

Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej

Studium Kształcenia Podyplomowego

mgr farm. Paulina Kapuścińska

Praca pogładowa w ramach specjalizacji farmacji klinicznej

„Rola chronoterapii w leczeniu onkologicznym”

Kierownik specjalizacji: mgr farm. Elwira Borecka

Wrocław 2022

Spis treści

1 Wstęp.....	1
2 Definicje i skróty	2
3 Zegar biologiczny	3
Molekularna budowa zegara biologicznego	4
4 Losy leku w organizmie a rytm dobowy	7
Adsorpcja	7
Dystrybucja	7
Metabolizm.....	8
Wydalenie.....	9
5 Leki cytostatyczne	9
6 Przykłady badań klinicznych.....	11
7 Podsumowanie	17
8 Piśmiennictwo	17

1 Wstęp

Rytm dobowe są jedną z podstawowych cech adaptacji organizmów żywych na naturalne zmiany następujące w otaczającym środowisku. Najprościej można je porównać do krzywej sinusoidalnej. Jej graficzna forma to płynna okresowa oscylacja. Opisana jest funkcją sinusoidalną, na którą składają się parametry: okres (czas mierzony pomiędzy każdą pojawiającą się oscylacją), amplituda (różnica między maksymalną a minimalną wartością na krzywej) i faza (wystąpienie maksymalnej i minimalnej wartości) [1,2].

Ludzki organizm działa jak dobrze skoordynowana maszyna, każdy element ze sobą współpracuje i jest od siebie zależny. Silnikiem napędzającym i sterującym cyklicznością procesów jest zegar biologiczny umiejscowiony w jądrach nadskrzyżaniowych zlokalizowanych u podstawy podwzgórza. W każdej komórce naszego ciała znajdują się komórki zegarowe pełniące funkcję podrzędne. Na pobudzenie zegara biologicznego mogą wpływać sygnały z zewnątrz (warunki środowiskowe jak: ciśnienie, temperatura, światło, obrót Ziemi w ciągu 24 godzin) mamy wtedy do czynienia z biorytmem egzogennym, albo z wewnątrz organizmu (czynniki wewnątrzustrojowe) – biorytm endogenny [3].

Z roku na rok zwiększa się liczba pacjentów onkologicznych, wynika to z lepszej wykrywalności, nawet we wczesnych stadiach chorób nowotworowych, większej świadomości społeczeństwa i łatwiejszego dostępu do informacji, a także większego nakładu finansowego na tą dziedzinę medycyny. Liczne badania kliniczne potwierdzają wpływ rytmu dobowego na skuteczność i bezpieczeństwo leczenia onkologicznego. Zależnie od pory dnia podania leków możemy wpływać na terapię i ograniczać działania niepożądane.

2 Definicje i skróty

Chronobiologia – dziedzina nauki o wpływie rytmów dobowych na funkcjonowanie organizmów żywych. Jej składowymi są chronofarmakologia i chronotoksyczność.

Chronotoksyczność – bada pojawienie się działań niepożądanych leków oraz ich natężenie w zależności od rytmu biologicznego.

Chronofarmakodynamika – jakościowe i ilościowe różnice w odpowiedzi organizmu na oscylacje dobowe.

Chronofarmakokinetyka – nauka skupiająca się na losach leków w organizmie w zależności od działania oscylatora – zegara biologicznego. Parametry farmakokinetyczne uzależnione od rytmiki okołodobowej to: biodostępność, dystrybucja, metabolizm i wydalanie.

Chronostezja – okołodobowa wrażliwość receptorów rejestrowana jako zmiana w ich strukturze. Błony komórkowe są przebudowywane poprzez sygnały ze środowiska zewnętrznego i wewnętrznego.

Chronergie – zmiany w sile działania leków na organizm pod wpływem okołodobowych rytmów [1].

Skrót	Znaczenie
6-MP	6-mercaptopurine
γ -H2AX	histone family member X
BcL-2	B-cell lymphoma 2
BMAL	brain and muscle arnt-like
CLOCK	circadian locomotor output cycles kaput
CRY	cryptochrome
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
CYP	cytochrome 450
DEC	dystrophin expressing chimeric
EGFR	epidermal growth factor receptor
EPH	epoxy hydrolase

ER α	estrogen receptor alpha
GST	glutathione S-transferase
HIF- α	hypoxia-inducible factor alpha
HIPEC	hyperthermic intraperitoneal chemotherapy
IFN- β	interferon beta
IGF	insulin-like growth factor
Ki-67	nuclear protein expressed in proliferating mammalian cells
KMT2D	lysine-specific methyltransferase 2D
MIC-1	minimum inhibitory concentration
MDR	multiple drug resistance
mTOR	mammalian target of rapamycin
MTX	methotrexate
NAT	N-acetyltransferase
NQO	quinine NAD (P) H oxidoreductase
OSCC	oral squamous cell carcinoma
PCA	patient controlled analgesia
PDGF	platelet-derived growth factor
PD-(L)1	programmed death, programmed death ligand
PER	period
PKTI	protein receptor tyrosine kinase inhibitor
PPAR α	peroxisome proliferator-activated receptor alpha
SCN	suprachiasmatic nucleus
SULT	sulfotransferase
UGT	uidine diphosphate glycosyltransferase
VEGF	vascular endothelial growth factor
TH17	T-helper 17
TLR9	toll-like receptor 9

3 Zegar biologiczny

Procesy zachodzące w organizmie żywym podlegają samoregującym się oscylacjom. Światło i ciemność to dwa podstawowe regulatory zegara biologicznego. Już w osiemnastym wieku obserwowano aktywność bakterii, roślin i zwierząt w zależności od zmienności warunków otoczenia np. oświetlenia [7], następnie wraz rozwojem medycyny i prowadzeniem kolejnych badań zidentyfikowano geny odpowiedzialne za utrzymanie rytmów dobowych. Wykryto również, że nie tylko czynniki zewnętrzne, ale również mutacje mogą zmieniać długość trwania cyklu dobowego [11]. W sytuacji przedłużającego się braku bodźców wpływających na pracę zegara na przykład mechanicznego uszkodzenia lub przebywanie przez dłuższy czas w ciemności może dochodzić do pojawienia się rytmów swobodnie biegnących (*free-running*, badania Aschoffa i in.) [12].

Tabela 1. Podział rytmów biologicznych ze względu na czas trwania [3].

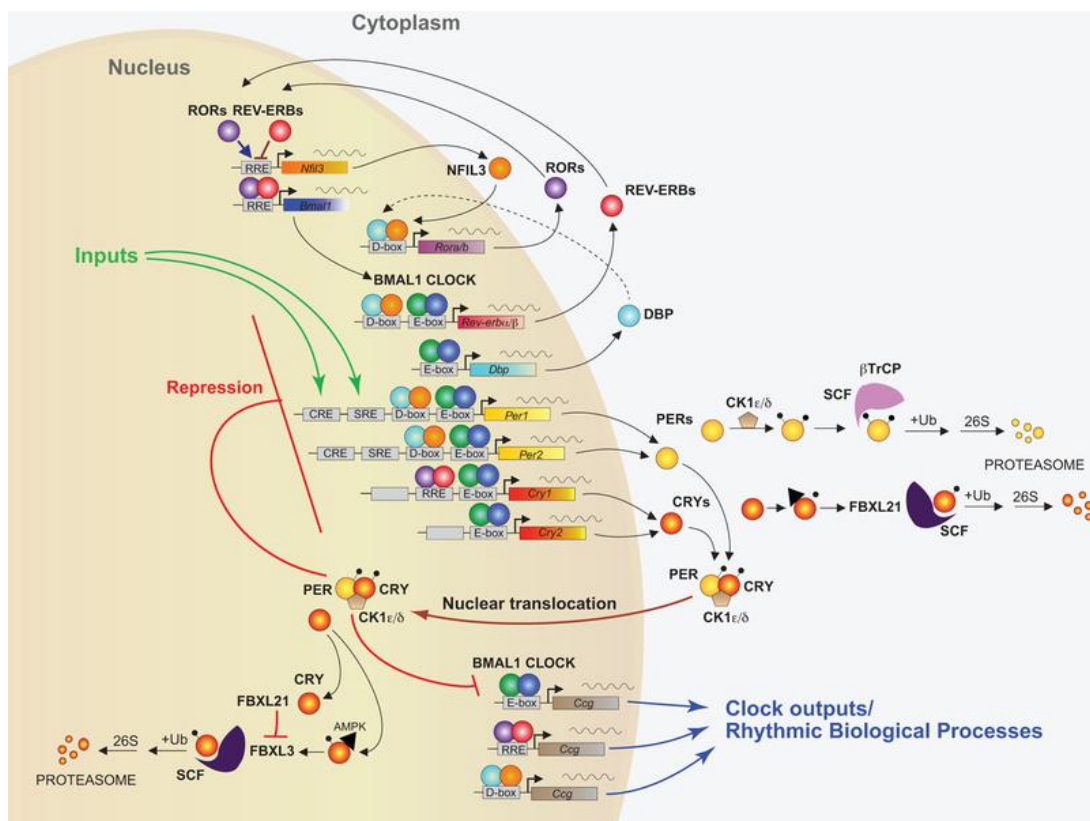
Rodzaj	Nazwa	Czas trwania	Przykład
Krótkookresowy	Oscylacja o wysokiej częstotliwości	sekundy	Elektrokardiogram Elektroencefalogram
Średniookresowy	Ultradialny	30 minut	Fazy snu
	Circadianny	20 – 28 godzin	Wydzielanie hormonów
	Infradianny	28 godzin do 7 dni	-
Długookresowy	Okołotygodniowy (Circasptan)	tydzień	Schemat pracy
	Okołomiesięczny (Circatrigintan)	miesiąc	Cykl menstruacyjny
	Okołoroczny (Circannual)	rok	Migracja Hibernacja

Molekularna budowa zegara biologicznego

Sygnaly światło/ciemność – czyli cyklicznie powtarzające się bodźce spowodowane obrotem Ziemi wokół własnej osi w ciągu 24 godzin nazywane są dawcami czasu – *Zeitgebers* (niem.) lub *Time Givers* (ang.). Ich działanie polega na wpływaniu na długość tego rytmu a nie samo w sobie tworzenie go. Dopasowują rytm biologiczny do zaistniałych warunków środowiska. Jądra nadskrzyżowaniowe podwzgórza (SCN – suprachiasmatic nucleus) to struktury ośrodkowego układu nerwowego pełniące nadrzędną funkcję zegara biologicznego. Zlokalizowane są w przedniej części podwzgórza, nad skrzyżowaniem nerwów wzrokowych po obu stronach trzeciej komory. Ich zadaniem jest regulacja rytmów fizjologicznych, behawioralnych i biochemicznych. Są swojego rodzaju endogennymi oscylatorami, nadawcami rytmu (*pacemakers*). W stałych warunkach otoczenia mają za cel umożliwić działanie samotrzymującego się rytmu aktywności [1, 2, 3, 8]

Działanie zegaru biologicznego jest uwarunkowane genetycznie poprzez ekspresję tzw. genów zegarowych, regulatorów transkrypcji które tworzą pętle sprzężenia zwrotnego. W połowie dwudziestego wieku odkryto pierwszy gen zegarowy – *period* u mutantów muszki owocowej *Drosophila melanogaster* (Konopka and Benzer, 1971, Smith and Konopka, 1981, Reddy i wsp., 1984) [18]. Dzięki temu badaniu odkryto, że każdy gen wykazuje rytm okołodobowy oraz białko PER reguluje ekspresje tego genu. Parę lat później w doświadczeniu nad myszami z zaburzeniami behawioralnymi wykryto pierwszy gen zegarowy u ssaków – *clock* [11].

Nadrzędny oscylator jest sterowany przez czynniki transkrypcyjne o charakterze regulatorów pozytywnych (włączających) i negatywnych (wyłączających). Czynnikiem o działaniu pobudzającym są białka CLOCK, BMAL1, które wpływają na ekspresję kryptochromów (CRY1 i CRY2). Powstała samoregulująca się sieć dwóch pętli transkrypcyjnej i transalcyjnej generujące rytm o stałym okresie. Negatywne regulatory ulegają w cytoplazmie chemicznym przemianom przechodzą do jądra, gdzie ostatecznie tłumią ekspresję własnych genów. Powstały heterodimer CLOCK/BMAL1 działa jako czynnik transkrypcyjny wywołujący ekspresję genów *Per* i *Cry*. Produktami tej reakcji są białka PERIOD i CRY regulowane przez kinazy serynowo-treoninowe i kinazę kazeinową. Gdy białka PERIOD i CRY osiągną w jądrze kulminacyjny poziom, rozpocznie się nowy cykl transkrypcji genów *Per*, *Cry* [5, 8, 13, 16].



Rys 1. Opracowano na podstawie: Kimberly H. Cox, Joseph S. Takahashi. Circadian Clock Genes and the Transcriptional Architecture of the Clock Mechanism. *J Mol Endocrinol.* 2019 Nov; 63(4): R93–R102.

Zegary obwodowe (peryferyjne) znajdujące się w organach wewnętrznych takich jak wątroba, gonady, jelito odbierają sygnały inne niż światło a są nimi: zmiany temperatury, stres, pokarm, wydzielanie hormonów. Za regulację na trasie: zegar biologiczny a zegary

obwodowe odpowiada autonomiczny układ nerwowy i oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczowa [15].

Na model zegara biologicznego składa się:

1. Właściwy zegar,
2. Szlaki aferentne doprowadzające sygnały do zegara ze środowiska:
 - Szlak siatkówkowo–podwzgórzowy. Światło jest jednym z podstawowych sygnałów, które odbiera w ludzkim organizmie wyspecjalizowany narząd jakim jest siatkówką, a właściwie komórki fotoreceptorowe. Pręciki i czopki pochłaniają i przekształcają sygnał fizyczny w neurochemiczny. Kryptochromy i melanosporyna pełnią rolę receptorów przekazujących promienie świetlne jako sygnał chronobiologiczny. Szlak budują aksony komórek zwojowych siatkówki a przekaźnikiem jest kwas glutaminowy.
 - Szlak kolankowato-podwzgórzowy. Rozpoczyna się od listka międzykolankowatego (w ciele kolankowatym bocznym) i biegnie do jądra nadskrzyżowaniowego. Neurotransmitterem jest tutaj neuropeptyd Y.
 - Szlak łączący twór siatkowaty. Przebiega od jądra środkowego i grzbietowego szwu z jądrem nadskrzyżowaniowym, gdzie nośnikiem chemicznym jest serotonina.
 - Szlaki neuronalne łączące przegrodę, hipokamp, podwzgórze i przedwzgórze z jądrem nadskrzyżowaniowym. Transportują informacje o środowisku wewnętrznym.
 - Szlaki neuronalne, łączą limbiczną część przodomózgowia z jądrem nadskrzyżowaniowym. Przekazują informację o stanie pobudzenia OUN.
3. Szlaki eferentne przekazujące sygnały z zegara do części efektorowych organizmu:
 - Oś połączenia z autonomicznym układem nerwowym – współczulnym i przywspółczulnym.
 - Oś połączenia neuronów jader nadskrzyżowaniowych z jądrami przykomorowymi podwzgórza, kontroluje wydzielanie hormonów przedniego i tylnego płata przysadki mózgowej.
 - Oś komunikująca z jądrami wzgórza
4. Zegary w tkankach obwodowych są połączone z oscylatorem nadrzędnym. Są regulowane poprzez dwa mechanizmy – autonomiczny układ nerwowy oraz oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczową [1, 3, 16].

4 Losy leku w organizmie a rytm dobowy

Liczne obserwacje i doświadczenia potwierdzają wpływ rytmów dobowych na parametry farmakokinetyczne przyjmowanego pokarmu i leków. Ksenobiotyki musi pokonać kolejne etapy wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu aby ostatecznie zostać wydany. Najistotniejszym z parametrów jest biodostępność która daje odpowiedź w postaci efektywności terapii i wystąpienia toksyczności.

Adsorpcja

Adsorpcja zależy od wydzielania kwasu solnego i pH soku żołądkowego, motoryki, szybkości perystaltyki i stopnia ukrwienia. W godzinach porannych jest lepszy przepływ krwi przez żołądek oraz szybsze jego opróżnianie a co za tym idzie lepsza biodostępność. Duże znaczenie ma również rodzaj pokarmu, jego struktura, skład chemiczny. Na przykład leki lipofilne podlegają rytmom dobowym, więc aby zwiększyć ich działanie poleca się podawanie ich przed południem. Udowodniono różnice we wchłanianiu w zależności od drogi podania leków. *Chrono-Drug Delivery Systems* to zaawansowane technologie leków uwalniające aktywne postacie leków i wykorzystujące rytmy dobowe. Układy te pozwalają na aplikację określonej dawki leku w ściśle określonym miejscu i czasie. Charakteryzują się specjalną budową strukturalną (np. kapsułki); wykorzystują prawa fizyki (osmoza, dyfuzja), działają pod wpływem bodźców (zmiana temperatury, pH, ultradźwięków, pola magnetycznego). Na uwagę zasługują parenteralne drogi podania np. PCA (Patient Controlled Analgesia) są to układy umożliwiające precyzyjne dostarczenie określonej dawki leku do miejsca docelowego wykorzystywane w analgezji pooperacyjnej. Innymi ciekawymi technologiami są [17]:

- CONTIN® (terapia astmy oskrzelowej),
- OROS® (wykorzystywana w leczeniu nadciśnienia tętniczego),
- TIMERx® (kontrolowane uwalnianie przy pomocy strategii mikroprocesorów),
- chronomodulujące pompy infuzyjne (podskórnie wszczepiana pompa z insuliną dla chorych z cukrzycą).

Dystrybucja

Przepływ krwi przez tkanki w organizmie oscyluje w okresie 24 godzin i zależy od układu przywspółczulnego oraz współczulnego. W dzień przeważa aktywność układu współczulnego, co też wiąże się ze zwiększonym przepływem krwi. Poziom białek osocza (albumin i globulin) zmienia się w zależności od pory dnia. Największy spadek albumin i

α 1-glikoproteiny notują się o północy. Badania donoszą o dziennych wahaniami stężenia kompleksów lek-białko. Porównywano poziom wolnej frakcji leku u uczestników w dwóch grupach wiekowych: zdrowych młodych i zdrowych w podeszłym wieku (powyżej 75 r. ż.). W drugiej grupie wykryto zależność zmian w stężeniu wolnej frakcji leku do wieku w godzinach nocnych. Kolejne badania pokazały, że P-glikoproteina uczestnicząca w eliminacji leków przez nerki, drogi żółciowe, jelitowe, będąca produktem genu oporności wielolekowej (MDR), transportująca pokarm i leki wykazuje 24-godzinną zmienność. Leki o wąskim indeksie terapeutycznym, dużej zdolności wiązania białek i małej objętości dystrybucji mogą wywołać niezamierzone toksyczne reakcje w związku z działaniem zegara biologicznego.

Metabolizm

Dobowe oscylacje wpływają na aktywność enzymów wątrobowych i przepływ krwi przez wątrobę, a co za tym idzie na klirens leków. Ksenobiotyki ulegają przemianom chemicznym w wątrobie pod wpływem enzymów. Mikrosomalne enzymy cytochromu CYP450 to enzymy I fazy. Lipofilne ksenobiotyki ulegając utlenieniu, redukcji lub hydrolizie i przekształcają się w związki bardziej hydrofilowe. Enzymy sprzęgające – faza II to sulfotransferazy (SULT), UDP-glukuronotransferazy (UGT), oksydoreduktazy NAD(P)H chininowe (NQO), hydrolazy epoksydowe (EPH), S-transferazy-glutationowe (GST) i N-acetylotransferazy (NAT). W II fazie biotransformacji zmodyfikowane podczas reakcji ksenobiotyki są sprzęgane z niektórymi reaktywnymi metabolitami ustrojowymi, stają się lepiej rozpuszczalnymi w wodnym środowisku płynów ustrojowych i łatwiej są wydalane z moczem. Enterocytarne układy transportujące, III faza – dzięki aktywności układów transportujących, stężenie ksenobiotyków we wnętrzu enterocytów maleje, co przyczynia się również do redukcji ilości substancji toksycznych doprowadzanych do wątroby za pośrednictwem zwrotnego układu krążenia. Receptory proliferatorów peroksysomów α (PPAR α) utrzymują poziom homeostazy lipidów i glukozy. Induktorami tych receptorów mogą być fibraty obniżające poziom lipidów, plastyfikatory estrów ftalanów, endogenne kwasy tłuszczowe, które aktywują ekspresję enzymów CYP3A i 5-difosfo-glukuronozylotransferazy urydyny (UGT). Badania wykazały, że PPAR kontrolują rytm dobowy i wpływają na metabolizm kwasów tłuszczowych, lipidów i cholesterolu. Zakłócenia w pracy genów lub działanie czynników zewnętrznych i wewnętrznych prowadzą do zaburzenia stanu energetycznego, który jest obserwowany w takich chorobach jak: zespół metaboliczny, otyłość, dyslipidemia, nadciśnienie, czy cukrzyca.

Wydalanie

Filtracja kłębuszkowa, pH moczu, resorpcja cewkowa oraz przepływ krwi przez nerki wykazują okresowe zmiany dobowe. Wspomniana już wcześniej P-glikoproteina będąca transporterem leków również w nerkach odgrywa znaczącą rolę w chronoterapii.

Ordynując leki wiemy, że ważna jest nie tylko dawka i droga, ale również pora podania. Objawy chorób takich jak zawał mięśnia sercowego, astma, czy choroba wrzodowa pojawiają się dokładnie w odpowiedniej fazie dnia. Obniżona czynność płuc u pacjentów z astmą objawia się w porannych godzinach, dlatego należy edukować chorych o istotnym aspekcie – czasie podania leku. Pacjenci cierpiący na chorobę wrzodową powinni przyjmować wieczorem leki z grupy antagonistów receptorów H_2 , ponieważ wydzielanie żołądkowe osiąga swój szczyt w nocy. Niesteroidowe leki przeciwzapalne zaleca się podawać rano i po południu aby wyciszyć objawy bólowe u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów. Najwyższe ciśnienie krwi notuje się rano, dlatego właśnie wtedy zdarzają się przypadki zawału czy udaru [14, 19, 22].

5 Leki cytostatyczne

Podział leków cytostatycznych ze względu na mechanizm działania:

1. Alkilujące – tworzą wiązania chemiczne ze strukturami komórek nowotworowych (DNA, RNA, enzymy, białka) poprzez alkilację. Działają niezależnie od fazy, ale swoiście dla cyklu komórkowego szybko dzielących się komórek nowotworowych jak i zdrowych, są stosowane w terapii nowotworów układu krwiotwórczego, nerwowego, guzów litych, mięsaków. Przykładami są:
 - pochodne platyny: cisplatyna, carboplatyna, oksaliplatyna,
 - pochodne nitromocznika: karmustyna, bendamustyna,
 - pochodne iperytu azotowego: cyklofosfamid, ifosfamid,
 - pochodne etylenoiminy: tiotepa,
 - triazeny: temozolomid, dakarbazyna,
 - estry kwasu sulfonowego: busulfan.
2. Antymetabolity – ich budowa przypomina budowę związków chemicznych biorących udział w funkcjonowaniu komórek nowotworowych, głównie biosyntezę kwasów nukleinowych i reakcje enzymatyczne. Leki z tej grupy są swoiste od fazy S cyklu

komórkowego. Wykorzystywane są w w leczeniu guzów szybko rosnących. Dzielimy na:

- inhibitory tetrahydrogenazy folianowej: pemetrexed, metotreksat,
 - antymetabolity pirymidynowe: cytarabina,
 - antymetabolity purynowe: fludarabina, 5-fluorouracyl,
 - analog nukleozydów: gemcytabina.
3. Inhibitory wrzeciona mitotycznego – zaburzają podział jądra komórkowego. Do podgrup należą:
- taksoidy – hamują reorganizację sieci mikrotubul w fazie G2 i w fazie mitozy, a potem powodują apoptozę komórki: paclitaksel, docetaksel,
 - alkaloidy barwinka różowego *Vinca rosea* – są swoiste w fazie M cyklu komórkowego: winkrystyna, winorelbina, winblastyna.
4. Antracykliny – grupa antybiotyków wytwarzanych przez szczepy *Streptomyces* lub na drodze syntezy chemicznej. Skwalifikowano je jako grupa ze względu na wspólną komponentę budulcową, są pochodnymi antrachinonu. Wykazują różne mechanizmy działania zmieniając strukturę błony komórkowej, niszczą strukturę DNA, generują wolne rodniki.
- I generacja: doksorubicyna, daunorubicyna
 - II generacja: idarubicyna, epirubicyna.
5. Inhibitory topoizomerazy I i II – wpływają na wewnątrzkomórkowe enzymy – topoizomerazy odpowiedzialne za replikację DNA komórek nowotworowych
- inhibitory topoizomerazy I: ironotekan, topotecan
 - inhibitory topoizomerazy II: etopozyd [24].
6. Leki ukierunkowane molekularnie (celowane) – działanie chemioterapeutyków jest spersonalizowane i skierowane na konkretny punkt uchwytu genu, lub białka w komórkach nowotworowych. Wystąpienie działań niepożądanych jest rzadsze w porównaniu do klasycznych cytostatyków jednak też się je odnotowuje i są bardziej selektywne np. leki, których miejscem docelowego działania jest receptor naskórkowego czynnika wzrostu dają uboczne skutki w postaci odczynów skórnych
- przeciwciała monoklonalne wytwarzane na drodze biotechnologii posiadające w swojej budowie fragmenty białek mysich mają, wtedy w nazwie końcówkę -momab (tositumomab); białek chimerycznych zawierających do 90% białek

ludzkich -symab (rituksymab); powyżej 90% białek ludzkich -zumab (trastuzumab).

- inhibitory kinaz: pośrednio wpływające na procesy regulacyjne komórek m.in. fosforylacji białek np. erlotynib, lapatynib, imatynib.
7. Hormonoterapia – leki pobudzają lub hamują aktywność określonych hormonów, posiadają duży wkład w leczenie raka tarczycy, prostaty czy piersi, cechuje się wysoką skutecznością i dobrą tolerancją. Przykładem takiego leki jest tamoksifen.
 8. Immunoterapia – dynamicznie rozwijająca się grupa leków, której celem jest mobilizacja układu odpornościowego do walki z chorobą nowotworową. Wymienić można tutaj ipilimumab, niwolumab czy pembrolizumab. W praktyce polega na wykorzystaniu przeciwciał monoklonalnych przeciw antygenom nowotworowym do pobudzenia odpowiedzi immunologicznej [26].

6 Przykłady badań klinicznych

Wykorzystanie chronofarmakokinytyki daje korzyści diagnostyczne i umożliwia skuteczniejsze leczenie chorób. Rytm aktywność/spoczynek można mierzyć za pomocą urządzenia noszonego na nadgarstku nazywanym aktygrafem. Prowadzenie obserwacji przy jego użyciu jest nieinwazyjne i nie obciąża dodatkowo pacjentów z chorobą nowotworową.

Badania dowodzą że istnieje zależność między zegarami dobowymi a aktywnością komórek nowotworowych. Onkogeneza może zaburzać rytm, pobudzając lub osłabiając go. Działanie przeciwnowotworowe poprzez podaż leku w określonym czasie może zmniejszyć skutki uboczne – powstanie toksycznych metabolitów albo zmęczenie [26]. Tradycyjne schematy leczenia nie uwzględniają indywidualnych cech chorego, dlatego badane są biomarkery i struktury molekularne jak na przykład BMAL. Rozregulowane geny mogą prowadzić do progresji raka i wpływać na przyżywalność. Ekspresja BMAL może być związana z rozwojem raka płaskonabłonkowego jamy ustnej (OSCC). Ekspresja CLOCK w komórkach glejaka o wysokiej złośliwości wzrasta w porównaniu do komórek o niskiej złośliwości i nieglejakami w guzach mózgu poprzez zmienioną reaktywność mRNA [27].

W innym badaniu zaobserwowano zmniejszoną ilość PER2 i BMAL1 w raku płaskonabłonkowym głowy i szyi oraz w raku nosogardzieli [28]. U pacjentów z czernakiem skóry [29] i gruczolakorakiem okrężnicy [30] odnotowano mniejszą ilość BMAL1, CRY1, CRY2, PER1, PER2, i PER3, a większą ilość CLOCK. Poziom CLOCK i CRY2 spada a

BMAL1 i CRY3 wzrasta po porównaniu materiału pobranego od chorych na pęcherzykowego raka tarczycy, brodawkowego raka tarczycy a zdrowymi osobami [31]. PER2 jest 15-krotnie wyższe w izolowanych guzach przełyku z przerzutami [32]. W raku piersi jest zwiększona reaktywność receptora estrogenowego α (ER α) powiązanego ze zróżnicowanym embionalnym receptorem chondrogennym 1 (DEC1) co za tym idzie zwiększoną ekspresją CLOCK. Nadekspresja DEC1 w raku przełyku, przewodów trzustkowych pokazała powiązany wzrost ekspresji MIC-1, czynnika apoptozy aktywowanego przez białko p53 [33]. W zależności od ekspresji genów zegarowych na różne nowotwory może być inny wpływ na rokowania pacjentów. Chorzy na raka kory nadnerczy, gruczolakoraka okrężnicy notują niski poziom BMAL1, który wiąże się z wyższym wskaźnikiem przeżycia w ciągu 5 lub 10 lat. W czerniaku skóry, raku nerkowato-brodawkowatym nerki sytuacja jednak jest odwrotna. Natomiast u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym płuc, czy rakiem urotelialnym pęcherza moczowego nie ma interakcji między poziomem BMAL1 a przeżywalnością [5, 22].

W innym badaniu (Tang i wsp.) w różnych punktach czasowych mierzono ekspresję BMAL u pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym języka w połączeniu z deksametazonem [34]. Wyniki wskazały cykliczne odchylenia stężenia BMAL oraz zjawisko resetowania rytmu okołodobowego, odzwierciedlone przez zmniejszoną amplitudę oscylacji i krótszą fazę. W liniach komórek mysiego nowotworu sutka w porównaniu z normalnymi tkankami oscylacje poziomy Per1 wykazywały rytm dobowy z 2,5-krotną amplitudą. Jednak w wątrobie ekspresja Per1 i Per2 była opóźniona o 4 godziny [35].

Proliferacja w komórkach nowotworowych jest inna niż w zdrowych komórkach. Najwyższy wskaźnik proliferacji występuje w komórkach szpiku kostnego i osiąga szczyt w drugiej połowie nocy do wczesnego poranka, natomiast komórki nowotworowe najaktywniej ulegają podziałom w pierwszej połowie nocy. Zmiany okołodobowe w proliferacji są zsynchronizowane ze zmianami cyklu komórkowego. Odchylenia od normy w przekazywaniu sygnału od płytkopochodnego czynnika wzrostu (PDGF) mogą wpływać na aktywność regulatorów cyklu komórkowego i przesunięcia w fazach cyklu np. przejście w fazę spoczynku w czasie fazy proliferacji. Ma to swoje zastosowanie w chemioterapii; leki antymitotyczne, które wykazują swoistość fazową celowane w fazę G2/M hamują rytm dobowy komórek złośliwych. Reset PER1 w komórkach nowotworowych jest związany ze zwiększoną ekspresją genu proliferacji Ki-67. Geny zegarowe mogą modulować procesy apoptotyczne. Zmiana w ilości onkogenu chłoniaka-2 z komórek B (BCL-2) może być sygnałem w procesie zaprogramowanej śmierci komórek oraz być miejscem docelowym

promieniowania gamma γ [36]. Kolejne badanie dowiodło, że zahamowane PER blokuje ekspresję BCL-2 i wpływa na apoptozę guza [37]. Leki działające na fazy podziału to m.in. metotreksat, 5-fluorouracyl, winblastyna, doksorubicyna, etopozyd, irinotekan, paklitaksel, docetaksel.

Badacze (Srivastava i wsp.) wykazali, że modulacja dynamiki tubuliny i mikrotubuli oddziałuje z czynnikiem wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) i czynnikiem indukowanym niedotlenieniem- α (HIF- α) w celu zmniejszenia objętości raka sutka myszy o 48,2% [38].

Procesy w zdrowych komórkach dążą do zachowania homeostazy pomiędzy aktywnością telomerazy a replikacją. Ekspresja telomerazy jest regulowana przez geny zegarowe. Jednym z nich jest gen PER1, zaangażowany w naprawę DNA, przyczynia się do zatrzymania faz G1/S i G2/M. Odpowiedź na uszkodzenia DNA przez komórki nowotworowe jest inna od odpowiedzi normalnych komórek.

W czasie progresji guza komórki nowotworowe rozregulowują zapotrzebowanie energetyczne. Dochodzi do wzrostu glikolizy tlenowej i lipogenezy w organizmie a następnie zachodzą procesy utlenienia kwasów tłuszczowych i synteza metioniny, która również podlega rytmom dobowym. W przewlekłej białaczce limfocytowej obserwuje się wysoki poziom krążącego pirogronianu i glutaminianu we krwi. Terapia celowana w gen KMT2D odpowiedzialnego za aktywację genów regulujących insulinopodobny czynnika wzrostu (IGF) może przyczynić się do stopowania glikolizy jako metody walki z nowotworem [4].

Zawartość glutationu w wątrobie jest prawdopodobnie wyższa w drugiej połowie ciemnego okresu cyklu światło/ciemność. Hamowanie syntezy glutationu może zmienić tolerancję na oksaliplatynę i cisplatynę. Poziom UGT jest wyższy w okresie ciemności u myszy i może wpływać na działanie selicylibu i irynotekanu. Określenie optymalnego czasu ekspresji określonych enzymów lub transporterów może poprawić działanie lecznicze leków przeciwnowotworowych [4].

W badaniu prowadzonym przez Okazaki i wsp. wykorzystano myszy z nowotworami jako model. Dowiedziono, że wskaźnik przeżywalności u myszy był wyższy, gdy ewerolimus był podawany o 19:00 niż o 7:00 rano [39]. Działanie przeciwnowotworowe interferonu (IFN)- β u myszy wykazujących aktywność nocą było mniej skuteczne we wczesnej fazie aktywacji niż we wczesnej fazie spoczynku [40]. Mesylan imatynibu (50 mg/kg) będąc

inhibitorem kinazy tyrozynowej receptora białkowego (PKTI) podawany we wczesnej fazie światła wpływa na zmniejszenie się wzrostu guza [41].

Inhibitorem EGFR w raku piersi jest lapatynib, którego działanie również zależy do rytmów. Poprawia on przeżywalność pacjentów z nowotworami, gdy jest podawany pacjentom z nadekspresją mTOR, we wczesnej fazie ciemności [39]. Erlotynib, inhibitor EGFR w raku płuc wykazuje działanie przeciwnowotworowe skuteczniej w hamowaniu wzrostu guza, gdy jest podawany we wczesnej fazie światła, niż w ciemnej fazie rytmu okołodobowego, kiedy to wzrasta aktywność EGFR i jego dalsze czynniki [42].

Tabela 2. Korelacja leków cytostatycznych a rytmów dobowych [4]

Grupa	Lek	Nowotwór	Harmonogram podania
Antymetabolity	5-fluorouracyl	Rak okrężnicy	04:00
	Gemcytabina	Kostniakomięsak	3-dniowa przerwa
	Kapecytabina	Nowotwory odbytnicy	08:00 i 12:00
Inhibitory topoizomerazy	Irinotecan	Nowotwory jelita grubego	05:00
	Topotecan	Rak piersi	03:00
Inhibitory kinazy mTOR	Ewerolimus	Rak nerkowokomórkowy	19:00
Inhibitory receptora kinazy tyrozynowej	Imatynib	Mięsak, czerniak	Wczesna faza światła
	Lapatynib	Mięsak, czerniak	Wysoka ekspresja kinazy tyrozynowej
Cytokiny	Interferon- α	Czerniak	Od 12:00 do 04:00
	Interferon- γ	Czerniak	16:00
	Interleukina-2	Wątrobiak	Cykl dobowy
Alkilujące	Cisplatyna	Niedrobnokomórkowy rak płuc	06:00 i 18:00
	Carboplatyna	Niedrobnokomórkowy rak płuc	20:00
	Oxaliplatyna	Rak okrężnicy	16:00
	Cyklofosfamid	Białaczka	11:00
Taksany (inhibitory mitotyczne)	Docetaksel	Rak gruczołu krokowego	Druga połowa dnia
	Winorelbina	Białaczka	Druga połowa dnia
Inhibitory cyklu komórkowego	Seliciclib	Kostniakomiesak	Wczesna faz światła
	Paclitaksel	Rak płaskonabłonkowy języka	Nadekspresja BMAL1
Inhibitory cyklooksygenazy-2	Celekoksyb	Rak piersi	Od 05:00 do 13:00
Radioterapia	Promieniowanie- γ	Rak odbytnicy	08:00 i 12:00
Hormony	Tamoksifen	Rak piersi	08:00 i 13:00 i 20:00
Antracykliny	Doksorubicyna	Rak gruczołu krokowego	Druga połowa dnia

Rejestrowane zmiany temperatury ciała, wydzielania hormonów, rytmy autonomicznego układu nerwowego, uwalniania cytokin i aktywności spoczynkowej są nazywane biomarkerami dobowego systemu pomiaru czasu (CTS). W szczególności temperatura jest istotnym parametrem wykorzystywanym w chronoterapii. Człowiek posiada 24-godzinny cykl zmian temperatury i aktywności spoczynkowej. W badaniu klinicznym (Lévi i wsp., 2010) pacjenci z nowotworami szyjki macicy, płuc zostali losowo podzieleni na kilka grup, następnie otrzymywali tę samą radioterapię, ale w różnych temperaturach ciała. Gdy naświetlania były stosowane w szczytowej temperaturze ciała, dochodziło do zablokowania wzrostu komórek nowotworowych. Aktywność spoczynkowa, temperatura ciała, poziom kortyzolu w ślinie, poziom katecholamin w osoczu i melatoniny, ma statystycznie istotne i spójne rytmy u pacjentów z wczesnym lub zaawansowanym stadium okrężnicy, płuc, jajników, piersi, prostaty lub nowotworów głowy i szyi [43].

Levi i wsp. badali skuteczność wlewów zmodyfikowanych chronobiologicznie do standardowej infuzji stałej. Podawano chronomodulowany wlew 5-fluorouracylu z leukoworyną o godzinie 4:00, a oksaliplatynę o godzinie 16:00. Ten trzylekowy schemat zaaplikowany w konkretnych porach dnia dał 58% odsetek odpowiedzi u 93 pacjentów z przerzutowym rakiem jelita grubego. W innym badaniu stwierdzono, że podanie 50% dawki kapecytabiny o godzinie 8:00 i 50% dawki o północy z radioterapią zmniejsza wystąpienia zespołu dłoniowo-podeszwowego, małopłytkowości, biegunki i zapalenia błon śluzowych [44]. U pacjentek leczonych na raka jajnika lub pęcherza moczowego w badaniu fazy II udowodniono lepszą tolerancję po porannym wlewie doksorubicyny i po wieczornym wlewie cisplatyny [45].

Badanie prowadzone przez Noh i wsp. gdzie 395 pacjentów podzielono na dwie grupy, pierwszą poddano radioterapii wczesnym rankiem a drugą wczesnym wieczorem. Stwierdzono, że w grupie leczonej wczesnym rankiem wystąpiły znacznie słabsze ostre reakcje skórne w porównaniu z grupą chorych leczoną wieczorem [4,7].

W badaniu Kireeva i wsp. wykorzystano 45 szczurów z przeszczepionym rakiem jajnika. Zwierzęta podzielono losowo na pięć grup: kontrolna, HIPEC z cisplatyną o godzinie 08:00, HIPEC z cisplatyną o 20:00, cisplatyną podaną o 08:00 i cisplatyną podaną o 20:00. Oceniono szybkość proliferacji guza i nabłonka jelita cienkiego, apoptozę w nabłonku jelita cienkiego oraz poziom γ -H2AX (marker uszkodzenia/naprawy DNA) w nerkach i wątrobie. Odkryto, że zwiększona proliferacja komórek nowotworowych w jajniku zaburza codzienne

zmiany w nabłonku jelitowym i powoduje stres genotoksyczny w tkankach wolnych od guza. HIPEC z cisplatiną o godzinie 08:00 miał lepszy profil skuteczności/toksyczności niż HIPEC z cisplatiną przy podaniu o godzinie 20:00 oraz od podań cisplatyny niezależnie od obu punktów czasowych [20].

Rivard i wsp. od 1976 do 1984 roku leczyli 118 dzieci z powodu ostrej białaczki limfoblastycznej, a następnie prowadzili obserwacje do 1991 roku. Otrzymywały one codziennie 6-merkaptopurynę (6-MP), cotygodniowo metotreksat (MTX) oraz comiesięcznie winkrystynę i prednizon. Podzielono je na dwie grupy ze względu na porę dnia podania leków. 82 dzieci przyjmowało 6-MP i MTX rano, a 36 dzieci wieczorem. Na podstawie analizy Kaplana-Meiera określono przeżycie wolne od choroby i było ono lepsze u pacjentów z wieczorną chemioterapią. Analiza regresji wykazała, że u pacjentów, którzy przeżyli bez choroby dłużej niż 78 tygodni, ryzyko nawrotu było 2,56 razy większe dla schematu dawkowania o porannej porze niż dla wieczornej [21].

Okres półtrwania cisplatyny we krwi jest krótki i trwa około 4 godzin dlatego, podawanie jej gdy komórki są na nią najbardziej wrażliwe, może mieć znaczenie dla skuteczności chemioterapii. Wykorzystanie cisplatyny do leczenia raka przełyku w badaniach dawało pozytywny wynik gdy ekspresja PER2 jest niska. Regulatory apoptozy białek DEC1 i DEC2 hamują aktywację promotora białka PER1, które wpływa na odpowiedź na cisplatinę w kilku rodzajach nowotworów, w tym w ludzkich liniach komórkowych w raku płaskonabłonkowym przełyku [6].

Małe cząsteczki, których punktem uchwytu są receptory okołodobowe, wpływające na ekspresję białek BMAL1 mogą okazać się wzmocniacze immunoterapii anty-PD-(L)1. Istnieją jeszcze ograniczone dane przedkliniczne (Cash i wsp.) sugerujące, że ekspresja białka BMAL1 może wpływać na adiuwantów immunologicznych TLR9 i sygnały z receptorów CTLA-4. W komórkach TH17 białka BMAL1 i inne sygnały wpływające na zmianę biorytmu kontrolują równowagę między limfocytami T efektorowymi i regulatorowymi. Niestety nie wiemy jeszcze czy białka BMAL1 może być wiarygodnym wskaźnikiem wyniku terapeutycznego anty-CTLA-4 lub wpływać na skuteczność agonisty receptora TLR9, gdy jest stosowane samodzielnie lub w połączeniu z immunoterapią anty-PD-(L)1 [23].

7 Podsumowanie

Zależności między chronofarmakokinetyką a chronofarmakodynamiką można wykorzystać do stworzenia optymalnych schematów podawania leków gdzie główną determinantą będzie pora dnia lub nocy. Byłyby komórkowymi lub farmakologicznymi modelami o potencjale terapeutycznym oparty na rytmie okołodobowym w onkologii. Dzisiaj wiemy już, że najbezpieczniejszą porą dla antracyklin są wczesne godziny ranne, antymetabolity-należy przyjmować– w fazie wczesnego snu, a pochodne platyny powinny być stosowane wieczorem. Zasadniczo wykorzystanie chronobiologii w leczeniu poprawia skuteczność, tolerancję leków przeciwnowotworowych i potencjalnie może zmniejszyć koszty finansowe. W wyżej wymienionych badaniach klinicznych przedstawiono przykłady korzyści w postaci współczynnika przeżycia, polepszenia jakości życia pacjentów w trakcie leczenia przez zmniejszenie działań ubocznych. Temat chronoterapii cieszy się dużym zainteresowaniem, wciąż pojawiają się nowe publikacje. Wykorzystanie biorytmu w walce z nowotworami może być przyszłością chemioterapii. Sama idea nie jest niestety wolna od wad jak choćby problem zaburzenia rytmów biologicznych u pacjentów w postępującym stadium choroby nowotworowej. Ze względu na różnice międzypersonalne w populacji sugeruje się opracowywanie chemioterapii opartej na spersonalizowanych biomarkerach. Wykorzystanie zegarów okołodobowych może stać się podstawą leczenia onkologicznego.

8 Piśmiennictwo

- [1] T. Małkiewicz, M. Roman, A. Tarczyńska *Rola chronobiologii we współczesnej praktyce klinicznej, ze szczególnym uwzględnieniem terapii bólu* Anestezjologia i Ratownictwo 2012; 6: 463-474
- [2] I. Andrys-Wawrzyniak, A. Jabłecka *Chronobiologia, chronofarmakologia i ich miejsce w medycynie (Część II)* Farmacja Współczesna 2008; 1: 156-168
- [3] I. Andrys-Wawrzyniak, A. Jabłecka *Chronobiologia, chronofarmakologia i ich miejsce w medycynie (Część I)* Farmacja Współczesna 2008; 1: 94-108
- [4] J. Zhou, J. Wang, X. Zhang, Q. Tang *New Insights Into Cancer Chronotherapies*, Front Pharmacol. 2021; 12: 741295doi: 10.3389/fphar.2021.741295
- [5] S. A. Patel, R. V. Kondratov *Clock at the Core of Cancer Development* Biology (Basel). 2021 Feb; 10(2): 150.doi: 10.3390/biology10020150.
- [6] J. A. Redondo, R. Bibes, A. Vercauteren Drubbel, B. Dassy, X. Bisteau, E. Maury, B. Beck *PER2 Circadian Oscillation Sensitizes Esophageal Cancer Cells to Chemotherapy* Biology (Basel). 2021 Apr; 10(4): 266.doi: 10.3390/biology10040266.

- [7] E. Szutowicz-Zielińska, K. Matuszewska, J. Jassem *Rola dobowych rytmów biologicznych w leczeniu chemicznym nowotworów* NOWOTWORY 2000 / tom 50 Zeszyt 3 / 287–292
- [8] Marie-Christine Mormont, Ph.D. F. Levi, M.D., Ph.D. *Cancer Chronotherapy: Principles, Applications, and Perspectives* CANCER January 1, 2003 / Volume 97 / Number 1 156-69doi: 10.1002/cncr.11040.
- [9] Yiran AoQin ZhaoKai YangGang ZhengXiaoqing LvXiaoLi Su *A role for the clock period circadian regulator 2 gene in regulating the clock gene network in human oral squamous cell carcinoma cells*Oncol Lett 2018 Apr;15(4):4185-4192.doi: 10.3892/ol.2018.7825. Epub 2018 Jan 19.
- [10] Hrushesky WJM, Bjarnason GA. *Circadian cancer therapy*. J Clin Oncol 1993; 11: 1403-1417. doi: 10.1200/JCO.1993.11.7.1403.
- [11] Ralph MR, Menaker MA. *Mutation of the circadian system in golden hamsters*. Science 1988; 241: 1225-1227. doi: 10.1126/science.3413487
- [12] Aschoff J. *Circadian rhythms in man*. Science 1965; 148: 1427-32. doi: 10.1126/science.148.3676.1427.
- [13] Kimberly H. CoxJoseph S. Takahashi *Circadian Clock Genes and the Transcriptional Architecture of the Clock Mechanism*J Mol Endocrinol. 2019 Nov; 63(4): R93–R102.doi: 10.1530/JME-19-0153.
- [14] Gaspar L, Álvaro AR, Carmo-Silva S, Mendes AF, Relógio A, Cavadas C. *The importance of determining circadian parameters in pharmacological studies*. Br J Pharmacol. 2019;176:2827–2847. doi: 10.1111/bph.14712. Epub 2019 Jul 6.
- [15] 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;62:904-17. doi: 10.1016/j.addr.2010.05.009.
- [16] Ł. Chrobok, M.H.Lewandowski. *Wielooscylatorowa teoria mechanizmu zegara biologicznego ssaków* Kosmos Problemy Nauk Biologicznych 2020,69,Nr 1, (326),91-103
- [17] Mandal AS, Biswas N, Karim KM, Guha A, Chatterjee S, Behera M, et al. *Drug delivery system based on chronobiology – A review*. J Controll Release 2010;147:314-25. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.07.122.
- [18] B. Biliska, B. Doktor, E. Pyza, *Rytmy biologiczne i mechanizm zegara okołodobowego w mózgu Nagroda Nobla 2017* Wszechświat, t. 1189, nr 1–3/2018
- [19] P. Erkekoglu,T. Baydar, *Chronopharmacokinetics of drugs in toxicological aspects: A short review for pharmacy practitioners*, J Res Pharm Pract.2012 Jul-Sep; 1(1): 3–9.doi: 10.4103/2279-042X.99670
- [20] G. Kireeva, E. Gubareva, M. Maydin, V. Osetnik, S. Kruglov, A. Panchenko, A. Dorofeeva, M. Tyndyk, E. Fedoros, V. Anisimov, *Efficacy and Safety of Systemic and Locoregional Cisplatin Chronotherapy in Rats with Ovarian Carcinoma*, Onco Targets Ther. 2021; 14: 3373–3381. doi: 10.2147/OTT.S309285
- [21] G. E Rivard, C. Infante-Rivard, M. F. Dresse, J. M. Leclerc, J. Champagne, *Circadian time-dependent response of childhood lymphoblastic leukemia to chemotherapy: a long-term follow-up study of survival*, Chronobiol Int 1993 Jun;10(3):201-4.doi: 10.3109/07420529309073888.
- [22] J. Bicker,G. Alves,A. Falcão,A. Fortuna, *Timing in drug absorption and disposition: The past, present, and future of chronopharmacokinetics*, Br J Pharmacol. 2020 May; 177(10): 2215–2239. doi: 10.1111/bph.15017

- [23] E. Cash, S. Sephton, C. Woolley, A. M. Elbehi, Anu R. I., B. Ekine-Afolabi, V. C. Kok, *The role of the circadian clock in cancer hallmark acquisition and immune-based cancer therapeutics*, Journal of Experimental & Clinical Cancer Research volume 40, 119 (2021)
- [24] J. Huszno, E. Nowara, *Pharmacokinetics and pharmacogenetics in breast cancer patients systemic treatment*, Onkol. Prak. Klin. 2010; 6, 4: 159–170
- [25] P. Wysocki, *Immunoonkologia*, ViaMedica 2019, wyd. 2
- [26] G. Sulli, M. Tun Yin Lam, S. Panda, *Interplay between Circadian Clock and Cancer: New Frontiers for Cancer Treatment*, Trends Cancer. 2019 Aug;5(8):475-494.doi: 10.1016/j.trecan.2019.07.002
- [27] A. Li, X. Lin, X. Tan, B. Yin, W. Han, J. Zhao, J. Yuan, B. Qiang, X. Peng, *Circadian gene Clock contributes to cell proliferation and migration of glioma and is directly regulated by tumor-suppressive miR-124*, FEBS Lett. 2013 Aug 2;587(15):2455-60. doi: 10.1016/j.febslet.2013.06.018
- [28] L. Hou, H. Li, H. Wang, D. Ma, J. Liu, L. Ma, Z. Wang, Z. Yang, F. Wang, H. Xia *The circadian clock gene PER2 enhances chemotherapeutic efficacy in nasopharyngeal carcinoma when combined with a targeted nanosystem*, J Mater Chem B. 2020 Jun 24;8(24):5336-5350
- [29] L. V. Monteiro de Assis, G. S. Kinker, M. N. Moraes, R. P. Markus, P. A. Fernandes, A. M. de Lauro Castrucci, *Expression of the Circadian Clock Gene BMAL1 Positively Correlates With Antitumor Immunity and Patient Survival in Metastatic Melanoma*, Front Oncol. 2018 Jun 12;8:185 doi: 10.3389/fonc.2018.00185.
- [30] B. K. Neilsen, D. E. Frodyma, J. L. McCall, K.W. Fisher, R. E. Lewis, *ERK-mediated TIMELESS expression suppresses G2/M arrest in colon cancer cells*, PLoS One. 2019 Jan 10;14(1) doi: 10.1371/journal.pone.0209224.
- [31] R. Malaguarnera, C. Ledda, A. Filippello, F. Frasca, V. C. Francavilla, T. Ramaci, M. Ch. Parisi, V. Rapisarda, S. Piro, *Thyroid Cancer and Circadian Clock Disruption*, Cancers (Basel. 2020 Oct 24;12(11) doi: 10.3390/cancers12113109.
- [32] S. Li, X. Qin, S. Chai, Ch. Qu, X. Wang, Helin Zhang, *Modulation of E-cadherin expression promotes migration ability of esophageal cancer cells*, Sci Rep. 2016 Feb 22;6
- [33] Q. Xu, P. Ma, Ch. Hu, L. Chen, L. Xue, Z. Wang, M. Liu, H. Zhu, N. Xu, N. Lu, *Overexpression of the DECI1 protein induces senescence in vitro and is related to better survival in esophageal squamous cell carcinoma*, PLoS One. 2012;7(7) doi:10.1371/journal.pone.0041862
- [34] Q. Tang, B. Cheng, M. Xie, Y. Chen, J. Zhao, X. Zhou, L. Chen, *Circadian Clock Gene Bmal1 Inhibits Tumorigenesis and Increases Paclitaxel Sensitivity in Tongue Squamous Cell Carcinoma*, Cancer Res. 2017 Jan 15;77(2):532-544. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1322.
- [35] X. Yang, P. A. Wood, Ch. M. Ansell, D. F. T. Quiton, E. Oh, J. Du-Quiton, William J. M. Hrushesky, *The circadian clock gene Per1 suppresses cancer cell proliferation and tumor growth at specific times of day*, Chronobiol Int. 2009 Oct;26(7):1323-39. doi: 10.3109/07420520903431301.
- [36] T. G. Granda, X. Liu, R. Smaaland, N. Cermakian, El. Filipinski, P. Sassone-Corsi, F. Lévi, *Circadian regulation of cell cycle and apoptosis proteins in mouse bone marrow and tumor*, FASEB J. 2005 Feb;19(2):304-6. doi: 10.1096/fj.04-2665fje.
- [37] Han-Xue Li, *The role of circadian clock genes in tumors*, Onco Targets Ther. 2019 May 13;12:3645-3660doi: 10.2147/OTT.S203144.

- [38] A. Srivastava, K. Fatima, E. Fatima, A. Singh, A. Singh, A. Shukla, S. Luqman, K. Shanker, D. Chanda, F. Khan, A. S. Negi, *Fluorinated benzylidene indanone exhibits antiproliferative activity through modulation of microtubule dynamics and antiangiogenic activity*, Eur J Pharm Sci. 2020 Nov 1;154
- [39] H. Okazaki, N. Matsunaga, T. Fujioka, F. Okazaki, Y. Akagawa, Y. Tsurudome, M. Ono, M. Kuwano, S. Koyanagi, S. Ohdo, *Circadian regulation of mTOR by the ubiquitin pathway in renal cell carcinoma*, Cancer Res. 2014 Jan 15;74(2):543-51. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3241. Epub 2013 Nov 19.
- [40] H. Takane, S. Ohdo, T. Yamada, E. Yukawa, S. Higuchi, *Chronopharmacology of antitumor effect induced by interferon-beta in tumor-bearing mice*, J Pharmacol Exp Ther. 2000 Aug;294(2)
- [41] H. Nakagawa, T. Takiguchi, M. Nakamura, A. Furuyama, S. Koyanagi, H. Aramaki, S. Higuchi, S. Ohdo, *Basis for dosing time-dependent change in the anti-tumor effect of imatinib in mice*, Biochem Pharmacol. 2006 Nov 15;72(10):1237-45. doi: 10.1016/j.bcp.2006.08.002.
- [42] X. Li, A. M.-Djafari, M. Dumitru, S. Dulong, E. Filipinski, S. Siffroi-Fernandez, A. Mteyrek, F. Scaglione, C. Guettier, F. Delaunay, F. Lévi, *A circadian clock transcription model for the personalization of cancer chronotherapy*, Cancer Res. 2013 Dec 15;73(24):7176-88. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1528. Epub 2013 Oct 23
- [43] F. Lévi, A. Okyar, S. Dulong, P. F. Innominato, J. Clairambault, *Circadian timing in cancer treatments*, Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2010;50:377-421doi: 10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094626.
- [44] Z. Akgun, S. Saglam, S. Yucel, Z. Gural, E. Balik, G. Cipe, S. Yildiz, S. Kilickap, A. Okyar, E. Kaytan-Saglam, *Neoadjuvant chronomodulated capecitabine with radiotherapy in rectal cancer: a phase II brunch regimen study*, Cancer Chemother Pharmacol. 2014 Oct;74(4):751-6doi: 10.1007/s00280-014-2558-x. Epub 2014 Aug 8.
- [45] P. F. Innominato, F. A. Lévi, G. A. Bjarnason, *Chronotherapy and the molecular clock: Clinical implications in oncology*, Adv Drug Deliv Rev. 2010 Jul 31;62(9-10):979-1001doi: 10.1016/j.addr.2010.06.002.