



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Mind the time : 24-hour rhythms in drug exposure and effect

Kervezee, L.

Citation

Kervezee, L. (2017, January 10). *Mind the time : 24-hour rhythms in drug exposure and effect*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/45325>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/45325>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/45325> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Kervezee, Laura

Title: Mind the time : 24-hour rhythms in drug exposure and effect

Issue Date: 2017-01-10



SUMMARY
SAMENVATTING
CURRICULUM VITAE
LIST OF PUBLICATIONS
DANKWOORD

SUMMARY

Organisms across all kingdoms of life have evolved an endogenous timing system that entrains them to the 24-hour light-dark cycles present on the Earth. This allows them to anticipate to daily, predictable changes in the environment, such as variations in light intensity, temperature and food availability.

At the single-cell level, this so-called circadian timing system is regulated by a transcriptional/ translational feedback loop that generates 24-hour rhythms in gene expression levels in nearly all cell types. In mammals, synchronization of these cell-autonomous rhythms is coordinated by neuronal and humoral signals from the suprachiasmatic nuclei (SCN) in the hypothalamus. The rhythms generated by the SCN are entrained to the environmental light/dark cycle by photic input that is transmitted from the retina to the SCN.

Because of the circadian timing system, many physiological processes, including those involved in the absorption, distribution, metabolism, elimination, pharmacodynamics and toxicity of therapeutic drugs, show profound fluctuations over the course of the day, leading to time-of-day dependent changes in the exposure and effect of drugs. Chronopharmacology is the discipline that investigates the effect of daily variations in physiology on the exposure, therapeutic effect and toxicity of drugs.

In **Chapter 1**, it was discussed that the field of chronopharmacology could benefit from the development of a systematic approach to analyse and integrate the findings obtained in the many studies that investigate the effect of time of day on drug exposure and effect. PKPD modelling was introduced as a promising approach that could overcome some of the limitations encountered within this field of research.

As described in **Chapter 2**, the aim of this thesis was to provide a structured framework for the analysis of chronopharmacological studies, while touching upon several critical issues encountered during the development and optimization of new and existing drug treatments. The general approach taken in this thesis was put forward in Chapter 2, which consists of 1) the use of model compounds; 2) a strict study design with sufficient number of dosing times; and 3) the use of PKPD modelling.

The clinical trial described in **Chapter 3** was designed to study 24-hour variation in the pharmacokinetics of midazolam, a benzodiazepine used in the treatment of insomnia and a model compound to study CYP3A-mediated metabolism. Midazolam was administered to twelve healthy male subjects at six different time-points throughout the 24-hour cycle in a randomized crossover design. A semi-simultaneous dosing regimen was used in which oral and intravenous dosing was combined in order to assess all pharmacokinetic parameters within one study occasion. It was found that oral bioavailability and absorption rate constant showed considerable daily variation, while the clearance of midazolam showed minor fluctuations over the day and night. Using simulations, it was shown that time of drug administration affects concentration-time profiles after oral dosing but not after

intravenous dosing. This indicates that 24-hour variation in CYP3A-mediated metabolism is of limited clinical relevance, while time-of-day dependency in absorptive processes does influence the exposure to midazolam.

The aim of the clinical trial described in **Chapter 4** was to identify potential 24-hour variation in the pharmacokinetic parameters of an oral dose of levofloxacin administered to twelve healthy male subjects. The pharmacokinetic properties of levofloxacin are characterized by solubility and permeability-independent absorption and passive renal elimination. We found that the absorption rate constant could be described as a cosine function with a period of 24 hours, a relative amplitude of 47% and a peak around 8:00 in the morning. Other pharmacokinetic parameters, including clearance, did not show significant daily variation. Despite the variation in absorption rate constant of levofloxacin, simulations of a once-daily dosing regimen show that the exposure and maximal concentration, two parameters important for the effectiveness of levofloxacin as an antibiotic, are not affected by time of drug administration. From these findings, we concluded that in terms of its pharmacokinetics, levofloxacin can be dosed without taking into account time of day. However, these findings are relevant for drugs with similar physicochemical properties as levofloxacin but with a narrower therapeutic index.

In the clinical trial described in Chapter 4, the effect of levofloxacin on the QT interval, a read-out of ventricular repolarization on the electrocardiogram, was also recorded. It is known that levofloxacin, like many other cardiac and non-cardiac drugs, slightly prolongs the QT interval due to an inhibitory action on a type of potassium channel in cardiomyocytes. This is a negative side-effect of many drugs, which, in combination with other predisposing factors, can lead to cardiac arrhythmias and death. However, it was unknown whether the magnitude of the effect of levofloxacin on the QT interval depends on the time of drug administration. In **Chapter 5**, the effect of time of day on the relationship between the concentration of levofloxacin and length of the QT interval was explored. A pharmacokinetic-pharmacodynamic model was developed to account for variations in pharmacokinetics, heart rate and daily variation in baseline QT. It was found that the effect of levofloxacin on the QT interval varies considerably and systematically over the course of the day. As a result, clinical trial simulations show that levofloxacin-induced QT prolongation depends on dosing time, with the largest effect predicted at 14:00 and the smallest effect at 06:00. These findings indicate that current approaches to assess drug-induced QTc prolongation, in which drugs are typically administered in the morning, may be biased and potentially misjudge the risk to patients.

Knowledge of a drug's concentration at the target site is an important aspect in the development and optimization of pharmacological treatments, especially when their target is in tissues that are hard to reach, such as the central nervous system. In addition to the structural protection provided by the tightly connected cells of the blood-brain barrier, the central nervous system is also protected by specialized efflux transporters such as P-glycoprotein. These efflux transporters function to expel potentially toxic molecules, including therapeutic drugs, from the brain back into the blood. The objective of the study

described in **Chapter 6** was to determine 24-hour variation in the distribution of the P-gp substrate quinidine to the brain. After administration of an intravenous dose of quinidine at six separate time-points in a pre-clinical animal model, we found that the exposure to quinidine in the brain is affected by time of drug administration, but only when P-gp transport is fully functional. Subsequent intracerebral microdialysis experiments and data analysis using physiologically-based pharmacokinetic modelling revealed that this time-of-day dependency is primarily due to higher activity of P-gp mediated transport from the deep brain compartment to the plasma compartment during the night. This study shows that taking into account time of day may be an important determinant of drug distribution to the brain and thereby offers a potential novel strategy to optimize drug treatments targeted at the brain.

In **Chapter 7**, daily variation in the blood and brain pharmacokinetics of morphine, a substrate of various transporters that are expressed in the blood-brain barrier, were studied in a preclinical animal model. The use of two inhibitors of the transporters that affect morphine exposure allowed us to determine the relative contribution of active and passive processes in the pharmacokinetic parameters. It was found that the active processes that regulate the clearance of morphine and its metabolite M3G from plasma shows considerable 24-hour variation. Moreover, the efflux of morphine from the brain back into the blood is characterized by a 24-hour rhythm. The lowest efflux occurs at the two light-dark transitions. Simulations reveal that as a result of this, the exposure to morphine in the brain and to M3G in plasma depends on the time of drug administration. We conclude that time of day is a source of variation in the systemic pharmacokinetics and brain distribution of morphine, which may partly explain the daily rhythms in its analgesic properties that have been reported in earlier studies.

The research described in this thesis was discussed in **Chapter 8**. Taken together, these studies show that time of day can present a considerable source of variation in the pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of a drug, which can be identified and quantified through modelling and simulation. Understanding the effect of time of day on the exposure and effect of drugs is required to account for this source of variation. More importantly, chronopharmacological aspects should not be overlooked in order to benefit from the systematic fluctuations in physiological processes during the development and optimization of drug treatments.

SAMENVATTING

Organismen in alle rijken van het leven hebben een intern tijdssysteem ontwikkeld dat hen aanpast aan de 24-uurs licht-donker cyclus op aarde. Deze biologische klok zorgt ervoor dat ze kunnen anticiperen op de dagelijkse, voorspelbare veranderingen in hun omgeving, zoals schommelingen in lichtintensiteit, temperatuur en in de beschikbaarheid van voedsel.

Op het niveau van de cel wordt dit zogenoemde circadiane systeem gereguleerd door een moleculair terugkoppelingsmechanisme dat 24-uurs ritmes genereert in genexpressie niveaus. In zoogdieren worden deze cel-autonome ritmes gecoördineerd door neuronale, endocrine and paracrine signalen vanuit de suprachiasmatische nuclei (SCN) in de hypothalamus. Deze door de SCN gegenereerde ritmes worden gesynchroniseerd met de licht-donker cyclus in de omgeving door middel van lichtsignalen die via het netvlies wordt doorgegeven aan de SCN.

Door het bestaan van het circadiane systeem vertonen veel fysiologische processen, waaronder processen die betrokken zijn bij de opname, verdeling, afbraak, uitscheiding, effect en toxiciteit van medicijnen, grote verschillen gedurende de loop van de dag. Dit leidt tot tijdsafhankelijke veranderingen in de blootstelling en effectiviteit van geneesmiddelen. Chronofarmacologie is de wetenschappelijke discipline die het effect van dagelijkse ritmes in fysiologie op de blootstelling, therapeutisch effect en toxiciteit van medicijnen bestudeert.

In **Hoofdstuk 1** werd gesteld dat er binnen de chronofarmacologie behoefte is aan de ontwikkeling van een systematische aanpak om de bevindingen van de vele studies naar het effect van het tijdstip van de dag op de blootstelling en het effect van medicijnen te analyseren en te integreren. Farmacokinetisch/farmacodynamisch modeleren werd in dit hoofdstuk naar voren gebracht als een veelbelovende aanpak die enkele beperkingen binnen de chronofarmacologie kan wegnemen.

Zoals beschreven in **Hoofdstuk 2** was het doel van dit proefschrift om een structureel raamwerk te creëren om de resultaten van chronofarmacologische onderzoeken te kunnen analyseren, terwijl we enkele belangrijke kwesties aanstippen die van belang zijn in de ontwikkeling en optimalisatie van nieuwe en bestaande medicinale behandelingen. De algemene aanpak die is gebruikt in dit proefschrift werd beschreven in Hoofdstuk 2, welke bestaat uit 1) het gebruik van modelstoffen; 2) een strikte studieopzet met een voldoende aantal doseertijdstippen en 3) het gebruik van farmacokinetisch/farmacodynamisch modelleren.

Het doel van de klinische studie beschreven in **Hoofdstuk 3** was om 24-uurs variatie in de farmacokinetiek van midazolam te bestuderen in twaalf gezonde mannelijke proefpersonen. Midazolam is een slaapmiddel dat wordt gebruikt voor de behandeling van slapeloosheid en is een modelstof om CYP3A-gemedieerd metabolisme te bestuderen. Op zes verschillende tijdstippen gedurende de dag en nacht werd midazolam oraal en intraveneus semi-simultaan toegediend om alle farmacokinetische parameters te kunnen meten binnen één studiedag. De resultaten wijzen uit dat de biologische beschikbaarheid

en de absorptie snelheidsconstante grote verschillen vertonen afhankelijk van het tijdstip van de dag, terwijl de klaring van midazolam beperkte schommelingen vertoont over de loop van de dag. Door middel van simulaties toonden we aan dat het tijdstip van toedienen de concentratie-tijd profielen alleen beïnvloedt na orale dosering, maar niet intraveneuze toediening. Dit wijst erop dat 24-uurs variatie in CYP3A-gemedieerd metabolisme beperkte klinische relevantie heeft, terwijl tijdsafhankelijke variatie in de processen betrokken bij absorptie wel van invloed zijn op de blootstelling aan midazolam.

Het doel van het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 4** was om 24-uurs variatie in de farmacokinetiek van een orale dosis levofloxacin te onderzoeken in twaalf gezonde mannelijke proefpersonen. De farmacokinetische eigenschappen van dit medicijn worden gekenmerkt door absorptie die onafhankelijk is van de oplosbaarheid en permeabiliteit en door passieve renale klaring. Onze resultaten lieten zien dat de absorptie snelheidsconstante kon worden beschreven door een cosinus functie met een periode van 24 uur, een relatieve amplitude van 47% en een piek om 8 uur 's ochtends. Andere farmacokinetische parameters, waaronder klaring, vertoonden in dit onderzoek geen significante variatie over de tijd van de dag. Ondanks de variatie in de absorptie snelheidsconstante van levofloxacin lieten simulaties van een eenmaal-daags doseerschema zien dat de blootstelling aan en de maximale concentratie van levofloxacin, twee parameters die van belang zijn voor de effectiviteit van het middel als antibiotica, niet worden beïnvloed door het tijdstip van de dag. Op basis van deze bevindingen hebben we geconcludeerd dat levofloxacin gedoseerd kan worden zonder rekening te houden met het tijdstip van de dag, in ieder geval wat betreft de farmacokinetiek. Desalniettemin zijn deze resultaten van belang voor medicijnen met vergelijkbare fysicochemische eigenschappen als levofloxacin maar met een nauwere therapeutische index.

In de klinische studie beschreven in Hoofdstuk 4 hebben we ook het effect van levofloxacin op het QT interval gemeten. Het QT interval is een marker voor ventriculaire repolarisatie dat is af te lezen van het electrocardiogram. Het is bekend dat levofloxacin, net als veel andere medicijnen, het QT interval in beperkte mate verlengt omdat het een kaliumkanaal in de hartspiercellen blokkeert. Dit is een negatieve bijwerking van veel geneesmiddelen, dat in combinatie met andere risicofactoren in zeldzame gevallen kan leiden tot aritmie en hartdood. Het was onbekend of het effect van levofloxacin op het QT interval afhangt van het tijdstip van de dag. In **Hoofdstuk 5** hebben we het effect van het tijdstip van de dag op de relatie tussen de concentratie van levofloxacin en de lengte van het QT interval onderzocht. Een farmacokinetisch-farmacodynamisch model is ontwikkeld om te kunnen controleren voor variaties in de farmacokinetiek, hartslag en 24-uurs ritmes in de basislijn van het QT interval. We vonden dat het effect van levofloxacin op het QT interval grote en systematische variatie vertoont over de loop van de dag. Uit het gebruik van simulaties blijkt dat, als een gevolg van deze variatie, levofloxacin-geïnduceerde QT interval verlenging afhangt van het tijdstip waarop de medicatie wordt toegediend. Het grootste effect wordt voorspeld om 14:00 uur en het kleinste effect om 6:00 uur. Uit deze bevindingen blijkt dat huidige aanpak waarmee het effect van medicijnen op het QT interval

wordt onderzocht kan leiden tot een onjuiste beoordeling van het risico voor de patient.

Kennis verwerven van de concentratie van medicijnen op de plek waar ze hun effect uitoefenen is een belangrijk aspect voor de ontwikkeling en optimalisatie van farmacologische behandelingen. Dit geldt met name wanneer hun doelgebied zich bevindt op een plek die voor medicijnen moeilijk te bereiken is, zoals de hersenen. Naast de structurele bescherming die geboden wordt door de bloed-hersen barrière, worden de hersenen ook beschermd door gespecialiseerde efflux transporter-eiwitten zoals P-glycoproteïne (P-gp). Deze transporters pompen potentieel giftige stoffen, zoals medicijnen, uit de hersenen terug naar het bloed. Het doel van het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 6** was om de 24-uurs variatie te bepalen in de verdeling van het P-gp substraat quinidine naar de hersenen. In een preklinische diermodel hebben we gevonden dat de blootstelling aan quinidine in de hersenen na intraveneuze toediening afhankelijk is van het tijdstip van de dag. Vervolgens hebben we intracerebrale microdialyse experimenten uitgevoerd en de data geanalyseerd door middel van semi-fysiologisch modelleren. Uit deze experimenten bleek dat de tijdsafhankelijke transport van quinidine naar de hersenen wordt veroorzaakt door een hogere activiteit in P-gp gemedieerd transport van hersenweefsel naar plasma tijdens de nacht. Deze resultaten laten zien dat het tijdstip van de dag een belangrijke rol speelt bij de verdeling van P-gp substraten naar de hersenen. Dit biedt een potentiële nieuwe strategie om de dosering van medicijnen voor hersenziektes te optimaliseren.

In **Hoofdstuk 7** hebben we de 24-uurs variatie in bloed- en brein farmacokinetiek van morfine in een preklinisch dier model onderzocht. Morfine is een substraat voor verschillende transport eiwitten die tot expressie komen in de bloed-hersenbarrière. Het gebruik van twee stoffen die de activiteit van deze transport eiwitten remmen stelde ons in staat om de relatieve bijdrage van actief en passief transport van de farmacokinetische processen te onderzoeken. We vonden dat de actieve processen die betrokken zijn bij de regulatie van de klaring van morfine en de metaboliet M3G vanuit plasma aanzienlijke 24-uurs variatie vertoont. Bovendien blijkt dat de efflux van morfine uit de hersenen terug naar het bloed gekenmerkt wordt door een 24-uurs ritme met de minste efflux tijdens de schemerperiodes. Simulaties laten zien dat als een gevolg hiervan de blootstelling aan morfine in de hersenen en aan M3G in plasma afhangt van het tijdstip waarop morfine wordt toegediend. Hieruit kan geconcludeerd worden dat het tijdstip van de dag een bron van variatie is in de farmacokinetiek van morfine. Dit kan een verklaring zijn voor de dag- en nachtritmes die zijn gevonden in de pijnbestrijdende effecten van morfine die zijn waargenomen in eerdere onderzoeken.

Het onderzoek dat wordt beschreven in dit proefschrift werd besproken in Hoofdstuk 8. Samenvattend laten deze onderzoeken zien dat tijdstip van de dag een belangrijke bron van variatie kan zijn in de farmacokinetische en farmacodynamische parameters van medicijnen, die door middel van wiskundige modellen en simulaties kunnen worden geïdentificeerd en gekwantificeerd. Meer begrip van het effect van tijdstip van de dag op de blootstelling en het effect van medicijnen is noodzakelijk om deze bron van variatie te kunnen verklaren. Bovendien zouden chronofarmacologische aspecten niet over het hoofd

SAMENVATTING

gezien moeten worden om te kunnen profiteren van de systematische schommelingen in fysiologische processen tijdens het ontwikkelen en optimaliseren van medicijnen.

CURRICULUM VITAE

Laura Kervezee was born on the 26th of January 1989 in The Hague, the Netherlands. In 2007 she completed her secondary bilingual education (tvwo) at the Alfrink College in Zoetermeer and obtained the International Baccalaureate English A2 certificate.

She continued her studies at the University College Utrecht, where she majored in Biomedical Science and Neuroscience. In 2009, she spent a semester at Monash University in Melbourne (Australia) as part of an exchange program. Her interest in chronobiology developed during her bachelor's studies and was strengthened by an internship at the Academic Medical Center in Amsterdam on circadian rhythms in adipose tissue and by writing a literature review on the circadian clock in health and disease. In 2010, she received her Bachelor of Science degree summa cum laude from the University of Utrecht. In 2011, she obtained her master's degree in Neuroscience with distinction from University College London in England.

In January 2012, she started her PhD research within the STW OnTime consortium under the supervision of Prof. Johanna H. Meijer at the laboratory of Neurophysiology, Department of Molecular Cell Biology of the Leiden University Medical Center (LUMC) in collaboration with Dr. Elizabeth C.M. de Lange at the Leiden Academic Centre of Drug Research (LACDR) and Prof. Koos Burggraaf at the Center for Human Drug Research (CHDR) in Leiden. The results of this research are described in this thesis. During this period, she has been involved with the development of teaching material on chronobiology for secondary schools on behalf of the STW OnTime committee and wrote regular columns in the independent university newspaper Mare in 2015 and 2016. In 2015, she was awarded with the first prize in an essay competition from the Royal Holland Society for Sciences (KHMW) and the Dutch national newspaper NRC Handelsblad for an essay on the busyness of modern life. In 2016, she worked temporarily for the graduate school of the LUMC.

Currently, she is working as a postdoctoral researcher at the McGill University in Montreal, Canada, on a project addressing circadian maladaptation in shift workers in the groups of Prof. D. Boivin and Dr. N. Cermakian.

CURRICULUM VITAE

Laura Kervezee werd geboren op 26 januari 1989 in 's Gravenhage, Nederland. In 2007 voltooide zij haar tweetalig-vwo opleiding cum laude aan het Alfrink College in Zoetermeer en behaalde ze haar International Baccalaureate English A2 certificaat.

Ze zette haar studie voort aan het University College Utrecht, waar ze als hoofdrichting biomedische wetenschappen en neurowetenschappen koos. In 2009 studeerde zij aan de Monash University in Melbourne (Australië) als onderdeel van een uitwisselingsprogramma. Haar interesse in chronobiologie ontwikkelde zich tijdens deze bachelor opleiding en werd versterkt door een stage bij het Academisch Medisch Centrum in Amsterdam onder begeleiding van Prof. A. Kalsbeek naar circadiane ritmes in vetweefsel en door het schrijven van een literatuuroverzicht over de circadiane klok in gezondheid en ziekte. In 2010 behaalde ze haar Bachelor of Science diploma summa cum laude van de Universiteit van Utrecht. In 2011 voltooide ze haar master opleiding in neurowetenschappen met het predicaat distinction van University College London in het Engeland.

In januari 2012 begon zij met haar promotieonderzoek in het kader van het STW OnTime consortium onder begeleiding van Prof. Johanna H. Meijer in de sectie Neurofysiologie van het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC), in samenwerking met Dr. Elizabeth C.M. de Lange van het Leiden Academic Centre for Drug Research (LACDR) en Prof. Koos Burggraaf van het Center for Human Drug Research (CHDR) in Leiden. De resultaten van dit onderzoek worden beschreven in dit proefschrift. Gedurende deze periode is zij betrokken geweest bij de ontwikkeling van lesmateriaal over chronobiologie voor middelbare scholieren namens de STW OnTime commissie en schreef zij vanaf 2015 regelmatig columns voor het onafhankelijke universitaire weekblad Mare. In 2015 won zij de eerste prijs in een essay wedstrijd van de Koninklijke Hollandse Maatschappij der Wetenschappen (KHMW) en het NRC Handelsblad voor een essay over drukte in het hedendaagse leven. In 2016 heeft ze tijdelijk gewerkt voor de graduate school van het LUMC.

Momenteel doet ze als postdoc onderzoek aan de McGill University in Montreal, Canada, naar circadiane maladaptatie als gevolg van werken in nacht- en ploegdiensten in de groepen van Prof. D. Boivin en Dr. N. Cermakian.

LIST OF PUBLICATIONS

Kervezee L, Stevens J, Birkhoff W, Kamerling IMC, de Boer T, Dröge M, Meijer JH, Burggraaf J (2016): Identifying 24-hour variation in the pharmacokinetics of levofloxacin: a population pharmacokinetic approach. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 81: 256–268.

Kervezee L, Gotta, V, Stevens J, Birkhoff W, Kamerling IMC, Danhof M, Meijer JH, Burggraaf J: Levofloxacin-induced QTc prolongation depends on the time of drug administration. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* doi: 10.1002/psp4.12085

Kervezee L, Hartman R, van den Berg, DJ, Shimizu S, Emoto-Yamamoto Y, Meijer JH, de Lange ECM (2014): Diurnal Variation in P-glycoprotein-Mediated Transport and Cerebrospinal Fluid Turnover in the Brain. *AAPS J.* 16: 1029–1037.

van Rongen A*, **Kervezee L***, Brill M, van Meir H, den Hartigh J, Guchelaar HJ, Meijer JH, Burggraaf J, van Oosterhout F (2015): Population Pharmacokinetic Model Characterizing 24-Hour Variation in the Pharmacokinetics of Oral and Intravenous Midazolam in Healthy Volunteers. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 4: 454–464.

*These authors contributed equally

Kervezee L, Hartman R, van den Berg DJ, Meijer JH, de Lange ECM (2016): Daily variation in the pharmacokinetics and brain distribution of morphine. *Submitted*

Publications not in this thesis

Kervezee L (2015): Een drukte van belang? in: Koninklijke Hollandsche Maatschappij der Wetenschappen becroonde essays 2015. ISBN 978-90-78396-17-8. Tevens gepubliceerd in NRC Handelsblad onder de titel We hebben het druk druk druk. Maar het is oké om nee te zeggen (10 oktober 2015).

Blom ML, **Kervezee L** (2014): Het verminderen van negatief gedrag in de gymles. *Lichamelijke opvoeding* 102: 38-40

DANKWOORD

Een promotietraject is als een triathlon: het vereist een lange adem en, al moet je het uiteindelijk alleen afleggen, het was lang niet zo leuk geweest zonder de steun, hulp en afleiding van de mensen om je heen. Nu de eindstreep echt in zicht is, een woord van dank aan iedereen die van dichtbij of veraf betrokken is geweest bij de totstandkoming van dit proefschrift.

Prof. Meijer, beste Joke, bedankt voor het vertrouwen dat je me vanaf het begin hebt gegeven. Je enthousiasme en positiviteit heb ik altijd erg gewaardeerd. Prof. Burggraaf, beste Koos, jouw nuchtere kijk en jouw vermogen om – in mijn hoofd ingewikkelde – zaken een stuk makkelijker te maken waren erg verhelderend. Ik ben je erg dankbaar voor de kans om mijn project uit te voeren bij het CHDR: het was een erg leerzame ervaring waar ik de rest van mijn leven profijt van zal hebben. Beste Liesbeth, je gedrevenheid voor het onderzoek en je oog voor detail zijn erg inspirerend. Bedankt voor de fijne samenwerking.

Onderzoek uitvoeren in samenwerking met drie verschillende afdelingen maakt de lijst van collega's die mij hebben geholpen, gesteund of van de nodige gezelligheid hebben voorzien, te lang om iedereen op deze plek persoonlijk te bedanken. Collega's bij Neurofysiologie, in zo'n fantastische chronobiologie groep kon ik mij niet anders dan meteen thuis voelen. Bedankt voor alle gezelligheid door de jaren heen en vooral ook de geslaagde congresbezoeken.

Collega's bij het CHDR, bedankt voor alle hulp die jullie mij hebben gegeven bij de voorbereiding en (nachtelijke) uitvoer van mijn studie. Willem, ik waardeerde het erg dat je tijdens de uitvoer van mijn onderzoek bij het CHDR dag en nacht voor me klaar stond, dankjewel. Jasper, onder jouw hoede zette ik mijn eerste stapjes in de wereld van het modelleren. Bedankt voor al je geduldige uitleg, leuke discussies en prettige samenwerking.

Collega's bij Farmacologie, met een glimlach kijk ik terug op de fijne tijd die ik bij jullie heb gehad als "adoptie-promovendus". Ik heb veel geleerd (en gelachen)! Bedankt ook voor alle sportieve en minder sportieve gezelligheid. Robin, jij was vaak letterlijk een lichtpuntje tijdens lange, donkere, experimentdagen en ik heb veel bewondering voor je vakkundigheid. Bedankt! Dirk-Jan, bedankt voor al je (HP)LC(/MS) hulp!

Dank aan alle mensen buiten het lab die mijn promotietraject een stuk leuker hebben gemaakt. Alle etentjes, fietstochten, borrels, vakanties, triathlons en lange gesprekken vormden een welkome en onuitputtelijke bron van afleiding waar ik altijd naar uitkeek. Het STW OnTime consortium wil ik bedanken voor de kans om bij te dragen aan de bekendheid van chronobiologie onder middelbare scholieren en hun leraren. Het universitair weekblad Mare dank ik voor de kans om mijn hersenspinsels te mogen delen met het Leidse publiek.

Paranimfen, bedankt dat jullie er voor me willen zijn. Ivo, je kent me langer dan wie dan ook en je vult me aan, dus met jou naast me moet die verdediging wel goed komen. Juul, ik waardeer je humor, gezelligheid en (wetenschappelijke) gedrevenheid en ik ben er trots op dat je mijn paranimf wil zijn.

DANKWOORD

Pap en mam, jullie hebben me altijd de vrijheid en het vertrouwen gegeven om mijn eigen weg te vinden. Bedankt voor alle kansen die ik dankzij jullie heb kunnen aangrijpen. Oma, tijdens mijn hele promotietraject was u een vast rustpuntje in mijn week. Ik kon altijd bij u terecht voor een kopje soep, een luisterend oor en wijze woorden, dankuwel.

Als laatste: Super Mario! Ik bewonder je om wie je bent en ik ben je heel dankbaar voor het mooier maken van mijn leven.

LAURA