cinsiyet, açlık-tokluk ve uygulama zamanına bağlı belirgin bir fark olmamasına rağmen ilacın karaciğer dokusundaki konsantrasyonları açlık ve tokluk durumlarında hem dişi hem de erkek farelerde ZT1'de ilaç uygulandığında ZT13'e göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Önceki çalışmamızda, everolimus uygulanan farelerde, trigliserit ve çok daha belirgin olmak üzere kolesterol düzeylerinde artış (karaciğer toksisitesi açısından önemli) gözlenmiştir^{20,21}. Bu artış, ZT1'de ilaç uygulanan farelerde ZT13'e göre özellikle erkek farelerde çok daha fazla olmuştur. PI3K/AKT/mTOR yolağının everolimus tarafından inhibisyonunun hiperlipidemi gibi metabolik toksisiteye yol açtığı bilinmektedir^{15,184}. ZT1 grubunda daha fazla metabolik toksisitenin gözlenmesi, bu grupta everolimusun karaciğerde daha yüksek düzeylere ulaştığını gösteren farmakokinetik bulgularımızla açıklanabilir. Yine daha önceki çalışmamızda ZT1'de toksisite gözlediğimiz timus dokusunda da everolimus AUC'si erkek farelerde daha belirgin olmakla beraber her iki cinsiyette de ZT1'de anlamlı derecede yüksek bulunmuştur^{20,21}. Bu durum timusta ZT1'de daha anlamlı olarak gözlediğimiz organ toksisitesinin farmakokinetik bulgularla açıklanabileceğini göstermektedir.

Okazaki ve ark.'ın¹³ yaptığı çalışmada parenteral yol tercih edilmiş olup, everolimus uygulanmasının zamana bağlı olarak farmakokinetiğinin değişmediği görülmüştür. Sözü edilen makale incelendiğinde farmakokinetik parametrelerin detaylı olarak hesaplanmadığı görüldüğünden ortaya çıkan değişimi sayısal olarak ifade etmek mümkün olmamıştır. Çalışmaya bakıldığında kan konsantrasyonu-zaman profillerinde anlamlı bir değişimin olmadığı dolayısıyla da AUC ve eliminasyon yarılanma ömrü parametrelerinde bir değişim olmadığı sonucuna varılmıştır¹³. Everolimus tedavide oral yoldan kullanılan bir ajan olduğundan, parenteral uygulama yerine çalışmamızda olduğu gibi oral yoldan uygulama sonucunda bir fark olup olmadığını görmeyi daha doğru bir yaklaşım olduğu değerlendirilmiştir. Çalışmamızda everolimus 5 mg/kg tek doz halinde ve oral yoldan uygulanmıştır. Bu doz ve uygulama yolu O'Reilly ve

ark.'ın¹³² metodolojisi ile aynı olup sadece kullanılan fare soyu farklılık göstermektedir. O'Reilly ve ark.'ın¹³² *ad libitum* koşulda oral uygulamayı takiben 1. saatte total kanda 4,53 µg/ml'lik everolimus düzeyi saptanırken bu değer karaciğerde ortalama 1,38 µg/ml ve gastrointestinal kanalda ortalama 3,96 µg/ml olarak saptanmıştır. Çalışmamızda ise *ad libitum* oral uygulamayı takiben elde edilen C_{maks} değerleri plazma için 1,62-3,83 µg/ml olurken karaciğer için 4,30 ile 15,41 µg/ml ve ileum için ise 2,83-14,87 µg/ml arasında saptanmıştır. O'Reilly ve ark.'ın¹³² tarafından gerçekleştirilen çalışma bulguları ile bizim çalışma bulgularımız arasında gözlenen farmakokinetik farklılıkların fare soyundan ve oral yoldan uygulanan everolimusun farmasötik formülasyonundan kaynaklandığını düşünmekteyiz. O'Reilly ve ark.'ın¹³², çalışmasında everolimusun %2'lik mikroemülsiyon formülasyonu kullanılmıştır. Ayrıca O'Reilly ve ark.'ın¹³², sadece dişi farelerle çalışmış olup, uygulama zamanı da belirtilmemiştir.

Swiss albino farelerin kullanıldığı everolimus uygulamasına ait bir başka farmakokinetik çalışmada, farelere everolimusun suda dağılabilen ticari olarak mevcut tablet formu kullanılmış ve yine everolimusun farmakokinetik profilinde farklılıklar saptanmıştır¹³⁴. O'Reilly ve ark.'ın¹³² çalışmasında, everolimusun plazma ve karaciğer konsantrasyonlarının daha yüksek bulunmasında everolimusun mikroemülsiyon formülasyonu şeklinde uygulanmasının gastrointestinal absorpsiyonu kolaylaştırmasının etkili olacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızın ikinci kısmında, dişi ve erkek farelere 14 gün boyunca oral olarak 5 mg/kg/gün everolimus uygulaması sonrasında karaciğer ve ileumda P-gp mRNA ve protein ekspresyonları değerlendirilmiştir. Everolimusun P-gp'nin ekspresyonuna etkisi ile ilgili bu güne kadar yapılan çalışmalar hücre kültürleri üzerinde yapılmıştır¹⁸⁵⁻¹⁸⁷, everolimusun P-gp ekspresyonuna etkisi *in vivo* olarak gösterilmemiştir. Bizim çalışmamızda everolimusun tekrarlı doz uygulamasının *in vivo* olarak, sağlıklı dokularda P-gp ekspresyonuna etkisi ilk defa incelenmiştir. Çalışmamızda öncelikle dişi ve erkek kontrol gruplarına bakıldığında Abcb1a'nın her iki dokuda da ritmik ekspresyon gösterdiği ve ZT13'te daha yüksek olduğu görülmektedir. Abcb1b ekspresyonu ise zamana bağlı olarak değişmemiştir. Everolimus uygulaması ile karaciğerde Abcb1a ekspresyonu azalmış ya da değişmemiş, Abcb1b ise artmış ya da değişmemiştir. Karaciğerde P-gp protein ekspresyonu her grupta ZT13'te daha yüksektir, ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir. İleumda da karaciğere benzer şekilde everolimus uygulaması ile Abcb1a artmış ya da değişmemiş, Abcb1b ise

azalmış ya da değişmemiştir. İleumda everolimus uygulaması P-gp protein ekspresyonunu dişi ve erkek farelerde farklı etkilemiştir. Erkek farelerde ZT13'te everolimus ekspresyonu azaltırken, ZT1 dişi farelerde artırmıştır ($p < 0,001$). Everolimus genel olarak Abcb1a ekspresyonunu azaltmış, Abcb1b ve P-gp protein ekspresyonunu ise artırmıştır. Abcb1a ve Abcb1b'nin ilaç uygulamasına bağlı olarak farklı şekilde uyarıldıkları anlaşılmaktadır. İleumda ZT1'de everolimusa bağlı P-gp ekspresyonunun dişi farelerde artışı da, vücudun dış uyarılara karşı zayıf olduğu bir zamanda (dinlenme fazında) ilaca karşı direnç geliştirmeye daha yatkın olabileceğini düşündürmektedir.

Everolimus kararlı-durum plazma düzeylerinde bakıldığında ise (1ME; $0,20 \pm 0,02$ – 13ME; $0,17 \pm 0,01$ ve 1FE; $0,18 \pm 0,02$ – 13FE; $0,22 \pm 0,02$ $\mu\text{g/ml}$) zamana bağlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Çalışmada P-gp mRNA ve protein ekspresyonunun zamana, cinsiyete ve everolimus uygulamasına bağlı olarak değiştiği ancak bu değişimlerin everolimusun kararlı-durum plazma düzeylerini etkilemediği izlenmiştir. Buna göre, yinelenen dozda uygulanan everolimusun zaman-bağlı P-gp ekspresyonuna etkisinin kararlı durum plazma farmakokinetiğini değiştirmeyeceği değerlendirilmiştir. Ancak P-gp'nin karaciğer ve ileumda zamana bağlı ekspresyonu ve P-gp ekspresyonuna everolimusun etkisi, everolimusun dokulardaki dağılımını etkileyebilir.

Everolimusun etki ve yan etki/toksosite profillerini değiştirebilecek hem farmakokinetik (P-glikoprotein ve CYP3A) hem de farmakodinamik (mTOR yolağı) faktörlerin gün içi ritim gösterdikleri bilinmektedir^{2,15,17,48,62}. Everolimus, karaciğerde ve bağırsak duvarında sitokrom P450 (CYP) enzimleri CYP3A4 ve CYP3A5 tarafından metabolize edilir¹⁸⁸. Everolimus ayrıca çoklu ilaç taşıyıcısı P-gp ile hücreden atılmaktadır^{185,189}. Ando ve ark.¹⁶, C57BL/6J farelerde karaciğer ve GI kanalda Abcb1a (P-gp'nin kemirgen homologları; Abcb1a ve Abcb1b) mRNA ekspresyonunda, ZT12-16'da zirve yapan net bir 24 saatlik ritim bulmuşlardır. Bağırsakta, P-gp protein seviyeleri de günlük ritim göstermiş, dinlenme fazının ikinci yarısında tepe ve dinlenme fazının başlangıcında çukur oluşturmuştur. C57BL/6J erkek farelerin karaciğerinde P-gp ekspresyonunda, ZT17'de maksimum ve ZT1'de minimum olmak üzere 2.9 kat değişen dalgalanma gözlenmiştir⁴⁸. Benzer şekilde, P450 enzimi Cyp3a11 (insan CYP3A4'e homologu), C57BL/6J farelerin karaciğerinde ZT21'deki en yüksek ve ZT1'deki en düşük mRNA seviyelerini göstermiştir^{48,62}. Bu nedenle, P-gp ve CYP3A'nın sirkadiyan ritimlerinin, dozaj süresine bağlı olarak organizmanın everolimusa duyarlılığını

değiştirebileceği ve dolayısıyla bu ilacın kronofarmakokinetik ve kronotoksitesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir. Farede ZT1'de everolimusun zayıf detoksifikasyonu, bu sirkadiyan zamanda everolimusun toksisitesine karşı organizmayı daha savunmasız yapabilir. Ayrıca hem önceki hem şimdiki çalışmamızda everolimusun sırası ile kronotoksite ve kronofarmakokinetiğinde cinsiyete bağlı farklılıklar gözlemledik. Erkek fareler, everolimusun toksik etkilerine dişilere göre daha duyarlı bulunmuştur^{20,21}. Ahowesso ve ark.¹⁹⁰ irinotekanın toksisitesinin cinsiyete göre değişmekte olup, erkeklerde dişilerden daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Everolimus toksite ve farmakokinetiğinin bu cinsiyet bağımlılığı, karaciğer, bağırsak ve böbreklerde CYP3A ve P-gp'nin mRNA ekspresyonlarını içeren ilaç metabolizması ve detoksifikasyonundaki cinsiyete bağlı farklılıklarla ilgili olabilir. Bu hipotez doğrultusunda, bazı çalışmalar Cyp3a11 mRNA'nın, dişilerde farelerde erkeklerden daha yüksek olduğunu, yani kadınlarda everolimusun daha iyi tolere edilebilirliğini kısmen orataya koymaktadır^{182,183}. Kemirgen karaciğerindeki cinsiyete özgü gen transkripsiyonu ayrıca erkeklerde epizodik olan ve kadınlarda sürekli olan büyüme hormonunun salgılama düzenleri ile de düzenlenir. Özellikle, birkaç sitokrom P450 enzimi cinsiyetler arasında farklı şekilde eksprese edilir¹⁹¹. Cui ve ark.¹⁹² C57BL/6J farelerde Abcb1a ve Abcb1b'nin, ilaç efluksunda ana bölgelerden biri olan böbrek dokusunda, dişilerde daha yüksek ekspresyon paterni gösterdiğini bulmuşlardır.

Yapılan çalışmalar mTOR yolağının sirkadiyan ritim gösterdiğini ortaya koymuştur. Cao ve ark.¹⁹³ tarafından yapılan bir çalışmada mTOR yolağının farelerde SKÇ'deki sirkadiyan saat tarafından kontrol edildiği ve mTOR aktivitesinin ZT4'te maksimum olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda mTOR'un da SKÇ'nin senkronizasyonunda rol oynadığı ortaya konulmuştur. Periferik organlardaki saatler, SKÇ ile sıkı bir koordinasyon içinde çalışmaktadır. Farmakokinetik çalışma bulgularımıza baktığımızda, mTOR inhibitörü everolimusun ZT1 grubunda karaciğerde daha fazla doku konsantrasyonuna ulaştığı görülmüştür. Çalışmamızda, ZT1 grubunda hem everolimusun karaciğer dokusunda daha fazla birikmesi hem de mTOR aktivitesinin ZT4'te daha yüksek olması nedeniyle daha fazla inhibe edilmesi; hücre metabolizması, büyümesi ve proliferasyonundan sorumlu mTOR yolağının inhibe edilmesinden kaynaklanan metabolik bozuklukları ve genel toksite bulgularını açıklayabilir.

Everolimusun saat genleri üzerine etkileri *in vitro* ve *in vivo* olarak araştırma grubumuz tarafından gerçekleştirilen çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bir çalışmamızda, everolimusun, U2OS Bmal1-dLuc hücre hatlarında, saat geni *Bmal1*'in ekspresyon ritmi üzerine etkisine bakılmış, gen ekspresyon ritminin uzadığı ve amplitüdün düştüğü gözlenmiştir. Yine çalışma grubumuz tarafından yapılan bir *in vivo* çalışmada, KI/KI Per2::Luc erkek farelerde saat geni *Per2* ekspresyonu ve lokomotor aktivite ritimleri üzerine everolimusun uygulama zamanına bağlı etkisi incelenmiş; ZT1'de ilaç uygulanan farelerde hem *Per2* gen ekspresyon ritminin hem de lokomotor aktivite ritminin ZT13'e göre daha fazla bozulduğu saptanmıştır. Farmakokinetik çalışma bulgularımıza göre everolimusun karaciğerde ZT1 grubunda ZT13'e göre daha yüksek oranda birikmesi, karaciğerdeki sirkadiyan saat genleri ile sirkadiyan saat genleri tarafından kontrol edilen ve ilaç metabolizması ile detoksifikasyonunda önemli rol oynayan genlerin ekspresyon ritimlerinin daha fazla bozulmasına yol açması muhtemel görünmektedir. Karaciğerdeki metabolik ritimlerin bozulması da genel bir internal desenkronizasyona yol açarak organizmanın dengesinin bozulmasına, bu da SKÇ'de bulunan ana sirkadiyan saat ile koordinasyonun bozulmasına yol açmaktadır. Çalışma bulgularımız, lokomotor aktivite ve vücut sıcaklığı gibi sirkadiyan saatin düzgün bir şekilde çalışıp çalışmadığını gösteren fizyolojik biyobelirteçlerdeki ritimlerin ZT1'de daha fazla bozulduğunu ortaya koymuştur^{20,21}. İlaça bağlı olarak oluşabilecek biyolojik ritim değişiklikleri, kavramsal olarak ilaç yan etkisi olarak değerlendirilmektedir. Biyolojik ritimlerin değişmesi, değişmiş bir homeostatik düzenlenme demektir ki bu da organizmanın pek çok temel fonksiyonunu etkileyebilecek ciddi problemlere yol açabileceğinden dikkatle üzerinde durulması gereken bir durumdur. Sirkadiyan saatteki bozulmalar; psikolojik bozukluklar, nörodejeneratif hastalıklar, kognitif performans, motor kontrol ve mental aktivitede bozulma, metabolik sendrom, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, obezite, inflamatuvar hastalıklar ve kanser gibi pek çok hastalığın patofizyolojisi ile yakından ilişkilidir^{2,160,194-196}.

ZT1 ve ZT13 zamanlarında *ad libitum* beslenen erkek/dişi farelere everolimus uygulanmasını takiben elde edilen plazma verileri değerlendirildiğinde, ZT1 grubu erkek farelerde plazma C_{maks} değerlerinin ZT13'e göre düşük bulunması, çalışma grubumuz tarafından gerçekleştirilen everolimusa ait kronotoksiste bulgularının sadece ilaç plazma düzeyleri ile açıklanamayacağını da göstermiştir. Genel olarak antikanser

ilaçların kan ve organdaki konsantrasyonları ile toksisite gözlenme zamanı arasında bir ilişki kurulabilir. Örneğin bir antikanser ve immunsupresan ilaç olan metotreksat için bu şekilde bir ilişkiden bahsetmek mümkündür. Everolimus için bu husus tam olarak bilinmemekte olup, yaptığımız çalışmada incelenmiştir. Plazma verilerine genel olarak bakıldığında en iyi tolere edilen zaman olan ZT13'te, ZT1'e göre *ad libitum* beslenen dişi ve erkek farelerde daha fazla plazma konsantrasyonu oluşmasına rağmen AUC₀₋₂₄ değerlerinde gruplar arasında belirgin bir farklılık görülmemiştir. Yani gruplar arasında sistemik maruziyet açısından önemli bir farklılık oluşmamıştır. Bununla birlikte, karaciğer farmakokinetik verilerine bakıldığında, tüm gruplarda, en fazla toksisite gözlediğimiz zaman olan ZT1 zamanında, en az toksisite gözlediğimiz ZT13 zamanına göre, karaciğer everolimus AUC değerlerinin (maruziyetin) daha fazla olduğu; bunun da özellikle ZT1 zamanında ve aç bırakılan erkek farelerde olduğu saptanmıştır. Plazma için değil ancak karaciğer dokusunda oluşan maruziyet ile everolimus toksisitesi arasında bir korelasyonun olduğu değerlendirilmiştir. Aynı şekilde ileum C_{maks} ve AUC₀₋₂₄ verilerine bakıldığında genel olarak ZT1 ve ZT13 arasında fark gözlenmezken, cinsiyete ve açlık/tokluk durumuna göre farklılık yüksektir. İleumda zamana bağlı fark doku/plazma oranlarında görülmüş ve ZT1'de ileuma dağılım daha yüksek olmuştur. Yine timus verileri de önceki çalışmamızı doğrulayacak şekilde, ZT1'de ve özellikle erkek farelerde everolimus konsantrasyon ve AUC₀₋₂₄ değerleri daha yüksektir. Bu durum timusta ZT1'de görülen kronotoksitenin everolimus maruziyetiyle açıklanabileceğini göstermektedir. Ancak aynı durum testiste gözlenmemiştir. Önceki çalışmamızda everolimus toksisitesi ZT1'de daha fazla görülürken, kronofarmakokinetik çalışmamızda ZT13'te daha yüksek maruziyet görülmüştür.

Li ve ark.¹⁹⁷, tarafından yapılan kapsamlı bir prelinik çalışmada ilginç sonuçlar elde edilmiş, sistemik maruziyet ile toksik etki oluşma veya toksik etkinin gözlenmesi durumlarının her zaman paralel olmayabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada, paranteral yoldan irinotekan uygulanan farelerde oluşan toksisite ile plazma verileri değişik özellikler göstermiş ve araştırmacılar fare gruplarını sınıflara ayırmıştır. Sınıf-I grubuna, B6D2F₁ ve C57BL/6 dişi fareler dahil edilmiştir. Bu grupta, antikanser bir ilaç olan irinotekan, en iyi tolere edildiği zaman olan ZT15'te verildiğinde, AUC değerinin en düşük olduğu; en toksik olduğu ZT3'te verildiğinde ise AUC'nin en yüksek olduğu saptanmıştır. Sınıf-II grubuna B6D2F₁ ve C57BL/6 erkek fareler dahil edilmiştir. Bu grupta, en iyi zaman ZT11 ve en kötü zaman ZT23 olarak saptanmıştır. Ancak

irinotekanın hem ZT11 hem de ZT23'te uygulandığında AUC değerleri arasında kronotoksosite ile ilişkilendirilebilecek belirgin bir farklılık görülmemiştir. Sınıf-III grubuna, B6CBAF₁ dişi ve erkek fareler dahil edilmiştir. Bu grupta, en iyi zaman ZT15 ve en kötü zaman ZT7 olarak saptanmıştır. İrinotekan, en iyi tolere edildiği zaman olan ZT15'te uygulandığında toksisitenin en düşük olduğu ancak AUC değerlerinin en yüksek olduğu görülmüştür. Aynı şekilde ilacın en toksik etki gösterdiği zaman olan ZT7'de verildiğinde AUC değerinin en az olduğu saptanmıştır¹⁹⁷. Sonuç olarak, bazı antikanser ilaçlar için toksik etkinin şiddeti ile plazma/kan konsantrasyonları arasında zayıf bir ilişkinin olduğu gözlenmektedir. Everolimus açısından değerlendirdiğimizde, ilaç plazma konsantrasyonu değerleri ile toksisite görülmesi arasında bir korelasyon görülmemekle birlikte, karaciğerdeki everolimus maruziyeti kronotoksosite bulgularımızı destekler niteliktedir.

Sonuçları özetlemek gerekirse çalışmamızda; everolimus doku dağılımının, ilaç uygulama zamanı, cinsiyet ve açlık/tokluk durumuna göre önemli ölçüde değiştiği görülürken, plazma farmakokinetiğinde önemli bir farklılık saptanmamıştır. Karaciğer everolimus düzeyleri tüm gruplarda ZT1'de daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca özellikle erkek farelerde açlık durumunda everolimusun karaciğerdeki dağılımı artmıştır. İleumda ise ilaç uygulama zamanına bağlı olarak majör bir fark görülmezken besin alımı ile ve özellikle dişilerde ileum everolimus düzeyleri artmıştır. Timus everolimus dağılımı baktığımızda ise toksisite bulgularımızı destekleyecek şekilde ZT1'de ve özellikle erkek farelerde anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Farelerde everolimusun en toksik olduğu zaman ZT1 olup çalışmamızda da ZT1'de everolimusun doku dağılımının ZT13'e göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda önemi iyice artmış olan antikanser ilaç everolimusun, uygulama zamanına bağlı olarak farmakokinetik profilindeki değişiklikler yani everolimus kronofarmakokinetiği ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Aynı zamanda çalışmamız, farelerde beslenme (açlık-tokluk) ve cinsiyet (dişi-erkek) gibi faktörlerin, everolimus farmakokinetiğine, etkisini detaylı olarak ortaya koyması açısından önem arz etmektedir. Kronofarmakokinetik çalışma bulgularımız, everolimusun sağlıklı farelerdeki kronotoksitesisi ve sirkadiyan saat fonksiyonu üzerindeki uygulama zamanına bağımlı etkilerini ortaya koyduğumuz önceki çalışmanın mekanizmasını farmakokinetik açıdan aydınlatması açısından da oldukça önemlidir. Preklinik çalışma bulgularımızın, klinik çalışmalara temel oluşturarak kemoterapinin, hastanın sirkadiyan zamanlama sistemine göre

biçimlendirilmesiyle tedavinin bireyselleştirilmesine ve daha etkin hale getirilmesine yönelik girişimlere katkıda bulunacağını düşünmekteyiz. Tedavinin uygulanma zamanı bakımından, biyolojik saatin vücutta oluşturduğu ritimleri bilmek ve kanser hastalarında kullanılan ilaçların uygulama zamanlarına yönelik teorik bilgiyi arttırmak, antikanser ilaçların terapötik etkilerinin en üst düzeye çıkarılmasını ve yan etkilerinin de en aza indirilmesini sağlayacaktır. Bu şekilde antikanser ilaçların daha etkin ve doğru kullanılması ve ilaç tolere edilebilirliğinin artırılması yönünde kanser tedavisine bir katkımız olabilecektir.



KAYNAKLAR

1. Levi F, Schibler U. Circadian Rhythms: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47(1):593-628.
2. Lévi F, Okyar A, Dulong S, Innominato PF, Clairambault J. Circadian Timing in Cancer Treatments. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50(1):377-421.
3. Ozturk N, Ozturk D, Kavakli IH, Okyar A. Molecular aspects of circadian pharmacology and relevance for cancer chronotherapy. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10).
4. Gaspar LS, Álvaro AR, Carmo-Silva S, Mendes AF, Relógio A, Cavadas C. The importance of determining circadian parameters in pharmacological studies. *Br J Pharmacol*. 2019;176(16):bph.14712.
5. Ruben MD, Smith DF, FitzGerald GA, Hogenesch JB. Dosing time matters. *Science (80-)*. 2019;365(6453):547-549.
6. Dallmann R, Okyar A, Lévi F. Dosing-Time Makes the Poison: Circadian Regulation and Pharmacotherapy. *Trends Mol Med*. 2016;22(5):430-445.
7. Ballesta A, Innominato PF, Dallmann R, Rand DA, Lévi FA. Systems Chronotherapeutics. *Pharmacol Rev*. 2017;69(2):161-199.
8. Musiek ES, Fitzgerald GA. Molecular clocks in pharmacology. *Handb Exp Pharmacol*. 2013;217(217):243-260.
9. Baraldo M. The influence of circadian rhythms on the kinetics. 2008:175-192.
10. Zhang R, Lahens NF, Ballance HI, Hughes ME, Hogenesch JB. A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(45):16219-16224.
11. Bruguerolle B, Boulamery A, Simon N. Biological rhythms: a neglected factor of variability in pharmacokinetic studies. *J Pharm Sci*. 2008;97(3):1099-1108.
12. Üstünes L. *Everolimus-Afinitor Tablet. Rx MediaPharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı*. İzmir; 2019.
13. Okazaki H, Matsunaga N, Fujioka T, et al. Circadian regulation of mTOR by the ubiquitin pathway in renal cell carcinoma. *Cancer Res*. 2014;74(2):543-551.

14. Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP. Clinical Pharmacokinetics of Everolimus. *Clin Pharmacokinet*. 2004;43(2):83-95.
15. Booth J. *Novartis Afinitor®/Votubia® (RAD001) Investigator's Brochure.*; 2010.
16. Ando H, Yanagihara H, Sugimoto KI, et al. Daily rhythms of P-glycoprotein expression in mice. *Chronobiol Int*. 2005;22(4):655-665.
17. Murakami Y, Higashi Y, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S. Circadian Clock-Controlled Intestinal Expression of the Multidrug-Resistance Gene *mdr1a* in Mice. *Gastroenterology*. 2008;135(5):1636-1644.
18. Iurisci I, Filipski E, Sallam H, et al. Liver circadian clock, a pharmacologic target of cyclin-dependent kinase inhibitor Seliciclib. *Chronobiol Int*. 2009;26(6):1169-1188.
19. Filipski E, Berland E, Ozturk N, et al. Optimization of irinotecan chronotherapy with P-glycoprotein inhibition. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;274(3):471-479.
20. Öztürk N. mTOR inhibitörü everolimusun kronotoksitesinin farelerde incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. 2015.
21. Ozturk N, Ozturk D, Pala-Kara Z, et al. The immune system as a chronotoxicity target of the anticancer mTOR inhibitor everolimus. *Chronobiol Int*. 2018;35(5):705-718.
22. Takahashi JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet*. 2017;18(3):164-179.
23. Kavakli IH, Baris I, Tardu M, et al. The Photolyase/Cryptochrome Family of Proteins as DNA Repair Enzymes and Transcriptional Repressors. *Photochem Photobiol*. 2017;93(1):93-103.
24. Paschos GK, Baggs JE, Hogenesch JB, FitzGerald GA. The Role of Clock Genes in Pharmacology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50(1):187-214.
25. Lévi F, Okyar A. Circadian clocks and drug delivery systems: impact and opportunities in chronotherapeutics. *Expert Opin Drug Deliv*. 2011;8(12):1535-1541.
26. Lévi F, Karaboué A, Etienne-Grimaldi M-C, et al. Pharmacokinetics of

- Irinotecan, Oxaliplatin and 5-Fluorouracil During Hepatic Artery Chronomodulated Infusion: A Translational European OPTILIV Study. *Clin Pharmacokinet.* 2017;56(2):165-177.
27. Li J, Chen R, Ji M, Zou S, Zhu L. Cisplatin-based chronotherapy for advanced non-small cell lung cancer patients: a randomized controlled study and its pharmacokinetics analysis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;76(3):651-655.
 28. Pilancı KN, Saglam S, Okyar A, et al. Chronomodulated oxaliplatin plus Capecitabine (XELOX) as a first line chemotherapy in metastatic colorectal cancer: A Phase II Brunch regimen study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016;78(1):143-150.
 29. Binkhorst L, Kloth JSL, de Wit AS, et al. Circadian variation in tamoxifen pharmacokinetics in mice and breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;152(1):119-128.
 30. Kloth JSL, Binkhorst L, de Wit AS, et al. Relationship Between Sunitinib Pharmacokinetics and Administration Time: Preclinical and Clinical Evidence. *Clin Pharmacokinet.* 2015;54(8):851-858.
 31. Xiong H, Chiu Y-L, Ricker JL, LoRusso P. Results of a phase 1, randomized study evaluating the effects of food and diurnal variation on the pharmacokinetics of linifanib. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014;74(1):55-61.
 32. Sukumaran S, Almon RR, DuBois DC, Jusko WJ. Circadian rhythms in gene expression: Relationship to physiology, disease, drug disposition and drug action. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(9-10):904-917.
 33. Lemmer B, Nold G. Circadian changes in estimated hepatic blood flow in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 1991;32(5):627-629.
 34. Dallmann R, Brown SA, Gachon F. Europe PMC Funders Group Chronopharmacology: New Insights and Therapeutic Implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2014;54(1):1-25.
 35. Goo RH, Moore JG, Greenberg E, Alazraki NP. Circadian variation in gastric emptying of meals in humans. *Gastroenterology.* 1987;93(3):515-518.
 36. Lemmer B, Nold G, Behne S, Kaiser R. Chronopharmacokinetics and cardiovascular effects of nifedipine. *Chronobiol Int.* 1991;8(6):485-494.

37. Moore JG, Halberg F. Circadian rhythm of gastric acid secretion in men with active duodenal ulcer. *Dig Dis Sci*. 1986;31(11):1185-1191.
38. MOORE JG, ENGLERT E. Circadian Rhythm of Gastric Acid Secretion in Man. *Nature*. 1970;226(5252):1261-1262.
39. Danhof M, de Jongh J, De Lange ECM, Della Pasqua O, Ploeger BA, Voskuyl RA. Mechanism-Based Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling: Biophase Distribution, Receptor Theory, and Dynamical Systems Analysis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007;47(1):357-400.
40. Eichler HG, Müller M. Drug distribution. The forgotten relative in clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*. 1998;34(2):95-99.
41. Scheving L, Pauly J, Tsai T. Circadian fluctuation in plasma proteins of the rat. *Am J Physiol Content*. 1968;215(5):1096-1101.
42. Angeli A, Frajria R, De Paoli R, Fonzo D, Ceresa F. Diurnal variation of prednisolone binding to serum corticosteroid-binding globulin in man. *Clin Pharmacol Ther*. 1978;23(1):47-53.
43. Patel IH, Venkataramanan R, Levy RH, Viswanathan CT, Ojemann LM. Diurnal Oscillations in Plasma Protein Binding of Valproic Acid. *Epilepsia*. 1982;23(3):283-290.
44. Hecquet B, Sucche M. Theoretical study of the influence of the circadian rhythm of plasma protein binding on cisplatin area under the curve. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1986;14(1):79-93.
45. Hecquet B, Meynadier J, Bonnetterre J, Adenis L, Demaille A. Time dependency in plasmatic protein binding of cisplatin. *Cancer Treat Rep*. 1985;69(1):79-83.
46. Stearns AT, Balakrishnan A, Rhoads DB, Ashley SW, Tavakkolizadeh A. Diurnal rhythmicity in the transcription of jejunal drug transporters. *J Pharmacol Sci*. 2008;108(1):144-148.
47. Košir R, Španinger K, Rozman D. Circadian events in human diseases and in cytochrome P450-related drug metabolism and therapy. *IUBMB Life*. 2013;65(6):487-496.
48. Zhang YKJ, Yeager RL, Klaassen CD. Circadian expression profiles of drug-

- processing genes and transcription factors in mouse liver. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(1):106-115.
49. Gachon F, Firsov D. The role of circadian timing system on drug metabolism and detoxification. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011;7(2):147-158.
 50. Zmrzljak UP, Rozman D. Circadian regulation of the hepatic endobiotic and xenobiotic detoxification pathways: The time matters. *Chem Res Toxicol.* 2012;25(4):811-824.
 51. Gachon F. Physiological function of PARbZip circadian clock-controlled transcription factors. *Ann Med.* 2007;39(8):562-571.
 52. Handschin C, Meyer UA. Induction of Drug Metabolism: The Role of Nuclear Receptors. *Pharmacol Rev.* 2003;55(4):649-673.
 53. Xu C, Li CY-T, Kong A-NT. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res.* 2005;28(3):249-268.
 54. Claudel T, Cretenet G, Saumet A, Gachon F. Crosstalk between xenobiotics metabolism and circadian clock. *FEBS Lett.* 2007;581(19):3626-3633.
 55. Gachon F, Olela FF, Schaad O, Descombes P, Schibler U. The circadian PAR-domain basic leucine zipper transcription factors DBP, TEF, and HLF modulate basal and inducible xenobiotic detoxification. *Cell Metab.* 2006;4(1):25-36.
 56. Kriebs A, Jordan SD, Soto E, et al. Circadian repressors CRY1 and CRY2 broadly interact with nuclear receptors and modulate transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci.* 2017;114(33):8776-8781.
 57. Gorbacheva VY, Kondratov R V., Zhang R, et al. From The Cover: Circadian sensitivity to the chemotherapeutic agent cyclophosphamide depends on the functional status of the CLOCK/BMAL1 transactivation complex. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(9):3407-3412.
 58. Zhao X, Cho H, Yu RT, Atkins AR, Downes M, Evans RM. Nuclear receptors rock around the clock. *EMBO Rep.* 2014;15(5):518-528.
 59. Wada T, Kang HS, Jetten AM, Xie W. The Emerging Role of Nuclear Receptor ROR α and Its Crosstalk with LXR in Xeno- and Endobiotic Gene Regulation. *Exp Biol Med.* 2008;233(10):1191-1201.

60. Yang X, Downes M, Yu RT, et al. Nuclear Receptor Expression Links the Circadian Clock to Metabolism. *Cell*. 2006;126(4):801-810.
61. Kanno Y, Otsuka S, Hiromasa T, Nakahama T, Inouye Y. Diurnal difference in CAR mRNA expression. *Nucl Recept*. 2004;2(1):6.
62. Lu Y-F, Jin T, Xu Y, et al. Sex Differences in the Circadian Variation of Cytochrome P450 Genes and Corresponding Nuclear Receptors in Mouse Liver. *Chronobiol Int*. 2013;30(9):1135-1143.
63. Takiguchi T, Tomita M, Matsunaga N, Nakagawa H, Koyanagi S, Ohdo S. Molecular basis for rhythmic expression of CYP3A4 in serum-shocked HepG2 cells. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17(12):1047-1056.
64. Froy O. Cytochrome P450 and the biological clock in mammals. *Curr Drug Metab*. 2009;10(2):104-115.
65. Lavery DJ, Lopez-Molina L, Margueron R, et al. Circadian Expression of the Steroid 15 α -Hydroxylase (Cyp2a4) and Coumarin 7-Hydroxylase (Cyp2a5) Genes in Mouse Liver Is Regulated by the PAR Leucine Zipper Transcription Factor DBP . *Mol Cell Biol*. 1999;19(10):6488-6499.
66. Tanimura N, Kusunose N, Matsunaga N, Koyanagi S, Ohdo S. Aryl hydrocarbon receptor-mediated Cyp1a1 expression is modulated in a CLOCK-dependent circadian manner. *Toxicology*. 2011;290(2-3):203-207.
67. Kakan X, Chen P, Zhang J. Clock gene mPer2 functions in diurnal variation of acetaminophen induced hepatotoxicity in mice. *Exp Toxicol Pathol*. 2011;63(6):581-585.
68. Carver KA, Lourim D, Tryba AK, Harder DR. Rhythmic expression of cytochrome P450 epoxigenases CYP4x1 and CYP2c11 in the rat brain and vasculature. *Am J Physiol Physiol*. 2014;307(11):C989-C998.
69. Khemawoot P, Nishino K, Ishizaki J, Yokogawa K, Miyamoto K ichi. Circadian rhythm of cytochrome P4502E1 and its effect on disposition kinetics of chlorzoxazone in rats. *Eur J Pharmacol*. 2007;574(1):71-76.
70. Matsunaga N. Influence of Feeding Schedule on 24-h Rhythm of Hepatotoxicity Induced by Acetaminophen in Mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;311(2):594-600.

71. Yamada M, Nagatomo J, Setoguchi Y, Kuroki N, Higashi S, Setoguchi T. Circadian Rhythms of Sterol 12 α -Hydroxylase, Cholesterol 7 α -Hydroxylase and DBP Involved in Rat Cholesterol Catabolism. *Biol Chem.* 2000;381(12):1149-1153.
72. Hirao J, Arakawa S, Watanabe K, Ito K, Furukawa T. Effects of restricted feeding on daily fluctuations of hepatic functions including P450 monooxygenase activities in rats. *J Biol Chem.* 2006;281(6):3165-3171.
73. Omura Tsuneo, Sato, Ryo. The Carbon of Liver. *J Biol Chem.* 1964;239(7).
74. Furukawa T, Manabe S, Ohashi Y, Sharyo S, Kimura K, Mori Y. Daily fluctuation of 7-alkoxycoumarin O-dealkylase activities in the liver of male F344 rats under ad libitum-feeding or fasting condition. *Toxicol Lett.* 1999;108(1):11-16.
75. Zhang Y-KJ, Yeager RL, Klaassen CD. Circadian Expression Profiles of Drug-Processing Genes and Transcription Factors in Mouse Liver. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(1):106-115.
76. Hamdan AM, Koyanagi S, Wada E, et al. Intestinal expression of mouse Abcg2/breast cancer resistance protein (BCRP) gene is under control of circadian clock-activating transcription factor-4 pathway. *J Biol Chem.* 2012;287(21):17224-17231.
77. Hayashi Y, Ushijima K, Ando H, et al. Influence of a Time-Restricted Feeding Schedule on the Daily Rhythm of abcb1a Gene Expression and Its Function in Rat Intestine. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;335(2):418-423.
78. Kotaka M, Onishi Y, Ohno T, Akaike T, Ishida N. Identification of negative transcriptional factor E4BP4-binding site in the mouse circadian-regulated gene Mdr2. *Neurosci Res.* 2008;60(3):307-313.
79. Iwasaki M, Koyanagi S, Suzuki N, et al. Circadian Modulation in the Intestinal Absorption of P-Glycoprotein Substrates in Monkeys. *Mol Pharmacol.* 2015;88(1):29-37.
80. Wada E, Koyanagi S, Kusunose N, et al. Modulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- Activity by Bile Acids Causes Circadian Changes in the Intestinal Expression of Octn1/Slc22a4 in Mice. *Mol Pharmacol.*

2015;87(2):314-322.

81. Ohdo S, Makinosumi T, Ishizaki T, et al. Cell cycle-dependent chronotoxicity of irinotecan hydrochloride in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997;283(3):1383-1388.
82. Ballesta A, Dulong S, Abbara C, et al. A combined experimental and mathematical approach for molecular-based optimization of irinotecan circadian delivery. *PLoS Comput Biol*. 2011;7(9):1-12.
83. Dulong S, Ballesta A, Okyar A, Levi F. Identification of Circadian Determinants of Cancer Chronotherapy through In Vitro Chronopharmacology and Mathematical Modeling. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(9):2154-2164.
84. Oh JH, Lee JH, Han DH, Cho S, Lee YJ. Circadian Clock Is Involved in Regulation of Hepatobiliary Transport Mediated by Multidrug Resistance-Associated Protein 2. *J Pharm Sci*. 2017;106(9):2491-2498.
85. Kervezee L, Hartman R, van den Berg D-J, et al. Diurnal Variation in P-glycoprotein-Mediated Transport and Cerebrospinal Fluid Turnover in the Brain. *AAPS J*. 2014;16(5):1029-1037.
86. Okyar A, Dressler C, Hanafy A, Baktir G, Lemmer B, Spahn-Langguth H. Circadian Variations in Exsorptive Transport: In Situ Intestinal Perfusion Data and In Vivo Relevance. *Chronobiol Int*. 2012;29(4):443-453.
87. Savolainen H, Meerlo P, Elsinga PH, et al. P-glycoprotein Function in the Rodent Brain Displays a Daily Rhythm, a Quantitative In Vivo PET Study. *AAPS J*. 2016;18(6):1524-1531.
88. Okyar A, Piccolo E, Ahowesso C, et al. Strain- and sex-dependent circadian changes in Abcc2 transporter expression: Implications for irinotecan chronotolerance in mouse ileum. *PLoS One*. 2011;6(6):1-9.
89. Porsin B, Formento J-L, Filipinski E, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase circadian rhythm in mouse liver: comparison between enzyme activity and gene expression. *Eur J Cancer*. 2003;39(6):822-828.
90. Harris BE, Song R, Soong SJ, Diasio RB. 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 Res.* 1990;50(1):197-201.
91. Tuchman M, Roemeling R V, Hrushesky WA, Sothorn RB, O'Dea RF. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in human blood mononuclear cells. *Enzyme.* 1989;42(1):15-24.
 92. Zeng Z, Sun J, Guo L, et al. Circadian Rhythm in Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity and Reduced Glutathione Content in Peripheral Blood of Nasopharyngeal Carcinoma Patients. *Chronobiol Int.* 2005;22(4):741-754.
 93. Barrat MA, Renée N, Mormont MC, Milano G, Levi F. [Circadian variations of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) activity in oral mucosa of healthy volunteers]. *Pathol Biol (Paris).* 2003;51(4):191-193.
 94. Sawers L, Ferguson MJ, Ihrig BR, et al. Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) directly influences platinum drug chemosensitivity in ovarian tumour cell lines. *Br J Cancer.* 2014.
 95. Townsend DM, Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene.* 2003;22(47):7369-7375.
 96. Li XM, Metzger G, Filipski E, et al. Pharmacologic modulation of reduced glutathione circadian rhythms with buthionine sulfoximine: Relationship with cisplatin toxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997.
 97. Li XM, Metzger G, Filipski E, Lemaigre G, Lévi F. Modulation of nonprotein sulphydryl compounds rhythm with buthionine sulfoximine: Relationship with oxaliplatin toxicity in mice. *Arch Toxicol.* 1998.
 98. Cao Q-R, Kim T-W, Choi JS, Lee B-J. Circadian variations in the pharmacokinetics, tissue distribution and urinary excretion of nifedipine after a single oral administration to rats. *Biopharm Drug Dispos.* 2005;26(9):427-437.
 99. Minors D, Waterhouse J, Hume K, et al. Sleep and circadian rhythms of temperature and urinary excretion on a 22.8 hr "day". *Chronobiol Int.* 1988;5(1):65-80.
 100. Stow LR, Gumz ML. The Circadian Clock in the Kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2011.

101. Gumz ML, Stow LR, Lynch IJ, et al. The circadian clock protein Period 1 regulates expression of the renal epithelial sodium channel in mice. *J Clin Invest.* 2009;119(8):2423-2434.
102. Zuber AM, Centeno G, Pradervand S, et al. Molecular clock is involved in predictive circadian adjustment of renal function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(38):16523-16528.
103. Wilkinson GR, Beckett AH. Absorption metabolism and excretion of the ephedrine in man. I. The influence of urinary pH and urine volume output. *J Pharmacol Exp Ther.* 1968;162(1):139-147.
104. Pons M, Forpomès O, Espagnet S, Cambar J. Relationship between circadian changes in renal hemodynamics and circadian changes in urinary glycosaminoglycan excretion in normal rats. *Chronobiol Int.* 1996;13(5):349-358.
105. Labrecque G, Bélanger PM. Biological rhythms in the absorption, distribution, metabolism and excretion of drugs. *Pharmacol Ther.* 1991;52(1):95-107.
106. White CA, Pardue R, Huang C, Warren J. Chronobiological evaluation of the active biliary and renal secretion of ampicillin. *Chronobiol Int.* 1995.
107. Pan X, Bradfield CA, Hussain MM. Global and hepatocyte-specific ablation of Bmal1 induces hyperlipidaemia and enhances atherosclerosis. *Nat Commun.* 2016;7:1-15.
108. Granda TG, Liu X-H, Smaaland R, et al. Circadian regulation of cell cycle and apoptosis proteins in mouse bone marrow and tumor. *FASEB J.* 2004;19(2):304-306.
109. Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee CC. The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell.* 2002.
110. Bjarnason GA, Jordan RCK, Sothorn RB. Circadian variation in the expression of cell-cycle proteins in human oral epithelium. *Am J Pathol.* 1999.
111. Wood PA. Circadian clock coordinates cancer cell cycle progression, thymidylate synthase, and 5-fluorouracil therapeutic index. *Mol Cancer Ther.* 2006.

112. Kuramoto Y, Hata K, Koyanagi S, Ohdo S, Shimeno H, Soeda S. Circadian regulation of mouse topoisomerase I gene expression by glucocorticoid hormones. *Biochem Pharmacol*. 2006.
113. Tampellini M, Filipski E, Liu XH, et al. Docetaxel chronopharmacology in mice. *Cancer Res*. 1998;58(17):3896-3904.
114. To H, Ohdo S, Shin M, et al. Dosing time dependency of doxorubicin-induced cardiotoxicity and bone marrow toxicity in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2003.
115. Filipski E, Amat S, Lemaigre G, Vincenti M, Breillout F, Lévi FA. Relationship between circadian rhythm of vinorelbine toxicity and efficacy in P388-bearing mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;289(1):231-235.
116. Li XM, Tanaka K, Sun J, et al. Preclinical relevance of dosing time for the therapeutic index of gemcitabine-cisplatin. *Br J Cancer*. 2005.
117. Li XM, Lévi F. Circadian physiology is a toxicity target of the anticancer drug gemcitabine in mice. *J Biol Rhythms*. 2007.
118. Lévi F. Circadian Rhythms in 5-Fluorouracil Pharmacology and Therapeutic Applications. 2003:107-128.
119. Li X-M, Kanekal S, Crépin D, et al. Circadian pharmacology of L-alanosine (SDX-102) in mice. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(2):337-346.
120. Filipski E, Lemaigre G, Liu X-H, Méry-Mignard D, Mahjoubi M, Lévi F. Circadian rhythm of irinotecan tolerability in mice. *Chronobiol Int*. 2004;21(4-5):613-630.
121. Boughattas NA, Lévi F, Fournier C, et al. Circadian rhythm in toxicities and tissue uptake of 1,2-diamminocyclohexane(trans-1)oxalatoplatinum(II) in mice. *Cancer Res*. 1989;49(12):3362-3368.
122. Lévi F, Mechkouri M, Roulon A, et al. Circadian rhythm in tolerance of mice for etoposide. *Cancer Treat Rep*. 1985;69(12):1443-1445.
123. Giacchetti S, Cure H, Adenis A, et al. Chronomodulated (Chrono) irinotecan (CPT) versus standard (STD) infusion in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (MCC), a randomized multicenter trial. *Eur J Cancer*. 2001;37:S309.
124. Akgun Z, Saglam S, Yucel S, et al. Neoadjuvant chronomodulated capecitabine

- with radiotherapy in rectal cancer: a phase II brunch regimen study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014;74(4):751-756.
125. Giacchetti S, Li X, Ozturk N, et al. Abstract P4-06-06: Consistent dosing-time dependent tolerability of everolimus (EV) in a pilot study in women with metastatic breast cancers (MBC) and in a mouse chronopharmacology investigation. In: *Poster Session Abstracts*. Vol 77. American Association for Cancer Research; 2017:P4-06-06-P4-06-06.
 126. Chan S, Zhang L, Rowbottom L, et al. Effects of circadian rhythms and treatment times on the response of radiotherapy for painful bone metastases. *Ann Palliat Med.* 2017;6(1):14-25.
 127. JUSTICE RL. *Novartis Afinitor-Everolimus Report.*; 2012.
 128. Garnock-Jones KP, Keating GM. Everolimus: In advanced renal cell carcinoma. *Drugs.* 2009;69(15):2115-2124.
 129. Leighton JK. *Afinitor-Everolimus FDA Pharmacology/Toxicology Report.*; 2009.
 130. Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML. Rapamycin in transplantation: A review of the evidence. *Kidney Int.* 2001;59(1):3-16.
 131. Kovarik JM, Kaplan B, Tedesco Silva H, et al. Exposure-response relationships for everolimus in de novo kidney transplantation: defining a therapeutic range. *Transplantation.* 2002;73(6):920-925.
 132. O'Reilly T, McSheehy PMJ, Kawai R, et al. Comparative pharmacokinetics of RAD001 (everolimus) in normal and tumor-bearing rodents. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;65(4):625-639.
 133. Laplanche R, Meno-Tetang GML, Kawai R. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling of everolimus (RAD001) in rats involving non-linear tissue uptake. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2007.
 134. Chu C, Abbara C, Noël-Hudson MS, et al. Disposition of everolimus in *mdr1a*-/1b- mice and after a pre-treatment of lapatinib in Swiss mice. *Biochem Pharmacol.* 2009;77(10):1629-1634.
 135. Minocha M, Khurana V, Qin B, Pal D, Mitra AK. Co-administration strategy to enhance brain accumulation of vandetanib by modulating P-glycoprotein (P-

- gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) mediated efflux with m-TOR inhibitors. *Int J Pharm.* 2012.
136. Pawaskar DK, Straubinger RM, Fetterly GJ, et al. Physiologically based pharmacokinetic models for everolimus and sorafenib in mice. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013;71(5):1219-1229.
 137. Tang SC, Sparidans RW, Cheung KL, et al. P-glycoprotein, CYP3A, and plasma carboxylesterase determine brain and blood disposition of the mTOR Inhibitor everolimus (Afinitor) in mice. *Clin Cancer Res.* 2014;20(12):3133-3145.
 138. Üstünes L. *Everolimus-Certican Tablet. Rx MediaPharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı.* İzmir; 2019.
 139. Üstünes L. *Everolimus-Votubia Tablet. Rx MediaPharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı.* İzmir; 2019.
 140. Üstünes L. *Everolimus-Votubia Dağılılabılır Tablet. Rx MediaPharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı.* İzmir; 2019.
 141. Cao R, Lee B, Cho H-Y, Saklayen S, Obrietan K. Photic regulation of the mTOR signaling pathway in the suprachiasmatic circadian clock. *Mol Cell Neurosci.* 2008;38(3):312-324.
 142. Cao R, Obrietan K. mTOR Signaling and Entrainment of the Mammalian Circadian Clock. *Mol Cell Pharmacol.* 2010.
 143. Cao R, Li A, Cho H y., Lee B, Obrietan K. Mammalian Target of Rapamycin Signaling Modulates Photic Entrainment of the Suprachiasmatic Circadian Clock. *J Neurosci.* 2010.
 144. Cao R, Anderson FE, Jung Y-J, Dziema H, Obrietan K. Circadian regulation of mammalian target of rapamycin signaling in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience.* 2011;181:79-88.
 145. Cao R, Robinson B, Xu H, et al. Translational control of entrainment and synchrony of the suprachiasmatic circadian clock by mTOR/4E-BP1 signaling. *Neuron.* 2013; 79(4):712-24.
 146. Gupta R, Kondratov R V. Circadian Clocks and mTOR Signaling. Circadian Rhythms and Their Impact on Aging. 2017; 7:193-210.

147. Khapre R V., Patel SA, Kondratova AA, et al. Metabolic clock generates nutrient anticipation rhythms in mTOR signaling. *Aging (Albany NY)*. 2014; 6(8):675-89.
148. Khapre R V., Kondratova AA, Patel S, et al. BMAL1-dependent regulation of the mTOR signaling pathway delays aging. *Aging (Albany NY)*. 2014; 6(1):48-57.
149. He L, Hamm JA, Reddy A, et al. Biotinylation: a novel posttranslational modification linking cell autonomous circadian clocks with metabolism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;310(11):H1520-32.
150. Zhang D, Tong X, Arthurs B, et al. Liver clock protein BMAL1 promotes de novo lipogenesis through insulin-mTORC2-AKT signaling. *J Biol Chem*. 2014;289(37):25925-25935.
151. Lipton JO, Yuan ED, Boyle LM, et al. The Circadian Protein BMAL1 Regulates Translation in Response to S6K1-Mediated Phosphorylation. *Cell*. 2015;161(5):1138-1151.
152. Cornu M, De Caudron De Coquereaumont G, Hall MN. mTOR signaling in liver disease. In: *Signaling Pathways in Liver Diseases: Third Edition*. ; 2015.
153. Dräger K, Bhattacharya I, Pellegrini G, et al. Deletion of Rictor in brain and fat alters peripheral clock gene expression and increases blood pressure. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 2015;66(2):332-339.
154. Wu R, Dang F, Li P, et al. The Circadian Protein Period2 Suppresses mTORC1 Activity via Recruiting Tsc1 to mTORC1 Complex. *Cell Metab*. 2019;29(3):653-667.e6.
155. Greenhill C. Circadian protein affects mTORC1 activity. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(2):65.
156. Zhang Y, Giacchetti S, Parouchev A, et al. Dosing time dependent in vitro pharmacodynamics of Everolimus despite a defective circadian clock. *Cell Cycle*. 2018;17(1):33-42.
157. Zhang Y, Lévi F, Chang Y. Chronotherapy with defective circadian clock? *Aging (Albany NY)*. 2018; 10(4):520-521.
158. Ozturk N, Ozturk D, Pala-Kara Z, et al. The immune system as a chronotoxicity target of the anticancer mTOR inhibitor everolimus. *Chronobiol Int*. 2018;35(5).

159. Terada Y, Wada K, Matsuda S, et al. Circadian pharmacokinetics and limited sampling strategy of everolimus in heart transplant patients . *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2017;55(01):1-8.
160. Ohdo S. Chronotherapeutic strategy: Rhythm monitoring, manipulation and disruption. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(9-10):859-875.
161. Lemmer B. Chronobiology, drug-delivery, and chronotherapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2007;59(9-10):825-827.
162. Okamura H, Doi M, Fustin JM, Yamaguchi Y, Matsuo M. Mammalian circadian clock system: Molecular mechanisms for pharmaceutical and medical sciences. *Adv Drug Deliv Rev*. 2010;62(9-10):876-884.
163. Chen D, Cheng J, Yang K, Ma Y, Yang F. Retrospective analysis of chronomodulated chemotherapy versus conventional chemotherapy with paclitaxel, carboplatin, and 5-fluorouracil in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2013;6:1507-1514.
164. Mteyrek A, Filipski E, Guettier C, Okyar A, Lévi F. Clock gene Per2 as a controller of liver carcinogenesis. *Oncotarget*. 2016;7(52):85832-85847.
165. Mteyrek A, Filipski E, Guettier C, et al. Critical cholangiocarcinogenesis control by cryptochrome clock genes. *Int J cancer*. 2017;140(11):2473-2483.
166. Klumpen H-J, Beijnen JH, Gurney H, Schellens JHM. Inhibitors of mTOR. *Oncologist*. 2010;15(12):1262-1269.
167. Fasolo A, Sessa C. mTOR inhibitors in the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008;17(11):1717-1734.
168. Albert S, Serova M, Dreyer C, Sablin MP, Faivre S, Raymond E. New inhibitors of the mammalian target of rapamycin signaling pathway for cancer. *Expert Opin Investig Drugs*. 2010;19(8):919-930.
169. Lebwohl D, Anak O, Sahmoud T, et al. Development of everolimus, a novel oral mTOR inhibitor, across a spectrum of diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1291:14-32.
170. Holford N. Transl Clin Pharmacol TCP Absorption and Half-Life.

- 2016;24(4):157-160.
171. Okyar A, Kumar SA, Filipinski E, et al. Sex-, feeding-, and circadian time-dependency of P-glycoprotein expression and activity-implications for mechanistic pharmacokinetics modeling. *Sci Rep*. 2019;9(1): 10505.
 172. Su L, Jenardhanan P, Mruk DD, et al. Role of P-glycoprotein at the blood-testis barrier on adjuvin distribution in the testis: a revisit of recent data. *Adv Exp Med Biol*. 2012;763:318-333.
 173. Lentz KA. Current methods for predicting human food effect. *AAPS J*. 2008;10(2):282-288.
 174. Kovarik JM, Hartmann S, Figueiredo J, et al. Effect of Food on Everolimus Absorption: Quantification in Healthy Subjects and a Confirmatory Screening in Patients with Renal Transplants. *Pharmacotherapy*. 2002;22(2):154-159.
 175. Cheung W, Ligia C, Jappe A, Anak O. Pharmacokinetic (PK) profile of a single dose of everolimus (10 mg) administered with a low- or high-fat meal and under fasting conditions in healthy subjects. *J Clin Oncol*. 2011;29(15_suppl):e15080-e15080.
 176. Tam YK. Individual Variation in First-Pass Metabolism. *Clin Pharmacokinet*. 1993;25(4):300-328.
 177. Harris RZ, Jang GR, Tsunoda S. Dietary Effects on Drug Metabolism and Transport. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(13):1071-1088.
 178. Deferme S, Augustijns P. The effect of food components on the absorption of P-gp substrates: a review. *J Pharm Pharmacol*. 2003;55(2):153-162.
 179. Singh BN. Effects of Food on Clinical Pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet*. 1999;37(3):213-255.
 180. Zhang Y-KJ, Yeager RL, Klaassen CD. Circadian expression profiles of drug-processing genes and transcription factors in mouse liver. *Drug Metab Dispos*. 2009;37(1):106-115.
 181. Ohno M, Yamaguchi I, Ito T, Saiki K, Yamamoto I, Azuma J. Circadian variation of the urinary 6 β -hydroxycortisol to cortisol ratio that would reflect hepatic CYP3A activity. *Eur J Clin Pharmacol*. 2000;55(11-12):861-865.

182. Hernandez JP, Mota LC, Huang W, Moore DD, Baldwin WS. Sexually dimorphic regulation and induction of P450s by the constitutive androstane receptor (CAR). *Toxicology*. 2009;256(1-2):53-64.
183. Renaud HJ, Cui JY, Khan M, Klaassen CD. Tissue distribution and gender-divergent expression of 78 cytochrome p450 mRNAs in mice. *Toxicol Sci*. 2011;124(2):261-277.
184. Busaidy NL, Farooki A, Dowlati A, et al. Management of metabolic effects associated with anticancer agents targeting the PI3K-Akt-mTOR pathway. *J Clin Oncol*. 2012;30(23):2919-2928.
185. Laplante A, Demeule M, Murphy G., Béliveau R. Interaction of immunosuppressive agents rapamycin and its analogue SDZ-RAD with endothelial P-gp. *Transplant Proc*. 2002;34(8):3393-3395.
186. Koldehoff M, Beelen DW, Elmaagacli AH. Inhibition of mTOR with everolimus and silencing by vascular endothelial cell growth factor-specific siRNA induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma cells. *Cancer Gene Ther*. 2014;21(7):275-282.
187. Ying L, Zu-an Z, Qing-hua L, et al. RAD001 can reverse drug resistance of SGC7901/DDP cells. *Tumor Biol*. 2014;35(9):9171-9177.
188. Jacobsen W, Serkova N, Hausen B, Morris RE, Benet LZ, Christians U. Comparison of the in vitro metabolism of the macrolide immunosuppressants sirolimus and RAD. *Transplant Proc*. 2001;33(1-2):514-515.
189. Crowe A, Lemaire M. In vitro and in situ absorption of SDZ-RAD using a human intestinal cell line (Caco-2) and a single pass perfusion model in rats: Comparison with rapamycin. *Pharm Res*. 1998;15(11):1666-1672.
190. Ahowesso C, Piccolo E, Li XM, et al. Relations between strain and gender dependencies of irinotecan toxicity and UGT1A1, CES2 and TOP1 expressions in mice. *Toxicol Lett*. 2010;192(3):395-401.
191. Hirao J, Nishimura M, Arakawa S, et al. Sex and circadian modulatory effects on rat liver as assessed by transcriptome analyses. *J Toxicol Sci*. 2011;36(1):9-22.
192. Cui YJ, Cheng X, Weaver YM, Klaassen CD. Tissue distribution, gender-divergent expression, ontogeny, and chemical induction of multidrug resistance

- transporter genes (Mdr1a, Mdr1b, Mdr2) in mice. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(1):203-210.
193. Cao R, E Anderson F, Jung Y-J, Dziema H, Obrietan K. Circadian regulator of mTOR signaling in the mouse SCN. *Nac Institutes Heal.* 2012;181(614):79-88.
194. Fu L, Kettner NM. The circadian clock in cancer development and therapy. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013;119:221-282.
195. Ortiz-Tudela E, Iurisci I, Beau J, et al. The circadian rest-activity rhythm, a potential safety pharmacology endpoint of cancer chemotherapy. *Int J Cancer.* 2014;134(11):2717-2725.
196. Sancar A, Lindsey-boltz LA, Gaddameedhi S, et al. Circadian Clock, Cancer, and Chemotherapy. *Biochemistry.* 2015; 54(2):110-23
197. Li X-M, Mohammad-Djafari A, Dumitru M, et al. A circadian clock transcription model for the personalization of cancer chronotherapy. *Cancer Res.* 2013;73(24):7176-7188.

ETİK KURUL KARARI



**T.C.
BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ**

SAYI: 2015/ 253
KONU: Sn. Doç. Dr. Alper OKYAR

29.12.2015

Sayın, Doç. Dr. Alper OKYAR

"mTOR inhibitörü Everolimusun Faredeki Kronofarmakokinetiği" başlıklı projeniz 29.12.2015 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Doç. Dr. Emel AKHAS
Etik Kurul Başkan Vek.

Prof. Dr. Ahmet BELCE
Üye

Prof. Dr. Erdem AYŞAN
Üye

Prof. Dr. İsmail YILMAZ
Üye

Prof. Dr. Serdar ÜŞÜMEZ
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ömer ÜYSAL
Üye

Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN
Üye

Nasrullah GÜNAY
Üye

Hakan AKTÜRK
Üye

- Etik kurulumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.



**T.C.
BEZMÎÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ**

SAYI: 2015/ 125
KONU: Sn. Arş. Gör. Dilek ÖZTÜRK

07.05.2015

Sayın Arş. Gör. Dilek ÖZTÜRK,

“Zamana bağlı subakut everolimus uygulamasının P-glikoprotein mRNA ve protein düzeylerine etkisi” başlıklı projeniz 07.05.2015 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Doç. Dr. Fahri AKBAŞ
Etik Kurul Başkan Vek.

Prof. Dr. Ahmet BELCE
Üye

Prof. Dr. Erhan AYŞAN
Üye

Prof. Dr. İsmail MERAL
Üye

Prof. Dr. Serdar ÜŞÜMEZ
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL
Üye

Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN
Üye

Nasuhi GÜNAY
Üye

Hakan AKTÜRK
Üye

- Etik kurumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

mTOR İNHİBİTÖRÜ EVEROLİMUSUN FAREDEKİ KRONOFARMAKOKİNETİĞİ

ORIJINALLIK RAPORU

%**5**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**4**

İNTERNET
KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**3**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Dilek	Soyadı	Öztürk
Doğ.Yeri	Şumnu	Doğ.Tar.	05.04.1987
Uyruğu	TC	TC Kim No	14456419712
Email	dilekozturk05@gmail.com dozturk@bezmialem.edu.tr	Tel	+905366189502

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Doktora Programı	2014-2019
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Yüksek Lisans Programı	2012-2014
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2005-2010
Lise	Beyoğlu Anadolu Lisesi	2001-2005

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, İstanbul	2014-devam ediyor
2.	Klinik Araştırmalar	Neutec A.Ş. Ar-Ge Departmanı- İstanbul	2010-2012

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi	82,5 (YDS)	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office (Word, Excel, Power Point)	İyi
İstatistik Programları (Graphpad, SPSS)	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

SCI,SSCI,AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayınlanan Makaleler

- 1- Zengin Kurt B., Sönmez F., **Öztürk D.**, Akdemir A., Angeli A., Supuran C.T. “Synthesis of coumarin-sulfonamide derivatives and determination of their cytotoxicity, carbonic anhydrase inhibitory and molecular docking studies.” European Journal of Medicinal Chemistry, 2019; 183, 111702.
- 2- Avcı D., Altürk S., Sönmez F., Tamer Ö., Başoğlu A., Atalay Y., Zengin Kurt B., **Öztürk D.**, Dege N. “A new dinuclear copper (II) complex of 2,5– Furandicarboxylic acid with 4(5)-Methylimidazole as a high potential α -glucosidase inhibitor: Synthesis, Crystal structure, Cytotoxicity study, and TD/DFT calculations.” Applied Organometallic Chemistry, 2019; 33(3), e4725.
- 3- Ozturk N., **Öztürk D.**, Pala-Kara Z., Kaptan E., Sancar-Bas S., Ozsoy N., et al., "The immune system as a chronotoxicity target of the anticancer mTOR inhibitor everolimus.", Chronobiology International, 2018; 35(5), 705-718.
- 4- Ozturk N., **Öztürk D.**, Ozturk D., Pala-Kara Z., Okyar A., "Pharmacokinetics of talinolol is modified by barnidipine: Implication of P-glycoprotein modulation", Pharmazie, 2017; 72, 29-34.
- 5- Ozturk N., **Öztürk D.**, Kavaklı I., Okyar A., "Molecular Aspects of Circadian Pharmacology and Relevance for Cancer Chronotherapy.", International Journal of Molecular Sciences, 2017; 18(10), 2168.

Diğer Dergilerde Yayınlanan Makaleler

- 1- Kurtan Yüksel M., **Öztürk D.**, Öztaş E., Özhan G., Altanlar Türker A., Korkmaz T., Okyar A, Pala Kara Z. Evaluation of the association of SNP in carboxylesterase enzyme (CES1) with pharmacokinetic and adverse effects of capecitabine in breast and colorectal cancer patients. Istanbul Journal of Pharmacy, 2019; 49(2), 64 – 69.
- 2- Pala Kara Z., Öztürk N., **Öztürk D.**, Okyar A., "ABC taşıyıcı proteinleri: Sirkadiyan ritimler ve cinsiyete bağlı farklılıklar", Journal of Marmara University Institute of Health Sciences , 2013; 3, 1-13.

Hakemli Kongre / Sempozyumların Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

- 1- **Dilek Öztürk**, Işıl Gazioğlu, Alper Okyar. “A simple HPLC method for quantification of everolimus from mouse plasma and liver samples”. Euroanalysis XX Conference, İstanbul, Türkiye, 1-5 Eylül 2019.

2- **Dilek Öztürk**, Narin Ozturk, Y. Kubra Akyel, Zeliha Pala-Kara, Alper Okyar. "Circadian and sex-dependent pharmacokinetics of everolimus and implications of chronotherapy". XVI European Biological Rhythms Society Congress (EBRS), Lyon, Fransa, 25-29 Ağustos 2019.

3- **Zengin Kurt B.**, Çelebi G., **Öztürk D.**, Sonmez F., "Synthesis and Cytotoxic Activity of Coumarin-Thymol Derivatives", 2nd International Congress on Advances in BioScience and Biotechnology (ICABB), Montenegro, Karadağ, 26-30 Haziran 2018, pp.17-17.

4- Zengin Kurt B., Çelebi G., **Öztürk D.**, **Sonmez F.**, "Synthesis and Cytotoxic Activity of Coumarin-Carvacrol Derivatives and determination of CA-IX and CA-XII expressions", 4th Organic Chemistry Congress with International Participation, Antalya, Türkiye, 4-7 Ekim 2018, ss.ID-205-ID-205.

5- **Öztürk N.**, **Öztürk D.**, Pala Kara Z., Kaptan E., Sancar Baş S., Özsoy N., et al., "mTOR inhibitörü everolimusun sirkadiyan saat sistemi üzerine etkisi ve farelerdeki kronotoksitesi", 24. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Trabzon, Türkiye, 17-21 Ekim 2017, ss.10-10.

6- **Öztürk D.**, Öztürk N., Pala Kara Z., Kaptan E., Sancar Baş S., Özsoy N., et al., "Relevance of Dosing Time for Everolimus Toxicity on Thyroid Gland and Hormones in Mice", ICBMP 2017: 19th International Conference on Biomedicine and Medical Pharmacology, Lizbon, Portekiz, 17-18 Ağustos 2017, vol.4, no.8, pp.12-12.

7- **Ozturk N.**, **Öztürk D.**, Pala-Kara Z., Okyar A., "P-glycoprotein mediated pharmacokinetic interaction between talinolol and barnidipine", 7. European Congress of Pharmacology, İstanbul, Türkiye, 26-30 Haziran 2016, pp.57-57.

8- **Öztürk D.**, Öztürk N., Pala Kara Z., Kaptan E., Sancar Baş S., Çınar S., et al., "Chronotoxicity of Everolimus on the Immune System", 2016 Society for Research on Biological Rhythms Meeting, Palm Harbor, Florida, A.B.D., 21-25 Mayıs 2016, no.S28, pp.172-173.

9- **Öztürk N.**, **Öztürk D.**, Pala Kara Z., Kaptan E., Sancar Baş S., Li X.M. , et al., "Dosing-Time Dependent Reproductive Toxicity of Everolimus in Male Mice.", 2016 Society for Research on Biological Rhythms Meeting, Palm Harbor, Florida, A.B.D., 21-25 Mayıs 2016, no.S82, pp.208-208.

10- Ozturk N., Öztürk D., Pala-Kara Z., Kaptan E., Sancar Baş S., Çınar S., et al., "The circadian timing system as a toxicity target of the anticancer mTOR inhibitor everolimus in mice.", 7. European Congress of Pharmacology, İstanbul, Türkiye, 26-30 Haziran 2016, pp.30-30.

11- Öztürk D., Okyar A., "Circadian Rhythms and Chronopharmacology of Drugs", 2. IVEK Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi., İstanbul, Türkiye, 27-29 Kasım 2015, pp.0-0.

12- Öztürk D., Pala Kara Z., Okyar A., "P-glikoprotein substratı talinololün dişi ve erkek farelerdeki farmakokinetiği", 23. Ulusal Farmakoloji Kongresi, İstanbul, Türkiye, 7-10 Eylül 2015, ss.0-0.

13- Öztürk D., Pala Kara Z., Okyar A., "Talinolol ve Vinblastin Arasında Zamana Bağımlı Etkileşme Farklılığının in vivo İncelenmesi", 22. Ulusal Farmakoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 4-7 Kasım 2013, ss.0-0.

Sertifika, Kurs ve Eğitimler

1- 25. Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, Suna Duru Toplantısı, Türk Farmakoloji Derneği , 16-18 Mart 2016.

2- Moleküler Tıpta Kullanılan Teknikler Kursu, İstanbul Üniversitesi, 7-15 Nisan 2014.

3- Symposium on Pharmacoeconomics: Basic principles and valuation of health states, Türk Farmakoloji Derneği, 24 Mayıs 2013.

4- 22. Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Semineri, Ecz. Nezih Ulagay Toplantısı, Türk Farmakoloji Derneği, 4-6 Mart 2013.

5- XVth International Course on Chronopharmacology, Medical Faculty Mannheim Ruprecht-Karls-University Heidelberg, 29.7. – 2.8.2013.

6- Bilimsel Çalışmalarda İstatistiğin Rolü: Bilinmesi Gereken Yöntemler ve Uygulama Alanları, Harbiye Askeri Müzesi, İstanbul, 26-27 Mart 2012.

7- II. Hücre Ölümü Araştırma Teknikleri Teorik Kursu, Hücre Ölümü Derneği, 1-2 KASIM 2012.

8- İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, İstanbul Üniversitesi , 21 Mayıs- 01 Haziran 2012.

9- İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü Farmakovijilans Sertifikası, Sağlık Bakanlığı, 28 Kasım 2011.

Bilimsel, Dernek Organizasyon ve Kuruluşlardaki Üyelikler

1- European Biological Rhythm Society, Üye, 26.07.2019 - Devam Ediyor

2- Türk Farmakoloji Derneği, Üye, 01.09.2013 - Devam Ediyor



